UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - PPGA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE TRICOTECENOS PELAS ESPÉCIES *Fusarium meridionale*, *F. austroamericanum* e *F. graminearum*

TESE DE DOUTORADO

MARCIA HELENA MOTA DE ARRUDA

GUARAPUAVA-PR
2020

MARCIA HELENA MOTA DE ARRUDA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE TRICOTECENOS PELAS ESPÉCIES *Fusarium meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum*

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva
Orientador

Prof. Dr. Dauri José Tesmann
Co-Orientador

GUARAPUAVA-PR
2020

Catalogação na Publicação
Rede de Bibliotecas Unicentro

Arruda, Marcia Helena Mota de
A779c Caracterização molecular e avaliação do potencial de produção de tricotecenos pelas espécies *Fusarium meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum* / Marcia Helena Mota de Arruda. – – Guarapuava, 2020.
xi, 100 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2020.

Orientador: Paulo Roberto Da Silva
Coorientador: Dauri José Tesmann
Banca examinadora: Adriana Knob, Sandra Patussi Brammer, Juliano Luiz de Almeida

Bibliografia

1. Agronomia. 2. Fusariose. 3. Giberela. 4. Nivalenol. 5. Trigo. 6. ISSR. 7. Diversidade genética. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

CDD 630

ANEXO I

DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROPESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE

Declaro que no dia 16/07/2020, às 13h30min participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de tese de doutorado intitulada "**Caracterização molecular e avaliação do potencial de produção de tricotecenos pelas espécies *Fusarium meridionale*, *F. austroamericanum* e *F. graminearum***," da candidata **Marcia Helena Mota de Arruda**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho da candidata quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que a candidata pode ser considerada:
Aprovada _____(APROVADA OU REPROVADA).

Atenciosamente,

_____
Assinatura

Nome: Dauri José Tessmann
Instituição: Universidade Estadual de Maringá
Programa de Pós-Graduação (se for o caso):

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

ANEXO I

DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROPESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE

Declaro que no dia 16/07/2020, às 13h30min participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de tese de doutorado intitulada "**Caracterização molecular e avaliação do potencial de produção de tricotecenos pelas espécies *Fusarium meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum***," da candidata **Marcia Helena Mota de Arruda**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho da candidata quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que a candidata pode ser considerada:

APROVADA (APROVADA OU REPROVADA).

Atenciosamente,

UNICENTRO

Assinatura

Nome: SANDRA PATUSSI BRAMMER

Instituição: EMBRAPA TRIGO

Programa de Pós-Graduação (se for o caso): -----

ANEXO I

DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROPESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE

Declaro que no dia 16/07/2020, às 13h30min participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de tese de doutorado intitulada "**Caracterização molecular e avaliação do potencial de produção de tricotecenos pelas espécies *Fusarium meridionale*, *F. austroamericanum* e *F. graminearum***," da candidata **Marcia Helena Mota de Arruda**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho da candidata quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que a candidata pode ser considerada: APROVADA.

Atenciosamente,

Adriana Knob

Assinatura

Nome: Adriana Knob

Instituição: UNICENTRO

Programa de Pós-Graduação (se for o caso): PPG Biologia Evolutiva/UNICENTRO

ANEXO I

DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROPESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE

Declaro que no dia 16/07/2020, às 13h30min participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de tese de doutorado intitulada "**Caracterização molecular e avaliação do potencial de produção de tricotecenos pelas espécies *Fusarium meridionale*, *F. austroamericanum* e *F. graminearum***," da candidata **Marcia Helena Mota de Arruda**, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho da candidata quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que a candidata pode ser considerada: APROVADA (APROVADA OU REPROVADA).

Atenciosamente,

UNICENTRO

Assinatura

Nome: Juliano Luiz de Almeida

Instituição: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária

Programa de Pós-Graduação (se for o caso):

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana."

(Louis Pasteur)

AGRADECIMENTOS

A essa força interior que chamamos de Deus, que nos momentos mais difíceis surgia com uma voz dizendo, vá em frente, você consegue.

A minha mãe Helena, que sempre me incentivou aos estudos, pelo exemplo de mulher forte e mãe dedicada.

Ao meu pai, José Maria Arruda Netto (*in momorian*), que nos deixou no final dessa jornada, descanse em paz meu pai.

Ao meu querido Schatz, Cristiano Buhali, que sempre teve paciência e compreendeu minha ausência. Por ter dedicado parte de suas férias a construção da estufa para meu experimento. Gratidão por sua companhia e amor. Logo poderemos ir acampar na montanha.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Da Silva, que pacientemente conduziu a orientação, corrigindo quantas vezes fosse necessário, chamando a atenção por vezes. Professor, parabéns pela dedicação aos seus orientados e a ensinar com excelência. Meu sincero agradecimento pelo seu comprometimento e ajuda, muito obrigada.

Ao Professor Dr. Dauri José Tesmann pela ajuda, correções e orientações. Seguimos esse caminho devido as suas contribuições. Tenho admiração pelo seu profissionalismo e dedicação a ciência, muita obrigada.

Aos mestres da Universidade Estadual do Centro Oeste, CEDETEG, pelo empenho e dedicação em educar.

A prestativa Lucília, secretária do PPGA da Unicentro, por sempre colaborar.

A Cooperativa Agrária Agroindustrial e Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, que apoiaram o projeto, dispondo de estrutura para a realização de grande parte dos experimentos.

Ao Dr. Juliano Luiz de Almeida que sempre apoiou o projeto e disponibilizou parte da sua estrutura na FAPA para o início das pesquisas, muito obrigada.

Aos colaboradores da FAPA, especialmente ao Marcos Luiz Fostim, Arildo de Jesus dos Santos e Valdecir Batista de Góes, que ajudaram em vários momentos, desde a coleta do solo e preparo dos vasos, às avaliações, sempre com um sorriso no rosto. Que belo exemplo, muito obrigada.

Aos colegas do Laboratório Central, Rodrigo Scherer, Daniele Luciana de Lima, Carla Daiane Leite, Michele Lemes de Almeida, que contribuíram para eu alcançar meu objetivo. Sou muito grata a vocês.

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal da UNICENTRO, em especial ao Felipe Liss Zchonski e Yuri Kataoka Silva que auxiliaram com as pesquisas na área molecular.

A equipe do Laboratório de Fitopatologia da UEM por preparar os isolados para os meus estudos, muito obrigada.

A todos que de alguma forma contribuíram e estiveram presentes nesta etapa.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO ..... **I**

ABSTRACT ..... **III**

1. INTRODUÇÃO **1**

2. OBJETIVOS **3**

2.1. Objetivo Geral 3

2.2. Objetivos específicos 3

3. HIPÓTESES **4**

4. REFERENCIAL TEÓRICO **5**

4.1. O trigo e as limitações da produção causadas pela FET 5

4.2. O gênero *Fusarium* e o ciclo de vida do F. *graminearum* em trigo 6

4.3. Distribuição geográfica dos quimiotipos do CFg 8

4.4. Micotoxinas fúngicas e tricotecenos 15

4.5. Importância dos tricotecenos para a segurança alimentar 21

4.6. Limites de micotoxinas em alimentos e legislação 23

4.7. Estratégias para monitoramento e identificação de genótipos tricotecenos de espécies do CFg 24

4.8. Diversidade genética 26

5. MATERIAL E MÉTODOS **29**

5.1. Caracterização molecular 29

5.1.1. Obtenção dos isolados 29

5.1.2. Repicagem de fungos fitopatogênicos e condições de armazenamento 31

5.1.3. Obtenção de material para extração de DNA 32

5.1.4. Extração e quantificação do DNA 33

5.1.5. Genotipagem dos isolados 33
5.1.6. Análise dos géis 34
5.1.7. Sequenciamento dos isolados que não apresentaram padrão de bandas para genótipos 3-ADON ou 15-ADON ou NIV 34
5.1.8. Quimiotipagem 36
5.1.9. Obtenção da suspensão de esporos 36
5.1.10. Quimiotipagem em planta 38
5.1.11. Quimiotipagem em meio de cultura de arroz 45
5.2. Obtenção de cultura monospórica de isolados potencialmente híbridos 47
5.3. Inibição do crescimento micelial entre isolados do CFg 47
5.3.1. Análise estatística 50
5.4. Diversidade e estruturação genética de isolados das espécies Fmer, Faus e Fgra do estado do Paraná 50
5.4.1. Obtenção dos isolados e extração e quantificação do DNA 50
5.4.2. PCR, eletroforese e análise dos géis 51
5.4.3. Análise estatística 52

6. RESULTADOS 54
6.1. Genotipagem molecular 54
6.2. Severidade em espécies Fmer, Faus e Fgra 57
6.3. Produção de micotoxinas por isolados do CFg em meio de cultura e em planta 58
6.4. Isolados com genótipos indefinidos 61
6.5. Potencial de inibição de crescimento micelial entre isolados de *Fusarium* 62
6.6. Diversidade e estruturação genética de isolados das espécies Fmer, Faus e Fgra do estado do Paraná 64

7. DISCUSSÃO 68
7.1. Genotipagem molecular 68
7.2. Isolados com genótipos indefinidos 68

7.3. Produção de micotoxinas por isolados do CFg em meio de cultura e em planta 69
7.4. Especificidade na produção de micotoxinas por *F. meridionale*, *F. austroamericanum* e F. *graminearum* 70
7.5. Influência do substrato na produção de micotoxinas 72
7.6. Potencial de inibição de crescimento micelial entre isolados das espécies Fmer, Faus e Fgra 74
7.7. Diversidade genética 75

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 80

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

RESUMO

ARRUDA, M.H.M. Caracterização molecular e avaliação do potencial de produção de tricotecenos pelas espécies *Fusarium meridionale*, *F. austroamericanum* e *F. graminearum*

A fusariose da espiga do trigo (FET) ou giberela é uma doença devastadora em regiões tritícolas do Brasil e do mundo. No Brasil, a região Sul é a mais afetada, principalmente devido as condições climáticas subtropicais, propícias para o desenvolvimento dos patógenos, porém, pode ocorrer também na região Centro-oeste, em anos chuvosos, durante o desenvolvimento da cultura do trigo. Os pesquisadores têm buscado conhecer os agentes etiológicos desta doença para propor melhorias no manejo e no desenvolvimento de cultivares com melhor resposta ao ataque do potógeno. Os principais fungos causadores da FET pertencem ao complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CFg). Estes fungos produzem micotoxinas que podem inviabilizar o uso dos grãos de trigo na indústria. O Paraná é o maior produtor de trigo no Brasil e a caracterização genética e de potencial de produção de micotoxinas das espécies do CFg ocorrentes no estado é um avanço importante para o desenvolvimento da triticultura no estado. Neste sentido, os objetivos deste estudo foram: 1. genotipar pela técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) 56 isolados de fungos do CFg oriundos de lavouras de trigo do PR; 2. quantificar e avaliar o potencial de produção das micotoxinas deoxinivalenol e seus derivados acetilados 3-ADON, 15-ADON e nivalenol, por isolados do CFg, crescidos em plantas de trigo e em meio de cultura de arroz; 3. avaliar o potencial de inibição de crescimento micelial entre os isolados com genótipos 3-ADON e 15-ADON em relação ao crescimento de isolados com genótipo NIV; 4. avaliar a existência no estado do Paraná de genótipos capazes de produzir simultaneamente quantidades significativas e similares das micotoxinas NIV e 3-ADON ou NIV e 15-ADON. 5. Avaliar a diversidade e estruturação genética de populações das espécies *F. graminearum* (Fgra), *F. meridionale* (Fmer) e *F. austroamericanum* (Faus), ocorrentes no estado do Paraná. Os resultados da genotipagem obtidos pela técnica da PCR, pela avaliação dos genes *Tri3* e *Tri12* mostrou-se eficiente e confirmou a presença de isolados do CFg com genótipos NIV, 3-ADON e 15-ADON no estado do PR. A avaliação do potencial de produção de micotoxinas por cromatografia líquida de alta performance associada a detector de massas evidenciou que as espécies Fmer, Faus e Fgra foram eficientes na produção de uma ou mais toxinas. Fmer foi eficiente na produção somente de NIV. Faus apresentou alta variabilidade quanto a produção de 3-ADON e DON e baixa e homogênea produção de 15-ADON e NIV. Fgra foi efetivo na

produção de 3-ADON em plantas e na produção de 15-ADON e DON em meio e em planta. O meio de cultura arroz influenciou a quantidade de micotoxinas produzidas por Fmer e Fgra. Os isolados das espécies Fgra e Faus não inibiram isolados da espécie Fmer. Não foram observados genótipos híbridos capazes de produzir simultaneamente quantidades significativas das micotoxinas NIV e 3-ADON ou NIV e 15-ADON ou NIV e DON em plantas de trigo. A avaliação de populações das espécies Fgra, Fmer e Faus utilizando marcadores *inter-simple sequence repeat* (ISSR) identificou alta diversidade e estrutura genética nas populações. Fgra apresentou a maior diversidade genética entre as espécies estudadas. A análise conjunta dos dados obtidos neste estudo evidencia a diversidade de micotoxinas produzidas pelos membros do CFg ocorrentes no Paraná, com NIV e DON sendo de maior relevância para acompanhamento em grãos de trigo colhidos no estado para garantia da segurança alimentar humana e animal. Também, a alta diversidade e estrutura genética podem garantir alta resiliência dessas espécies podendo dificultar a obtenção de cultivares de trigo com boa resistência FET, além de poder tornar o controle químico menos eficaz.

Palavras-chave: Fusariose, giberela, nivalenol, trigo, ISSR, diversidade genética.

ABSTRACT

ARRUDA, M.H.M. Molecular characterization and evaluation of the trichothecene production potential by the species *Fusarium meridionale*, *F. austroamericanum* and *F. graminearum*

Wheat fusarium head blight (FHB) is a devastating disease in wheat fields in Brazil and around the world. Researchers have sought to learn about the etiological agents of this disease to propose improvements in the management and development of cultivars with a better response to the attack of the potogen. The main fungi that cause FHB belong to the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC). These fungi produce mycotoxins that can make the use of wheat grains unviable to the industry. The State of Paraná is the largest wheat producer in Brazil and the genetic characterization and the potential for mycotoxins production of FGSC members occurring in the state is an important advance for the development of wheat production in the state. In this sense, the goals of this study were: 1. genotyping by PCR (polymerase chain reaction) 56 isolates of FGSC from wheat fields of PR; 2. quantify and evaluate the production potential of mycotoxins deoxynivalenol and its acetylated derivatives 3-ADON, 15-ADON and nivalenol, by FGSC isolates, grown in wheat plants and in rice medium; 3. evaluate the inhibition potential of mycelial growth among isolates with 3-ADON and 15-ADON genotypes in relation to the growth of isolates with NIV genotype; 4. evaluate the existence in the state of Paraná of genotypes capable of simultaneously producing significant and similar amounts of mycotoxins NIV and 3-ADON or NIV and 15-ADON. 5. Evaluate the genetic diversity and genetic structure of populations of the species *F. graminearum* (Fgra), *F. meridionale* (Fmer) and *F. austroamericanum* (Faus), sampled in wheat fields of the state of Paraná. The results of the genotyping of the *Tri3* and *Tri12* genes showed efficient and confirmed the presence of FGSC isolates with NIV, 3-ADON and 15-ADON genotypes in the state of PR. The evaluation of mycotoxin production potential by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry showed that the species Fmer, Faus and Fgra were efficient in the production of one or more toxins. Fmer was efficient in producing only NIV. Faus showed high variability in the production of 3-ADON and DON and low and homogeneous production of 15-ADON and NIV. Fgra was effective in the production of 3-ADON in wheat plants and in the production of 15-ADON and DON in rice medium and in wheat plant. The rice medium influences the amount of mycotoxins

produced by Fmer and Fgra. The isolates of the species Fgra and Faus did not inhibit the growth of Fmer isolates. No hybrid genotypes, capable of simultaneously producing significant amounts of mycotoxins NIV and 3-ADON or NIV and 15-ADON or NIV and DON, were observed. The evaluation of populations of the species Fgra, Fmer and Faus using *inter-simple sequence repeat* (ISSR) markers identified high diversity and genetic structure in populations. Fgra showed the high genetic diversity among the studied species. The overall analysis of the data obtained in this study shows the diversity of mycotoxins produced by members of the FGSC from Paraná, with NIV and DON being of greater relevance for monitoring wheat grains harvested in the state to guarantee human and animal food security. Also, the high diversity and genetic structure can guarantee high resilience of these species, making it difficult to obtain wheat cultivars with good FHB resistance, and also making chemical control less effective.

Keywords: Fusarium head blight, nivalenol, wheat, ISSR, genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

- O trigo (*Triticum aestivum* L.) é o segundo cereal mais cultivado no mundo, com significativa importância no cenário econômico agrícola. A produção do cereal no mundo na safra 2019/20 foi de 768 milhões/ton. Estima-se que o Brasil produza na safra 2020/21, 5,5 milhões/ton (USDA, 2020).

Este cereal é também o responsável por aproximadamente 35% do total de calorias consumidas em mais de 80 países onde é considerado como fonte primária de proteína (CHAVES et al., 2013).

O trigo de primavera é uma gramínea de ciclo anual, cultivada durante o inverno e a primavera no hemisfério Sul. No Brasil, cultiva-se trigo de primavera, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, seja para suprir a indústria alimentícia ou o mercado de sementes (DE ALMEIDA et al., 2016). A produção anual brasileira de trigo é de aproximadamente cinco milhões de toneladas, e o consumo do grão no país é em torno de treze milhões de toneladas, sendo necessária a importação do cereal (CONAB, 2018). A região Sul é a maior produtora, e detém aproximadamente 90% da produção brasileira, com 2,8 milhões de toneladas (USDA, 2020).

Devido ao aumento no consumo de trigo no Brasil, estima-se que em 2027 as importações brasileiras do cereal cheguem a 7,6 milhões de toneladas (USDA, 2018).

Uma das preocupações no cultivo do trigo é em relação às doenças que afetam a cultura. Dentre estas doenças, a giberela ou fusariose da espiga do trigo (FET) é uma das mais importantes. Epidemias severas desta doença têm sido observadas em diversas regiões do mundo, promovendo perdas na produtividade e qualidade dos grãos (DEL PONTE et al., 2009; WANG et al., 2019).

Quando da ocorrência da FET, a qualidade dos grãos é afetada, principalmente pelo acúmulo de micotoxinas produzidas por fungos, dentre estes, os do complexo de espécies *Fusarium graminearum* (CFg). Estas micotoxinas são tóxicas aos seres humanos e animais (PERRONE; BOTTALICO, 2002) e quando detectadas acima dos níveis permitidos leva ao descarte de lotes de grãos.

Os danos ocasionados pela FET no Brasil incluem a redução no rendimento e a contaminação com as micotoxinas desoxinivalenol (DON), 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON), 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) e nivalenol (NIV) (DEL PONTE et al., 2015). A partir de lavouras de trigo do estado do Paraná já foram isoladas diversas espécies de *Fusarium*, dentre estas as de maior prevalência são *Fusarium graminearum* Schwabe

[telemorfo: Gibberella zeae (Schwein.) Petch] (genótipo 15-ADON), *Fusarium meridionale* T. Aoki, Kistler, Geiser e O'Donnell (genótipo NIV) e *Fusarium austroamericanum* T. Aoki, Kistler, Geiser e O'Donnell (genótipo 3-ADON) (FEKSA et al., 2016).

Apesar da informação das espécies do CFg ocorrentes nas lavouras de trigo do estado do Paraná, não há trabalhos sobre o potencial de produção de micotoxinas, bem como sobre a diversidade e estruturação genética destas espécies. Por exemplo, interessantemente, apesar da presença da espécie *F. meridionale* (Fmer) estar confirmada no Paraná, níveis baixos da micotoxina NIV são detectados em análises de grãos e derivados realizadas rotineiramente em empresas processadoras de grãos do estado. A avaliação da produção de micotoxinas em planta por isolados Fmer em ambiente controlado, em meio de cultura e em ensaios de competição entre espécies do CFg podem auxiliar na resposta do porque desta baixa ocorrência de NIV em grãos colhidos no Paraná. A genotipagem e a quimiotipagem de isolados coletados no Paraná podem fornecer dados importantes da diversidade destas espécies, bem como do potencial de produção de micotoxinas.

Considerando a importância do estado do Paraná na produção de trigo no cenário nacional, a importância das micotoxinas na triticultura e a necessidade do conhecimento das espécies do CFg prevalentes no estado, principalmente da espécie *F. meridionale* (Fmer), é necessário investimento em estudos visando a identificação e caracterização genética e química das espécies do CFg ocorrentes em seu território .

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar usando marcadores moleculares e avaliar o potencial de produção das micotoxinas deoxinivalenol e nivalenol pelas espécies de *F. meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum* coletados de isolados de plantas de trigo no estado do Paraná.

2.2. Objetivos específicos

1. Genotipar isolados das espécies *F. meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum* para a presença de genes envolvidos na síntese de micotoxinas tricotecenos do tipo B (DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV);

2. Quantificar a produção das micotoxinas DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV por isolados das espécies *F. meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum* em plantas de trigo e meio de cultura de arroz;

3. Avaliar o potencial de inibição de crescimento micelial em meio de cultura, das espécies *F. austroamericanum* e *F. graminearum* frente a *F. meridionale*.

4. Avaliar a diversidade e estrutura genética de populações das espécies das espécies *F. meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum* produtoras das micotoxinas DON, 3-ADON; 15-ADON e NIV coletadas no estado do Paraná;

3. HIPÓTESES

1. No estado do Paraná ocorre isolados das espécies *F. meridionale*, *F. austroamericanum* e *F. graminearum* com genótipo NIV, 3-ADON e 15-ADON, respectivamente;

2. Isolados de espécies *F. meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum* apresentam diferenças significativas em relação a sua capacidade de produção de micotoxinas tricotecenos quando crescidos em plantas de trigo e meio de cultura de arroz.

3. No estado do Paraná não ocorrem isolados das espécies *F. meridionale*, *F. austroamericanum* e *F. graminearum* capazes de produzir simultâneamente 3-ADON e NIV ou 15-ADON e NIV;

4. As espécies *F. austroamericanum* e *F. graminearum* podem inibir o crescimento micelial em meio de cultura, de *F. meridionale*.

5. Há alta diversidade e estruturação genética nas populações das espécies *F. meridionale, F. austroamericanum* e *F. graminearum* ocorrentes no Paraná.

6. Há híbridos entre espécies de *Fusarium* produtores simultaneamente das micotoxinas NIV e DON no estado do Paraná.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. O trigo e as limitações da produção causadas pela FET

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais mais importantes no mercado mundial, atingindo média de 670 milhões de toneladas produzidas, aproximadamente 655 milhões de toneladas consumidas, e 175 milhões de toneladas de estoque anual. A União Européia é o maior produtor mundial de trigo, com aproximadamente 153 milhões de toneladas, seguido pela China com 130 milhões de toneladas, Índia, com 98 milhões de toneladas e Rússia com 83 milhões de toneladas (USDA, 2018).

Visando a mitigação dos problemas com a cultura do trigo, os pesquisadores empenham-se para desenvolver novas cultivares com melhores parâmetros de qualidade requeridos pelas indústrias, rendimento e resistência a estresses bióticos e abióticos (APPELS et al., 2018).

Dentre as doenças que acometem a cultura, a FET, também conhecida como giberela, causada por espécies do CFg, tem sido um agravante na produção do cereal (ASTOLFI et al., 2011). Epidemias de FET têm sido frequentes na cultura do trigo nos últimos anos em diversas regiões do mundo, principalmente quando associada às condições de clima quente e úmido no estádio de florescimento e estádio inicial do desenvolvimento dos grãos, causando danos na produtividade e qualidade destes (KUBO; KAWADA; FUJITA, 2013; MCMULLEN et al., 2012).

O aumento da FET no Brasil e em regiões tritícolas do mundo tem sido associado ao cultivo de cereais no sistema de plantio direto na palha, devido as condições ideais para a sobrevivência dos fungos nos restos culturais, principalmente em trigo, cevada e milho (DEL PONTE et al., 2004, 2009).

A FET impede a formação de grãos devido à degradação dos grânulos de amido, resultando na produção de grãos enrugados e ocos, e consequentemente redução do rendimento das sementes. A doença também interfere na qualidade do grão produzido ao contaminá-lo com micotoxinas, destacando-se os tricotecenos (TOK; ARSLAN, 2016).

Segundo Dean et al. (2012), todas as regiões produtoras de cereais do mundo presenciaram uma reemergência das epidemias de FET, o que tem causado significativas perdas econômicas. Os grãos contaminados com micotoxinas, acima dos limites estabelecidos, são rejeitados ou perdem valor de venda (MCMULLEN et al., 2012; SALGADO; MADDEN; PAUL, 2015). Essas estatísticas reforçam a necessidade de aprofundar os estudos a fim de reduzir a presença de micotoxinas em grãos cultivados e

consequentemente a redução dos riscos à saúde humana e animal, associado ao consumo de alimentos e rações contaminados (WEGULO, 2012).

De forma geral, as micotoxinas presentes no grão de trigo permanecem após o processamento, na farinha e no produto final, pois são resistentes à temperatura (SCUDAMORE; PATEL, 2008). Alguns estudos indicam que frações de moagem de trigo destinados ao consumo humano apresentaram níveis menores de micotoxinas quando comparados a moagem de trigo para farelo, que são geralmente destinados à ração animal (TIBOLA; FERNANDES; GUARIENTI, 2015).

Em estudo realizado com 23 genótipos de trigo desenvolvidos para as condições subtropicais úmidas do Sul do Brasil, concentrações maiores da micotoxina deoxinivalenol (DON), foram encontrados nas farinhas integrais em relação às farinhas brancas refinadas, confirmando que a maior produção de micotoxinas ocorre no endosperma do núcleo, embora a produção de DON também pode ocorrer no pericarpo, camada intermediária, camada do aleurona e parte externa do endosperma (DE ALMEIDA et al., 2016). Desta forma, o manejo da cultura no campo, e os cuidados com a colheita e armazenamento são fatores fundamentais para controlar a ocorrência de micotoxinas (PACIN et al., 2010).

Em um estudo realizado no Sul do Brasil, foram encontrados cinco espécies do CFg relacionadas à FET e três genótipos tricotecenos, 3-ADON, 15-ADON e NIV. Dentre estas espécies, *F. graminearum senso strictu* (Fgss) e o quimiotipo 15-ADON, foram predominantes (83%), seguido de *F. meridionale (*Fmer*)* e o quimiotipo NIV (12,8%) e em menor proporção *F. austroamericanum* (Faus*)* e os quimiotipos NIV e 3-ADON (0,9%), além das espécies *F.asiaticum* O'Donnell, T. Aoki, Kistler e Geiser e *F.cortaderiae* O'Donnell, T. Aoki, Kistler e Geiser (DEL PONTE et al., 2015).

4.2. O gênero *Fusarium* e o ciclo de vida do *F. graminearum* em trigo

A FET é uma doença causada por diferentes espécies de fungos do gênero *Fusarium* e também por *Microdochium nivale (Fr.) Samuels & I.C. Hallet*, este último embora cause giberela, não é toxigênico, não produz tricotecenos (FOROUD; EUDES, 2009). Desde meados da década de 1980, as definições de espécies de *Fusarium* utilizavam três conceitos de espécie - morfológicos, biológicos e filogenéticos - para diferenciar as espécies do gênero. Entretando, os conceitos de espécie do gênero *Fusarium* foram discutidos entre a comunidade científica e atualmente a maioria dos pesquisadores considram a taxonomia do gênero dividida em complexo de espécies, baseada em marcadores morfológicos, biológicos e

filogenéticos em uma abordagem polifásica baseada em uma avaliação relativa dos dados e marcadores disponíveis (SUMMERELL, 2019). Ao total são 17 espécies de fungos patogênicos associados à FET no mundo (LIDDELL et al., 2003; TELI et al., 2016).

Fusarium graminearum é a espécie de maior relevância associada à FET (O'DONNELL et al., 2004). No entanto, as espécies *F. culmorum* (W.G.Sm) Sacc., *F. poae* Raillo *e F.avenaceum* (Fr.) Sacc. são também consideradas importantes e as duas primeiras destacam-se devido à ocorrência em regiões de clima frio (WIESE, 1987).

Fusarium é um dos mais importantes grupos de fungos fitopatogênicos que se conhece na agricultura e horticultura, acarretando inúmeras doenças ao longo das safras. Quando os fungos patogênicos mais relevantes foram pesquisados, confimou-se que duas espécies de *Fusarium*, *F. graminearum*, causador da giberela do trigo, e *F. oxysporum*, causador de uma série de doenças de murcha e podridão do caule, estavam entre os dez principais patógenos de importância científica e econômica na patologia vegetal molecular. Também, da lista de doenças de culturas agrícolas e hortícolas publicadas pela American Phytopathology Society, de 108 espécies de plantas, 83 têm uma ou mais doenças causadas por *Fusarium* que afetam a produção (SUMMERELL, 2019).

A descrição categórica de algumas espécies do gênero *Fusarium* é contestada devido a possibilidade de isolados de possíveis distintas espécies cruzarem-se entre si em condições de laboratório, gerando progênie fértil e, consequentemente podendo ser interpretado como única espécie biológica (LESLIE; BOWDEN, 2008). No entanto, devido a importância da FET na agricultura e saúde humana e animal, os membros do gênero *Fusarium* relacionados a espécie *F. graminearum* foram categorizados ao nível de espécie, por isso é também chamado complexo de espécies *F. graminearum* (CFg) ou *F. graminearum sensu latu* (O'DONNELL et al., 2004; VAN DER LEE et al., 2015). Neste estudo será considerado a classificação proposta por O'Donnell et al., 2004 e Van Der Lee et al., 2015. Assim, os fungos do CFg aqui estudados serão nomeados a nível de espécie, e quando referir-se a todas as espécies do grupo, causadoras da FET, será referenciado com CFg.

Desde 2011, a nomenclatura dos fungos em geral passou por mudanças de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de algas, fungos e plantas, que define o uso de apenas um nome para cada espécie de fungo, independente da forma sexual (GEISER et al., 2013). O CFg, compreende 16 espécies filogenéticas reconhecidas, das quais 15 são formalmente descritas. Dentre os membros do CFg, *F. graminearum* Schwabe [teleomorfo: *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch] é classificado como um Ascomiceto (SUMMERELL;

LESLIE, 2011) e é o principal agente causador da FET. Esta espécie é dominante entre os isolados de trigo na Europa e nas Américas. Adicionalmente, seis outras espécies do CFg (*F. asiaticum, F. austroamericanum, F. boothii , F. brasilicum, F. cortaderiae* e *F. meridionale*) foram encontradas afetando o trigo e outras culturas de cereais de inverno cultivadas no Brasil, Argentina e Uruguai (DEL PONTE et al., 2015).

O ciclo da FET, ou ciclo das relações patógeno-hospedeiro, é uma sequência de eventos que ocorrem desde o desenvolvimento da doença até os sinais e sintomas no hospedeiro (AGRIOS, 2004). O ciclo da doença é composto de cinco fases: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno. A FET é considerada uma doença policíclica, o fungo sobrevive entre as estações de cultivo, na superfície do solo, como saprófita em resíduos vegetais de culturas hospedeiras e não hospedeiras (TRAIL, 2009). Sobre estes resíduos, o fungo produz esporos assexuais, os macroconídios, os quais são liberados e dispersos pela ação da chuva e do vento, podendo ser elevados ao topo da cultura. Em condições de umidade, peritécios são formados, liberando os ascósporos (esporos sexuados do fungo), para o ambiente acima do topo da cultura (DEL PONTE et al., 2004). Os ascósporos são liberados quase ao mesmo tempo que o florescimento das plantas hospedeiras (TRAIL; GAFFOOR; VOGEL, 2005), quando as espigas estão mais suscetíveis a infecção (WEGULO et al., 2015). Após a infecção, esta espalha-se rápida e assintomática para outras partes das espigas de trigo até atingir o sistema vascular. Em seguida, pode espalhar-se para o colmo e outras espiguetas da planta, causando visível necrose nos tecidos lesionados (TRAIL; GAFFOOR; VOGEL, 2005). Em condições de umidade constante e prolongada pode ser observada a massa rosada de esporos sobre os grãos infectados, tornando-os deformados e chochos. Esses grãos podem conter micotoxinas produzidas pelo fungo (DEL PONTE et al., 2004). As espécies de *Fusarium*, além de acometerem doenças em plantas, produzem uma diversidade de micotoxinas, principalmente tricotecenos e fumonisinas, causando impactos negativos na produção animal e o potencial de afetar de forma desfavoravel a saúde de seres humanos (DESJARDINS, 2006).

4.3. Distribuição geográfica dos quimiotipos do CFg

A distribuição geográfica das espécies do CFg no mundo não é uniforme, e seus descritores toxicogênicos distintos são estabelecidos pela composição de populações de quimiotipos tricotecenos (Tabela 1).

Conforme especificado na Tabela 1, as espécies do CFg contemplam uma ou mais populações de quimiotipos tricotecenos, e a composição de quimiotipos determina a descrição toxigênica da espécie. O quimiotipo 15-ADON produz DON e também quantidades significativas da forma acetilada precursora, 15-ADON; o quimiotipo 3-ADON produz DON e a forma acetilada precursora, 3-ADON; e o quimiotipo NIV produz nivalenol. Destas micotoxinas, DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV possuem toxicidades distintas e, dentre elas, NIV é a mais tóxica, sendo em torno de dez vezes mais tóxica à mamíferos do que a micotoxina DON (GOSWAMI; KISTLER, 2004; WARD et al., 2002).

Tabela 1. Espécies e quimiotipos do complexo *Fusarium graminearum* e sua distribuição geográfica.

Espécie Filogenética	Linhagem [1]	Quimiotipo tricoteceno [2]	Ocorrência geográfica	Referência
F. austroamericanum	1	NIV 3-ADON	América do Sul (Brasil e Venezuela)	O'Donnell et al. (2000; 2004)
F. meridionale	2	NIV	América do Sul (Brasil) e Central (Guatemala), África (A. Sul), Ásia (Coreia do Sul e Nepal) e Oceania (Áustrália)	
F. boothii	3	DON	Europa, Ásia (Japão, Coréia do Sul e China), América Central (México), África (S. África)	
F. mesoamericanum	4	DON	América Central (Honduras) e do Norte (EUA)	
F. acaciae-meamsii	5	NIV 3-ADON 15-ADON	África (A. Sul) e Oceania (Austrália)	O'Donnell et al. (2000; 2004); Starkey et al. (2007)
F. asiaticum	6	NIV 3-ADON	América do Sul (Brasil) e Ásia (China, Japão, Coréia)	O'Donnell et al. (2000; 2004)
F. graminearum s.str.	7	NIV 3-ADON 15-ADON	Cosmopolita	O'Donnell et al. (2000; 2004); Starkey et al. (2007)
F. cortaderiae	8	NIV	América do Sul (Brasil e Argentina) e Oceania (Austrália e Nova Zelândia)	O'Donnell et al. (2004); Ward et al. 2002)
F. brasilicum	sd	?	América do Sul (Brasil)	O'Donnell et al. (2004); Starkey et al. (2007)
F. vorosii	sd	15-ADON	Europa (Hungria) e Ásia (Japão)	Starkey et al. (2007)
F. gerlachii	sd	NIV	América do Norte (EUA)	Starkey et al. (2007)
F. aethiopicum	sd	15-ADON	África (Etiópia)	O'Donnell et al. (2008)
F. ussurianum	sd	3-ADON 15-ADON	Europe (Russia)	Yli-Mattila et al. (2009)
F. louisianense	sd	NIV	América do Norte (EUA)	Sarver et al. (2011)
F. nepalense	sd	15-ADON	Ásia (Nepal)	

[1] Linhagens filogenéticas 1 a 7 *sensu* O´Donnell et al. (2000) e linhagem 8 *sensu* Ward et al. (2002). [2] Quimiotipo 15-ADON produz DON e também quantidades significativas da forma acetilada, precursora, 15-acetil desoxinivalenol; o quimiotipo 3-ADON produz DON e a forma acetilada, precursora 3-acetil desoxinivalenol; e o quimiotipo NIV produz nivalenol 15-ADON e NIV.

Os fungos do CFg são citados globalmente como agentes causais de uma série de doenças de plantas, produzindo micotoxinas e afetando negativamente a saúde humana e animal. O gênero *Fusarium* é taxonomicamente complexo, sendo necessário para sua identificação uma série de marcadores morfológicos, biológicos e filogenéticos (SUMMERELL; LESLIE, 2011). Todas as espécies dentro do CFg são potenciais produtores de tricotecenos tipo B em planta (O'DONNELL et al., 2008). No entanto, tradicionalmente os isolados do CFg são classificados em quimiotipos. A denominação 'quimiotipo tricoteceno' para determinado tipo é correta somente quando sua caracterização fenotípica for obtida por cromatografia, e determinada a produção de tricotecenos *in vitro*. Quando a tipagem é realizada com técnicas que analisam o DNA, as quais permitem somente constatar se há presença de genes que codificam tricotecenos, é apropriado chamar de 'genótipo tricoteceno'. A diferença entre os genótipos DON e NIV é que para NIV o gene *Tri13* é funcional e codifica tricotecenos, permitindo a conversão de DON em NIV. Neste sentido, os genótipos DON são considerados mutantes de genótipos NIV. A genotipagem por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) possibilita saber o valor preditivo e assim permite somente determinar o potencial de produção de micotoxinas tricotecenos dos fungos (WARD et al., 2002).

Em estudo utilizando 187 isolados de Fgss coletados em regiões tritícolas italianas foram observados três quimiotipos, o mais frequente foi 15-ADON (83,4%), seguido por 3-ADON (10,7%) e NIV (5,9%). Isolados produtores de NIV foram encontrados em diferentes níveis, conforme a região, e oscilaram de 3,5% a 33,3% de ocorrência (PRODI et al., 2009, 2011).

Tendo como referência o quimiotipo para caracterização de espécies de *Fusarium,* Covareli et al. (2014) sugeriram que as condições climáticas na Itália tiveram um forte impacto sobre a ocorrência de 3-ADON e 15-ADON enquanto a contaminação com NIV ocorreu independentemente das condições climáticas, o que pode levar a subestimar os potenciais riscos da ocorrência desta micotoxina.

Na Alemanha, os resultados foram semelhantes, nos quais houve dominância de 15-ADON (92%) seguido do quimiotipo 3-ADON (6,8%) e poucos isolados do quimiotipo nivalenol (1,2%) (TALAS et al., 2011). Também, esta ocorrência foi similar na África do Sul, onde predominou o genótipo 15-ADON em relação aos genótipos NIV e 3-ADON no trigo e cevada (BOUTIGNY et al., 2011).

Outra consideração importante é que diferentes isolados da mesma espécie podem expressar diferentes quimiotipos em distintas regiões. Por exemplo, isolados de Fgss

produziram 3-ADON no Canadá e 15-ADON no Uruguai e isolados de *F.asiaticum* produziram 3-ADON na China e NIV nos Estados Unidos (VAN DER LEE et al., 2015).

O acompanhamento da prevalência dos diferentes quimiotipos na Europa evidenciou que houve aumento da ocorrência de alguns quimiotipos e diminuição de outros (VAN DER LEE et al., 2015). Esse fato requer atenção para identificar se em intervalos de tempo ocorrerá uma mudança nos quimiotipos em determinada região. Neste sentido, a prevalência de quimiotipos deve ser acompanhada rotineiramente, pois segundo os mesmos autores uma população com quimiotipos mais patogênicos pode substituir outra.

A ocorrência de um quimiotipo também pode ser influenciada por um determinado hospedeiro. Por exemplo, as linhagens produtoras de NIV foram mais agressivas em milho quando comparadas aos produtores de DON (YLI-MATTILA et al., 2013). O quimiotipo 15-ADON foi mais presente em isolados de trigo e milho, enquanto o genótipo 3-ADON foi mais comum na cultura da aveia (PASQUALI et al., 2016). Isolados 3-ADON de Fgss e *F. culmorum* inibem o crescimento de plântulas de trigo mais agressivamente e são passíveis de causar lesões necróticas mais severas do que isolados de 15-ADON. Esta afirmativa colabora com a informação de que há mais produção de DON a partir de isolados de 3-ADON (YLI-MATTILA et al., 2013). Os mesmos autores defendem que existem duas populações principais de Fgss na Europa, a população do quimiotipo 3-ADON, que domina no norte da Europa e foi espalhando-se da Finlândia ao noroeste da Rússia e a população do quimiotipo 15-ADON, que é dominante na Europa Central e Sul e espalhou-se para a Dinamarca.

No Norte da Europa, identificou-se que Fgss e os níveis de DON foram mais significativos em aveia, enquanto nas regiões do Sul da Europa Fgss e os níveis de DON prevaleceram em trigo, sugerindo que a ocorrência de Fgss pode ser regionalizada (YLI-MATTILA et al., 2013).

No período entre 2000 a 2013, Pasqualli et al. (2016) realizaram uma pesquisa na qual isolaram 1147 colônias de Fgss de vários países europeus, e avaliaram a distribuição espacial e temporal dos genótipos de tricotecenos em cereais. O trigo foi a principal cultura onde os isolados foram obtidos, com 66,7%, seguido do milho (22,5%) e cevada (5,4%). O estudo gerou um mapa de distribuição do genótipo tricoteceno tipo B, com o genótipo 15-ADON predominante (82,9%), seguido de 3-ADON (13,6%) e NIV (3,5%).

Beyer et al. (2014) avaliaram a existência de padrões temporais de distribuição de quimiotipos e que esses poderiam estar relacionados a alterações nas condições climáticas. Corroborando com esta informação, estudos demonstraram que na China, o genótipo 15-

ADON de Fgss predominou nas áreas de produção de trigo e cevada de algumas regiões, enquanto que em outras regiões os genótipos 3-ADON e NIV de *F. asiaticum* tiveram destaque (GALE et al., 2007; ZHANG et al., 2012).

Também, em estudo realizado nas regiões européias e asiáticas da Federação Russa e região Noroeste da Finlândia e Sul da China, ensaios de genotipagem multilocus mostraram que Fgss foi o único agente patogênico do CFg no norte da Europa e foi predominante na Ásia (90,5%). Observou-se também que embora os isolados de Fgss tenham segregado os quimiotipos 3-ADON e 15ADON em níveis praticamente iguais nas regiões estudadas dos dois continentes, 93,5% dos isolados do Sul da Rússia apresentaram o quimiotipo 15-ADON, e na Finlândia e no noroeste da Rússia o quimiotipo 3-ADON foi exclusivo (YLI-MATTILA et al., 2009). Esses dados demonstraram que as populações chinesas de Fgss em trigo e cevada produziram 15-ADON predominantemente, quando comparadas as populações de *F. asiaticum*, que produziram 3-ADON ou NIV, dependendo de sua origem geográfica. Da mesma forma, no Japão, isolados de *F. asiaticum* e Fgss produzem predominantemente NIV e 3-ADON. Os mesmos autores concluem que Fgss está segregando para os quimiotipos 3-ADON e 15-ADON em proporções muito semelhantes na Rússia Européia e Asiática e que os isolados produtores de NIV desta espécie foram ausentes ou detectatdos em níveis baixos nas regiões amostradas.

Estudo realizado no Canadá, através de análises da distribuição dos quimiotipos tricotecenos concluiu que os produtores de 3-ADON em trigo foram consideravelmente mais comuns em regiões mais quentes, significando um aumento de 14 vezes no período de 6 anos, entre 1998 e 2004 (BEYER et al., 2014). Os mesmos autores sugerem que o crescente aumento de 3-ADON nas regiões mais quentes pode indicar que 3-ADON possui vantagem seletiva sobre os isolados da população de 15-ADON e que esse aumento pode ser devido a mudanças nas práticas agrícolas ou condições ambientais. Estudo semelhante realizado por Ward et al. (2008) evidenciou a ocorrência de mudança evolutiva rápida e adaptativa em populações de patógenos do CFg, demonstrando que uma população geneticamente divergente e toxigênica de Fgss do quimiotipo 3-ADON substituiu rapidamente o quimiotipo 15-ADON no Oeste do Canadá e EUA. Concluiu também que 3-ADON foi consideravelmente mais comum no Leste do Canadá do que nas províncias ocidentais.

Na América do Sul, foi realizado um estudo com 117 isolados pertencentes ao CFg obtidos a partir de grãos comerciais de cevada coletados nos três países, Argentina (43 isolados), Brasil (35 isolados) e Uruguai (39 isolados). Destes, 107 isolados foram

identificados como genótipos de espécies produtoras de tricotecenos (REYNOSO et al., 2011). Na Argentina, 88 % dos isolados coletados pertenciam ao Fgss, sendo o único integrante do CFg causador de FET em cevada, identificado até esta data naquele país. No Uruguai, apenas um isolado de *F. cortaderiae* foi encontrado entre os isolados de Fgss. No Brasil, Fgss também foi predominante, com 62,8 % dos isolados estudados, seguido de Fmer (23%), *F. asiaticum* (5,7 %), *F. cortaderiae* (5,7 %) e Faus, com 2,8 % (REYNOSO et al., 2011). Em um estudo realizado na Argentina utilizando PCR multiplex para os genes *Tri3*, *Tri7* e *Tri13*, foi identificado isolados com genótipos DON/NIV, no entanto estes isolados produziram somente DON quando analizados quimicamente, levando os autores a concluírem que pode ter ocorrido um erro na genotipagem (REYNOSO et al., 2011). Em pesquisa realizada entre os anos de 2013 a 2016 em estações de cultivo de trigo do Paraguai, foi identificada através de ensaios morfofisiológicos e posteriormente confirmada por sequenciamento (O'DONNELL et al., 1998), a existência de *F. poae* associada aos sintomas de FET (ARRÚA et al., 2019). No trigo, a FET é causada principalmente por Fgss, mas outras espécies toxigênicas podem ocorrer, como *F. culmorum, F. avenaceum e F. poae.* Este último é produtor das micotoxinas HT-2, T-2 e tricotecenos do tipo B, relatados na Argentina (DINOLFO et al., 2014).

No Sul do Brasil, em estudo precursor realizado com 82 isolados fúngicos obtidos de amostras de grãos com sintomas de FET, coletados em 20 locais, foi observado que 93% dos isolados foram do genótipo da micotoxina NIV pertenciam a Fmer e os isolados representantes do genótipo DON, 15-ADON pertenciam a Fgss (SCOZ et al., 2009). Os mesmos autores relataram que os genótipos NIV estavam presentes em alguns dos mesmos campos que os genótipos DON / 15-ADON, o que pode ser um indício de ocorrência de populações mistas de genótipos DON e NIV. Contribuindo com este cenário, Del Ponte et al. (2015) avaliaram mais de 200 campos de trigo nos estados do PR e RS com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a diversidade e distribuição espacial de espécies e genótipos de tricotecenos do CFg e concluíram que entre os 671 isolados de FET, Fgss foi prevalente com (83%), seguido de Fmer (12,8%) e Faus (0,9%). Porém, algumas diferenças regionais na composição do CFg foram observadas, onde Fmer foi significativamente mais prevalente no PR (>28%) do que no RS (≤9%). Já no RS, Fgss foi superior em campos abaixo de 600 m de altitude e em campos com maiores níveis de incidência de FET. Os autores sugerem que a composição do CFg e, consequentemente a contaminação por tricotecenos em trigo cultivado no Sul do Brasil são influenciados pela adaptação do hospedeiro.

Estudo realizado com 20 isolados monospóricos obtidos de espigas de trigo com sintomas de FET no Sul do Brasil, analisados morfologicamente e utilizando a técnica de PCR constatou que todos os isolados pertenciam a espécie Fgss, estando em acordo com os relatos descritos por outros autores, onde concluiu-se que a prevalência das tricotecenos pode variar dependendo do clima, das espécies mais cultivadas, entre outros fatores (ANGELOTTI et al., 2005). Também, estudo realizado por Pereira et al. (2020) com 754 isolados de *Fusarium* spp., causadores de FET coletados em campos comercias de cevada e trigo no estado do PR e usando a técnica de genotipagem gultilocus e análises de sequência do gene *TEF-1α* evidenciaram que a dominância, a composição dos membros do CFg e o perfil toxigênico são fortemente influenciados por fatores dos hospedeiros e regionais.

A ocorrência de Fgss associado à FET também foi identificada em campos de produção de cevada do Rio Grande do Sul. Pesquisa realizada com 92 isolados identificados com sintomas de FET, revelou que 66 % dos genótipos tricotecenos pertenciam ao genótipo 15-ADON, 9,3% ao genótipo NIV e 4,4% foram identificados como representantes do genótipo 3-ADON (ASTOLFI et al., 2011).

4.4. Micotoxinas fúngicas e tricotecenos

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, e as espécies do CFg associados a giberela são produtoras de micotoxinas do grupo químico dos tricotecenos (FOROUD; EUDES, 2009).

Os fungos produzem metabólitos secundários não essenciais a vida, mas que podem ser um diferencial em relação à vantagem ecológica em alguns ambientes. Neste grupo incluem reguladores do crescimento das plantas (giberelinas), compostos farmaceuticamente úteis (penicilina, lovastatina), pigmentos (carotenóides) e micotoxinas, como exemplo os tricotecenos, fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxinas (KELLER et al., 2005).

Os tricotecenos são um grupo de micotoxinas que compartilham um núcleo tricíclico denominado tricoteceno e em geral possuem um epóxido em C-12 e C-13 (Figura 1), os quais são essenciais para a toxicidade (DESJARDINS; HOHN; MCCORMICK, 1993). Muitos tricotecenos possuem uma dupla ligação C-9,10, também importante para definir a toxicidade (EHRLICH; DAIGLE, 1987). Existem cinco posições em que a funcionalidade varia, geralmente com grupos hidroxila ou acetila. Quatro tipos de tricotecenos foram identificados a partir de fungos produtores: tipos A, B, C e D, destacando-se os tricotecenos do tipo A e B (MIROCHA et al., 2003). Os principais tricotecenos do tipo A pertencentes ao CFg incluem

as micotoxinas T-2 e HT-2, neosolaniol e o diacetoxiscirpenol (DAS), produzidos pelas espécies *F. poae*, *F. langsethie* Torp & Nirenberg *F.* spo*rotrichoides* Sherb. (FOROUD; EUDES, 2009).

Toxin	R1	R2	R3	R4	R5
DON	–OH	–H	–OH	–OH	=O
3-ADON	–OAc	–H	–OH	–OH	=O
15-ADON	–OH	–H	–OAc	–OH	=O
NIV	–OH	–OH	–OH	–OH	=O
T-2	–OH	–OAc	–OAc	–H	–OIsoval
HT-2	–OH	–OH	–OAc	–H	–OIsoval
4,15-DAS	–OH	–OAc	–OAc	–H	–H

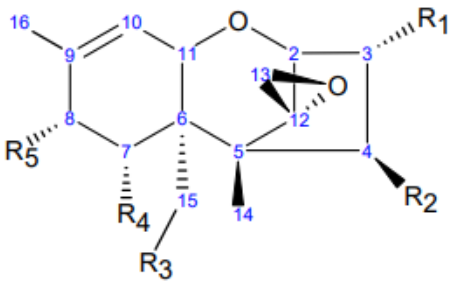

Figura 1. Estruturas de tricoteceno tipo A e B. Exemplos de tricotecenos do tipo A incluem toxina T-2 (T-2), toxina HT-2 (HT-2), 4,15-diacetoxiscirpenol (4,15-DAS). Exemplos de tricotecenos do tipo B incluem nivalenol (NIV), 4-desoxinivalenol (DON), 3- O-acetil DON (3-ADON) e 15-O-acetil DON (15-ADON). OAc = função acetil; OIsoval = função isovalerada (FOROUD; EUDES, 2009).

Os tricotecenos do tipo B apresentam a função carbonila no C-8 e em *Fusarium*, um grupo hidroxila no C-7 (MCCORMICK et al., 2011). Estes produzem DON e seus derivados acetilados, 3-ADON, 15-ADON, e nivalenol (NIV), (Figura 2) além de outras micotoxinas produzidas por *F. culmorum.* Já, a espécie Fmer, limita-se a produção de NIV e as espécies Faus e *F. cortaderiae* são capazes de produzir tanto NIV quanto 3-ADON (AOKI et al., 2012; ASTOLFI et al., 2011; CASTAÑARES et al., 2014). Destaca-se também a micotoxina zearalenona, que está associada a giberela mas não faz parte do grupo dos tricotecenos (FOROUD; EUDES, 2009).

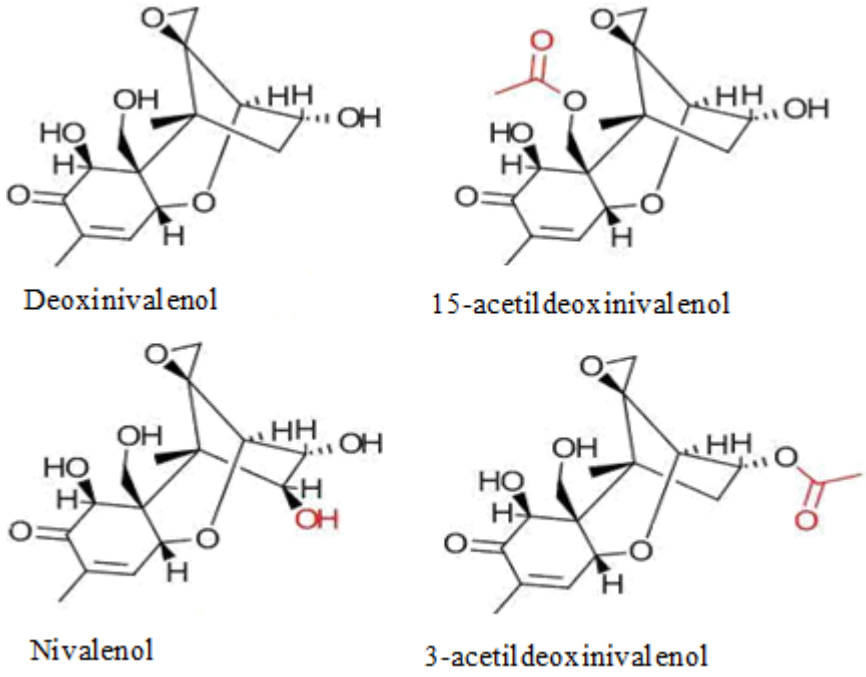

Figura 2. Estruturas químicas dos tricotecenos do Tipo B, as quais possuem um grupo carbonila no C-8. As diferenças entre os quatro compostos estão destacadas em vermelho. Adapatado de (VALVERDE-BOGANTES, 2017).

Na América do Norte, a FET ressurgiu nas últimas décadas, com surtos ocorrendo regularmente nas principais regiões de cultivo de cereais (MCDONALD; STUKENBROCK, 2016; MCMULLEN et al., 1997). Esta região tem sido historicamente dominada por uma única população geneticamente diversificada de patógenos que causam FET (denominados NA1) que tipicamente produzem micotoxinas que correspondem ao tricoteceno 15-ADON (ZELLER et al.; 2003). Entretanto, em algumas regiões ocorreu o aumento rápido, comparado com a população nativa, de uma população introduzida de Fgss (referida como NA2), altamente virulenta, que produzem 3-ADON (GALE et al., 2007; PURI; ZHONG, 2010).

Colaborando com esses relatos, estudos envolvendo fluxo gênico identificaram a ocorrência de um novo grupo de isolados que possuem o haplótipo 3-ADON no cluster do gene biossintético tricoteceno (TRI-cluster), associados a FET em trigo. Esse novo grupo é capaz de produzir um análogo tricoteceno distinto, 3αacetoxy, 7α , 15-di-hidroxi-12,13-epoxitricoteceno-9, também chamado de (NX-2) (KELLY et al., 2016; VARGA et al., 2015). O tricoteceno NX-2 de Fgss foi encontrado unicamente no norte dos EUA e no Sul do Canadá (KELLY et al., 2016; LIANG et al., 2014; LOFGREN et al., 2017). Pesquisadores sugerem que pressões de seleção específicas da população deixaram registros nos genomas de isolados

de Fgss resultando em genes específicos envolvidos na invasão do hospedeiro, antagonismo e adaptação ambiental (KELLY; WARD, 2018).

Também, o estudo das vias genéticas e bioquímicas em *Fusarium* são importantes para compreender como as micotoxinas são formadas. Em *Fusarium*, as enzimas responsáveis pela síntese dos tricotecenos são codificadas por genes localizados em três *loci*: o *locus TRI101* de gene único (gene *Tri101*), *locus TRI1-TRI16* de dois genes (genes *Tri1* e *Tri16*) e o cluster denominado *TRI* no qual estão localizados 12 genes (ALEXANDER et al., 2009). A primeira etapa na biossíntese de tricotecenos tipo B é a ciclização sesquiterpênica do farnesil difosfato ao trichodiene (Figura 3). Esta reação é catalisada pela enzima tricodieno-sintase, que é codificada pelo gene *Tri5* (ALEXANDER et al., 2009). Em seguida, a tricodieno tem quatro reações de oxigenação catalisadas pela monoxigenase do citocromo P450 codificada pelo gene *Tri4*. Esta enzima adiciona três oxigênios em C-2, C-3, C-11 e a epoxidação em C-12 / C-13 para formar isotricotriol (MCCORMICK et al., 2011). O isotricotriol então é convertido não enzimaticamente em isotrichodermol. Nesta etapa, o oxigênio na posição C-2 passa a ser o oxigênio do anel pirano e o grupo hidroxila em C-11 é perdido (MCCORMICK et al., 2011). Na sequência, o isotrichodermol passa por uma acetilação na hidroxila C-3 pela acetiltransferase que é codificada pelo gene *Tri101*, produzindo isotrichodermina (ALEXANDER et al., 2009). Na etapa seguinte, ocorre a adição de outro grupo hidroxila ao C-15 pelo citocromo P450 codificado pelo *Tri11*. Este grupo hidroxila é acetilado por uma acetiltransferase codificada pelo gene *Tri3* para formar calonectrina (ALEXANDER et al., 2009). Calonectrina é então alterada pela adição de grupos hidroxila nas posições C-7 e C-8 pelo produto do gene *Tri1*. O grupo hidroxila na posição C-8 é então convertido, produzindo 3,15-acetil deoxinivalenol (3,15-ADON) (MCCORMICK et al., 2011).

A partir da síntese do 3,15-ADON, a rota se ramifica e as linhagens produtoras de NIV, por uma reação catalisada pela monoxigenase do citocromo P450 codificada pelo gene *Tri13*, adiciona uma hidroxila na posição C-4 e o produto desta reação passará por modificações catalizadas pelas enzimas codificadas pelo genes *Tri7*, *Tri1* e *Tri8* para produção de NIV. Já, os isolados produtores de DON e seus derivados acetilados não possuem o gene *Tri13* funcional e são incapazes de adicionar um grupo hidroxila no C-4 (ALEXANDER et al., 2009). Nestes isolados ocorre diretamente da molécula 3,15-ADON a remoção de um grupo acetila, do C-3 ou C-15, dependendo da atividade da esterase codificada pelo gene *Tri8*, produzindo 3-ADON ou 15-ADON ou DON. Nos isolados produtores de 3-ADON o gene *Tri8* codifica uma desacetilase C-15, enquanto nas produtoras

de 15-ADON o gene *Tri8* codifica uma desacetilase C-3 (MCCORMICK et al., 2011). Ainda, vários outros genes estão envolvidos no processos pré e pós síntese dos tricotecenos, dentre estes merece destaque o gene *Tri12*, que codifica para uma bomba de fluxo tricoteceno (ALEXANDER et al., 2009) sendo importante na proteção do próprio fungo de sua micotoxina, e também os genes *Tri6* e *Tri10* que codificam fatores de transcrição que atuam como reguladores dos demais genes da biossíntese de tricotecenos (DEAN et al., 2012; GOSWAMI; KISTLER, 2004).

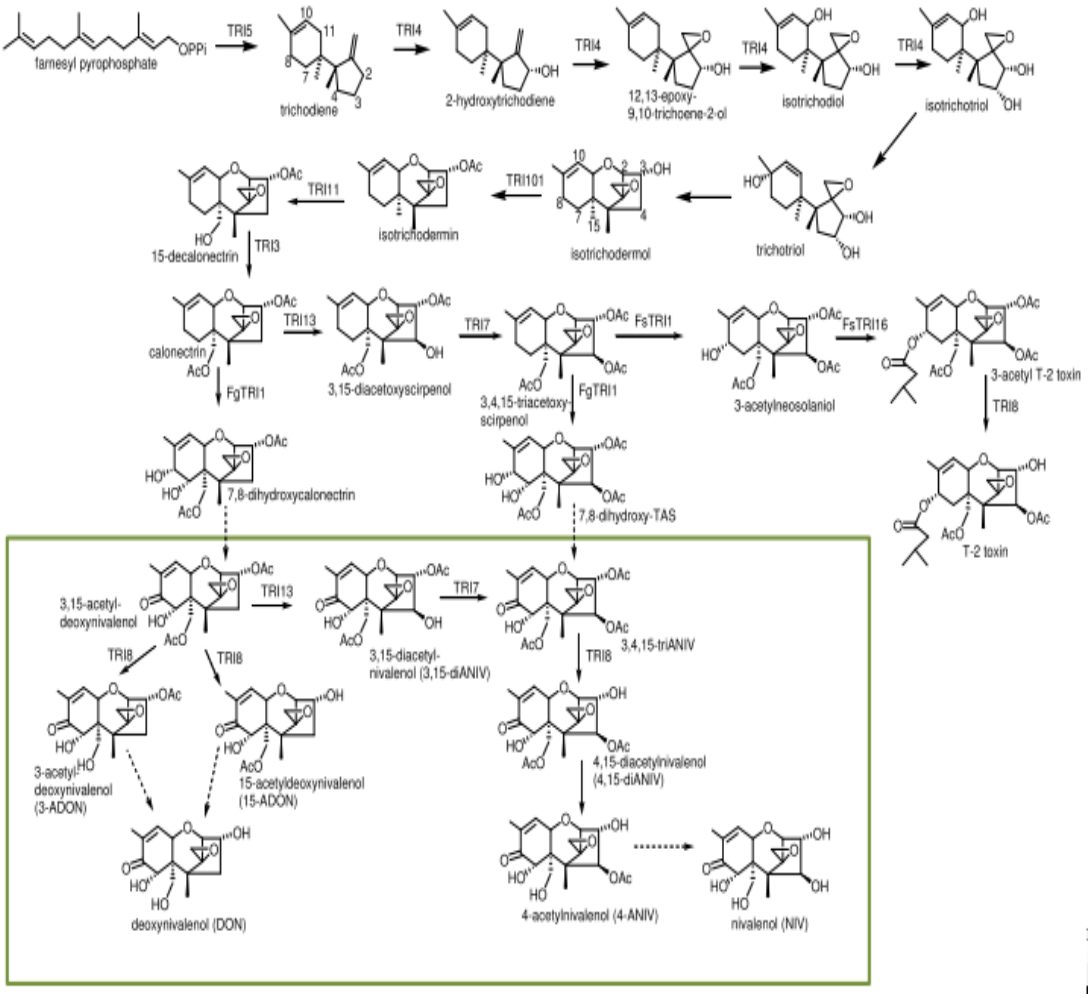

Figura 3. Representação da rota de síntese de tricotecenos. A parte contornada em verde representa os tipos de tricotecenos (adpatado de MCCORMICK et al., 2011).

Os tricotecenos são reconhecidos por causarem múltiplos efeitos inibitórios nas células eucarióticas, entre eles a inibição da síntese de proteínas, DNA e RNA, inibição da função mitocondrial, impacto na divisão celular e também na membrana (ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005). Os mesmos autores citam que nas células animais induzem apoptose ou

morte celular programada. Estes efeitos provavelmente resultam da habilidade das micotoxinas em inibir a síntese de proteínas (ALEXANDER et al., 2009).

Os tricotecenos são descritos também como possíveis facilitadores da infecção do fungo na planta (PIETA; TIBOLA, 2011). A biossíntese de DON em Fgss mostra-se mais abundante durante a infecção do que durante o crescimento da cultura, isso deve-se aos sinais emitidos pela planta, os quais podem ser importantes no estímulo da biossíntese de DON (KAZAN et al., 2012).

A micotoxina DON é a mais prevalente micotoxina associada a FET, e atua como fator de virulência dos fungos que produzem essa micotoxina, sendo a responsável pela colonização dos tecidos da espiga e expansão do tecido necrótico. DON possui mais influência na expansão da lesão do que na infecção inicial (JANSEN et al., 2005).

Apesar de aparentemente DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV estarem envolvidos no processo de infecção, existem diferenças entre eles. Isolados 3-ADON demonstraram mais agressividade na fase patogênica e produziram mais DON em relação a 15-ADON em plantas de trigo (PURI; ZHONG, 2010). Colaborando com essa afirmação, a análise da diversidade de fungos envolvidos a FET evidenciou que o tricoteceno de Fgss 3-ADON é dominante na América do Norte e na região oeste do Canadá e que a ocorrência de 3-ADON aumentou mais de 14 vezes no período de seis anos (1998 a 2004) (WARD et al., 2008). Os autores defendem que isolados de populações de 3-ADON são mais toxigênicos e potencialmente mais vigorosos que isolados de populações de 15-ADON. Suas pesquisas mostraram que 3-ADON produziu significativamente ($P < 0,05$) mais tricotecenos e maiores taxas de fecundidade e crescimento que 15-ADON. A produção do tricoteceno 3-ADON versus 15-ADON evidencia uma relevante diferença genotípica dentro e entre espécies de *Fusarium*. O gene *Tri8* das linhagens 3-ADON catalisam a desacetilação em C-15 de 3,15-diADON para produzir 3-ADON, enquanto *Tri8* da linhagem 15-ADON catalisa a desacetilação em C-3 de 3,15-diADON para produzir 15-ADON. As diferenças na sequência do *Locus TRI8* desempenham um papel determinante na linhagem de *Fusarium,* produzindo 3-ADON ou 15-ADON (ALEXANDER et al., 2011). Ocorrências de quantidades irrisórias de 15-ADON em um quimiotipo produtor de 3-ADON é devido à acetilação de *Tri3* de DON na posição C-15 (TOKAI et al., 2008).

Em estudo utilizando PCR quantitativo em tempo real para quantificar a expressão de nove genes envolvidos na biossíntese dos tricotecenos em diferentes isolados de Fgss (3-ADON, 15-ADON e NIV) foi demonstrado que a expressão de todos os genes iniciou dois

dias após a inoculação do fungo (dpi) e atingiu o pico de três a quatro dpi e reduziu progressivamente até sete dpi (AMARASINGHE; FERNANDO, 2016). Os mesmos autores defendem que o estímulo precoce de genes envolvidos na síntese de tricotecenos demonstra a ativação da biossíntese de DON e NIV nos estágios iniciais da infecção. A comparação da expressão gênica entre os três quimiotipos demonstrou que a expressão relativa dos genes *Tri* foi maior nos isolados produtores de 3-ADON em relação as isolados de 15-ADON e NIV. Estes resultados indicam que níveis relativamente mais altos de expressão gênica podem colaborar para níveis mais altos de DON produzidos por isolados 3-ADON em grãos de cereais infectados (AMARASINGHE; FERNANDO, 2016).

Estudos recentes fazem referência as micotoxinas mascaradas. As micotoxinas quando mantidas em suas formas inalteradas são denominadas de "compostos de origem". As micotoxinas modificadas ou mascaradas, são metabolitos da micotoxina original encontradas em plantas, e são resultantes de reações de defesa da planta após a infecção fúngica ou produzidas pelo próprio fungo, por conjugação com compostos polares. Os compostos polares podem ser glicose, glicose modificada, ou outros grupos, como sulfato e glutationa. As micotoxinas envolvidas a *Fusarium* são as micotoxinas mascaradas mais prevalentes, e há evidências de que DON3Glc não é tóxico por apresentar biodisponibilidade limitada no intestino devido à sua ligação covalente. Supõe-se que as micotoxinas mascaradas são consideravelmente menos tóxicas que seus compostos de origem, contudo apenas DON3Glc tenha sido estudada minuciosamente (BERTHILLER et al., 2016; GRATZ, 2017). As micotoxinas mascaradas podem ser liberadas, transformadas e absorvidas no trato gastrointestinal através de hidrólise *in vivo* após ingestão oral, essencialmente como composto original (BROEKAERT et al., 2015; EFSA CONTAM Panel, 2014).

4.5. Importância dos tricotecenos para a segurança alimentar

Com o constante crescimento mundial da população, há também o aumento da busca por alimentos seguros. Nas últimas décadas foi observado o acréscimo de grãos contaminados por micotoxinas, o que pode estar relacionado as mudanças climáticas e agronômicas, mais favoráveis ao crescimento de fungos. Estas micotoxinas podem ser encontradas em níveis considerados inseguros em grãos destinados ao consumo humano ou animal (SPOLTI; PONTE, 2013). Vários patógenos de plantas são produtores de tricotecenos e a ingestão de alimentos e rações contaminados com micotoxinas podem levar à toxicose em humanos e animais (STACK; MCMULLEN, 2011; WEGULO, 2012). A contaminação globalizada de

alimentos e rações com micotoxinas, incluindo as do grupo dos tricotecenos é um problema que requer atenção, por ser de importância econômica e social. Existem muitas pesquisas e relatos que avaliam as perdas econômicas devidas a FET e seus impactos, como a necessidade de estabelecer normativas com limites para micotoxinas em alimentos, e também, alternativas para redução da absorção pelos animais (ZAIN et al., 2012). O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas causam em humanos diarréia, dores abdominais, mal estar e indisposição. Em animais, além de causar os mesmos sintomas citados em humanos, comprovou-se que embora em baixos níveis, existe uma taxa de transferência de residual de micotoxinas nos produtos derivados dos animais, como leite, carne e ovos (SOBROVA et al., 2010). Estudos visando conhecer a toxicidade de NIV foram realizados em animais, *in vitro* e *in vivo*, demonstrando imunotoxicidade, hematotoxicidade / mielotoxicidade e toxicidade reprodutiva (EFSA-CONTAM, 2013).

Os tricotecenos são capazes de produzir alguns efeitos comuns às células de plantas e animais, como a inibição de proteínas, síntese de DNA e RNA, redução das funções mitocondriais, efeitos de divisão celular e alterações na membrana. Em plantas, os efeitos fitotóxicos do DON podem causar atraso do crescimento, inibição de plântulas e regeneração de plantas verdes. Em animais, os tricotecenos induzem a apoptose, uma forma de morte celular programada por via mitocondrial e mecanismos não mitocondriais, e também, outros efeitos como atraso no crescimento, restrita função ovariana e distúrbios reprodutivos, imunocomprometimento, recusa alimentar e vômitos (ROCHA et al., 2005). As diversas propriedades toxicológicas do DON, NIV e de seus derivados acetilados 3-ADON e 15-ADON requerem acompanhamento rigoroso dessas micotoxinas e de seus produtores. Por exemplo, alimentos oriundos de regiões de plantios com ocorrência de FET podem estar contaminados com micotoxinas do grupo dos tricotecenos, principalmente DON e NIV (VAN DER LEE et al., 2015).

Em estudo realizado na União Européia com amostras de alimentos destinados a adultos, crianças e bebês na faixa de 8 a 12 meses de idade, onde a dieta continha quantidade significativa de alimentos à base de cereais, foi observado que DON e NIV estavam presentes em 57% e 16% das amostras, respectivamente. Os resultados também mostraram que para DON, as ingestões da população de adultos estavam abaixo do IDT- índice diário tolerável (1 µg/kg de peso corporal) (PRONK et al., 2002). Porém, para grupos vulneráveis como bebês e crianças, a ingestão esteve próxima ou excedeu o IDT. Para NIV, todas as ingestões dietéticas mostraram-se abaixo do índice, ou seja 0,7 µg/kg de peso corporal (PRONK et al., 2002;

SCHOTHORST et al., 2004). Outro fator importante dos tricotecenos é que os mesmos não apresentam alteração com o calor, ou seja, são termoestáveis e não se degradam durante o processamento de alimentos ou esterilização. São estáveis em meios ácidos e neutros e como consequência dessas características, não são decompostos pela água, ou hidrolisados no estômago após a ingestão (ERIKSEN; PETTERSSON, 2004).

4.6. Limites de micotoxinas em alimentos e legislação

O nível de toxicidade em alimentos produzidos a partir de matérias primas que possam conter residuais de micotoxinas desencadeou a necessidade de muitos países a definirem limites de micotoxinas em alimentos e rações animais (BERNARDI, et al., 2018). Quem estabelece as normas internacionais na área de alimentos, incluindo padrões, diretrizes e guias sobre boas práticas e de avaliação de segurança e eficácia é o Codex Alimentarius. O Codex foi criado em 1963, é um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS). Entre outros, possui como objetivos a proteção à saúde dos consumidores e a garantia de práticas comerciais justas entre os países. O Codex Alimentarius possui 187 países membros e a União Europeia, além de 238 observadores (57 organizações intergovernamentais, 165 organizações não governamentais e 16 organizações das Nações Unidas) (ANVISA, 2016).

Ligados ao Codex, existem diversos comitês especialistas, entre eles citam-se o Comitê Conjunto de Aditivos Alimentares (Joint Expert Committee on Food Additives-JECFA), o Conselho Científico da Organização Mundial da Saúde (WHO) e a FAO, todos ligados à Organização das Nações Unidas (ONU), onde exercem papel fundamental nas decisões de gerenciamento de riscos relacionados à contaminação com micotoxinas em alimentos no mundo (PEREIRA et al., 2014). O Brasil é membro do Codex Alimentarius desde 1968 e utiliza as publicações do Comitê Conjunto de Aditivos Alimentares, como referência na elaboração de regulamentos técnicos na área de alimentos (ANVISA, 2018).

A legislação específica para micotoxinas no Brasil é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 138 de 8 de fevereiro de 2017 da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitátia, a qual determina limites de tolerância máxima (LTM) para DON em alimentos (ANVISA, 2017). Os LTM estabelecidos de DON para trigo integral e farelo de trigo iniciou em 2011 com 2.000 µg/kg e para farinha de trigo 1.750 µg/kg, com reduções gradativas até o ano 2019, sendo menores os limites para produtos destinados à alimentação infantil (Tabela 2) (ANVISA, 2017; BRASIL, 2011).

O trigo corresponde em média 30% da produção global de grãos, destinada à produção de produtos alimentícios para humanos e animais. As micotoxinas, são imperceptíveis no produto final, sendo uma desafio para a segurança de alimentos das cadeias produtivas (BERNARDI, 2018).

Tabela 2. Limites máximos tolerados de micotoxinas para alimentos à base de trigo no Brasil de acordo com as Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa nº 07/11 e 138/17. µg/kg = micrograma por kilo.

Micotoxinas	**Alimentos**	**LMT (µg/Kg)l**			
		2011	**2012**	**2017**	**2019**
Deoxinivalenol (DON)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	200	200	200	200
	Trigo em grãos para posterior processamento	-	-	3.000	3.000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral e farelo de trigo	-	2.000	1.250	1.000
	Produtos derivados de trigo: farinha, massa, crackers, biscoitos e pão	-	1.750	1.000	750
Zearalenona (ZEA)	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil	20	20	20	20
	Trigo em grãos para posterior processamento	-	-	400	400
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral e farelo de trigo	-	400	200	200
	Produtos derivados de trigo: farinha, massa, crackers, biscoitos e pão	-	200	100	100

4.7. Estratégias para monitoramento e identificação de genótipos tricotecenos de espécies do CFg

A identificação de fungos filamentosos é fundamentada por uma abordagem polifásica, incluindo aspectos morfológicos, biológicos e filogenéticos, incluindo a caracterização da produção de metabólitos secundários como parte da identificação fenotípica. Porém, esses métodos demandam tempo, são trabalhosos e muitas vezes apresentam resultados que podem deixar dúvidas, ou induzir a diagnósticos e interpretações errôneas dos resultados (TKINS; LARK, 2004). A identificação de espécies do gênero *Fusarium* é fundamental para estimar o potencial risco toxigênico dos fungos desta espécie, e para auxiliar na identificação é necessário ferramentas precisas e complementares que permitam um diagnóstico específico, rápido e confiável (SAMPIETRO et al., 2010).

A PCR substituiu a complexidade e o tempo despendido em análises microbiológicas, por amplificação de marcadores genômicos específicos e, têm sido amplamente utilizada para

genotipar isolados do CFg, sendo possível identificar a presença de alelos de genes relacionados à síntese das micotoxinas (O'DONNELL et al., 2008; SAIKI; GELFAND; STOFFEL, 2016).

Os marcadores de DNA são utilizados para analisar variações genotípicas (polimorfismos) dentro da sequência nucleotídica, entre elas inserções, deleções, translocações, duplicações e mutações de ponto (MONDINI et al., 2009). De acordo com os mesmos autores, esta ferramenta oferece inúmeras vantagens às alternativas convencionais baseadas no fenótipo, pois são estáveis e detectáveis em todos os tecidos, independente da fase de desenvolvimento e do ambiente onde os indivíduos estão inseridos. Também, segundo os autores, os marcadores moleculares podem ser encontrados em diversos locais do genoma (íntrons, exons e regiões reguladoras), são geralmente neutros, e não são afetados pelo ambiente.

Uma das principais vantagens dos marcadores de DNA é a eficácia e redução do tempo para identificação de uma espécie ou para a estimação da diversidade genética entre os indivíduos estudados (AGARWAL et al., 2008). Dentre os marcadores moleculares disponíveis estão os baseadas em PCR, como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat)* e também os baseados na hibridização, como o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (AGARWAL et al., 2008). Estes marcadores têm sido utilizados para estudo da diversidade genética de espécies de fungos. Já, para a identificação das espécies do CFg ou de seu genótipo, foram desenvolvidos marcadores PCR-específicos (WARD et al., 2008).

Os ensaios utilizando *primers* específicos para genótipos tricotecenos, foram desenvolvidos por Ward et al. (2002), e a partir desta descoberta, vários trabalhos utilizaram esses *primers* para a genotipagem de isolados do CFg. Como por exemplo, Scoz et al. (2009) avaliaram 82 isolados fúngicos obtidos a partir de amostras de grãos de trigo afetados por FET, coletados em 20 locais no Sul do Brasil. O estudo concluiu que a frequência destes genótipos de tricotecenos variam dentro e entre campos de trigo e localizações geográficas no Sul do Brasil. Também, Angelotti et al. (2005) utilizaram a técnica da PCR para identificar espécies de CFg associados a FET de diversas regiões produtoras de trigo no Sul do Brasil, comprovando que todos os isolados utilizados no estudo pertenciam a espécie *F. graminearum.*

Feksa et al. (2016) avaliaram 860 isolados oriundos de espigas de trigo coletados com sintomas de FET em campos comerciais no Sul do Paraná, no período de 2011 a 2014. Estes isolados foram examinados para o genótipo tricoteceno B, baseado na PCR na amplificação de porções do cluster gênico *Tri3* e *Tri12*. O 15-ADON foi o genótipo dominante, com 67,8%, seguido por NIV, com 31,1% e 3-ADON com 6,7%.

Uma adaptação ao PCR multiplex foi sugerida por Ward et al. (2008), onde utilizaram a técnica de genotipagem multilocus (MLGT-multilocus genotyping), para determinar simultâneamente a identidade das espécies do CFg e a diversidade de quimiotipos tricotecenos. Esta técnica faz uso de sondas específicas, as quais são submetidas a extensão de *primers* alelo-específico e utilizando a técnica Luminex, o que possibilita a hibridização e detecção de sondas obtidas de uma reação de multiplex-PCR (WARD et al., 2008). A técnica de genotipagem multilocus permite detectar até 100 alvos distintos em uma única amostra (BARCO et al., 2010). Esta técnica foi usada em estudo com 492 isolados pertencentes ao CFg, os quais foram coletados de grãos de trigo com sintomas de FET no Canadá entre 1984 e 2004. Entre os isolados analisados, 27,4% possuíam o genótipo 3-ADON, enquanto os demais isolados apresentaram o genótipo 15-ADON, mais frequente no norte americano (WARD et al., 2008). Os mesmos autores também concluíram que o genótipo NIV não foi observado entre os isolados estudados. A MLGT é uma ferramenta importante para uso na investigação de patógenos, detecção de surtos, avaliação de risco, análises populacionais e investigações epidemiológicas (DUCEY et al., 2006).

4.8. Diversidade genética

A diversidade genética explica quão variáveis são os genótipos e alelos em uma população, por meio de vários aspectos morfológicos, fisiológicos, moleculares e de comportamento entre os indivíduos e as populações. A diversidade genética é a diferença genética dentro e entre as populações, e entre as espécies. Para ocorrer evolução adaptativa das espécies é necessário haver diversidade genética, pois a seleção natural não pode ocorrer sem que haja variáveis a serem selecionadas (FRANKHAM et al., 2002; JÍMENEZ; COLLADA, 2000). Esta situação também ocorre em espécies patogênicas como as do CFg. Neste sentido, a variabilidade genética é a base para a explicação dos diferentes comportamentos das espécies, ou mesmo de isolados da mesma espécie, em diferentes regiões do mundo.

Para estudos de diversidade genética, os marcadores moleculares do tipo ISSR (inter-simple sequence repeat) revelam-se como universais, pois possibilitam postular as diferenças genéticas (polimorfismos) inter e intra populações, e até mesmo entre espécies, com rapidez, economia e confiabilidade (BRANCHARD; BORNET, 2001; CONSOLO et al., 2015; NYBOM, 2004; ORTEGA et al., 2016).

Os marcadores ISSR são baseados na amplificação de regiões de 100 a 3000 pb entre regiões microssatélites (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004). Os *primers* são desenvolvidos a partir das regiões microssatélites, e apresentam de 16-25 pb, isso permite uma alta temperatura de pareamento (45-60ºC) levando a uma maior estringência (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002) e portanto, aumentando a confiabilidade dos resultados. A amplificação dos fragmentos ocorre quando há duas regiões repetidas microssatélites idênticas, orientadas em sentidos opostos a uma distância máxima de 3000 pb (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

O marcador ISSR apresenta a vantagem de analisar múltiplos *loci* com uma única reação de PCR, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma (ZIETKIEWICZ et al., 1994; WANG et al., 2011). O marcador ainda é bastante informativo devido aos altos índices de polimorfismo produzidos (RAKOCZY-TROJANOWSKA; BOLIBOK, 2004).

A técnica de ISSR é simples, fácil, eficiente, além de possuir alta reprodutibilidade. Combina inúmeras vantagens dos microssatélites (SSRs) e AFLP com a universalidade do RAPD, entretanto, deve-se destacar algumas limitações da técnica, como o caráter dominante do marcador (REDDY et al., 2002). Por se tratar de um marcador dominante, os alelos são revelados pela presença ou ausência de bandas, não sendo possível detectar se o genótipo é homozigoto ou heterozigoto, um fator que leva a considerar os marcadores co-dominantes superiores a esse (FALEIRO, 2007).

Estudos de genética de populações apontam que esse marcador tende a produzir estimativas ligeiramente mais altas de variação dentro de cada população (NYBOM, 2004). Contudo, devido ao alto polimorfismo esse marcador é destacado como excelente ferramenta para investigar a variação genética dentro e entre populações, para estudos de filogenia, marcação de genes, mapeamento do genoma e biologia evolutiva (REDDY et al., 2002). O conhecimento do perfil genético de populações patogênicas, como o tipo de micotoxina que o fungo produz, é fundamental para conhecer o potencial risco regional de micotoxinas na cadeia alimentar (ASTOLFI et al., 2011).

Em fungos, marcadores ISSR têm sido amplamente utilizados para estudos de diversidade genética. Na Argentina, Consolo et al. (2015) avaliaram a variabilidade genética de uma coleção de isolados de Fgss obtidos de grãos de trigo infectados de diferentes províncias da região dos pampas argentinos, importante região tritícola daquele país. A técnica de ISSR permitiu reproduzir e informar o percentual de polimorfismo entre os isolados avaliados, embora uma baixa variabilidade genotípica tenha sido encontrada na população (26%). O estudo também mostrou uma associação parcial do percentual de polimorfismo entre os isolados com a origem geográfica dos mesmos. Os resultados desta pesquisa corroboram com outros estudos os quais relataram níveis semelhantes de diversidade genética e proliferação assexuada em populações de Fgss do leste da China, Canadá e Hungria (GALE et al., 2002; WANG et al., 2011).

O trigo é uma importante cultura para a população mundial e brasileira. O Paraná é o maior produtor nacional do grão e a FET é uma doença importante na triticultura paranaense uma vez que, além da possibilidade de reduzir a produtividade, pode contaminar os grãos com micotoxinas tricotecenos do tipo B inviabilizando o uso para alimentação humana e animal. Neste sentido, o conhecimento dos quimiotipos ocorrentes no estado e o conhecimento da variabilidade genética das espécies produtoras destes quimiotipos é um fator importante a ser levado em consideração no manejo da FET no estado.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Caracterização molecular

5.1.1. Obtenção dos isolados

Neste estudo foram utilizados 56 isolados de *Fusarium* spp. coletados entre os anos de 2012 e 2016 em diversas regiões produtoras de trigo do estado do Paraná pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá- UEM (Tabela 3). De cada isolado foram obtidos culturas monospóricas e identificados morfologicamente de acordo com Nelson; Toussoun; Marasas (1983).

Seguindo o que preconiza a comunidade científica, este trabalho utiliza a nova nomenclatura da área de fitopatologia. Portanto, quando houver referência a doença causada pelos fungos do CFg, anteriormente conhecido como giberela, será referenciado como fusariose da espiga do trigo (FET).

Tabela 3. Relação dos isolados das prováveis espécies *Fusarium meridionale* (Fmer), *F. graminearum* (Fgra) e *F. austroamericanum* (Faus) utilizados neste estudo com provável genótipo e local de coleta. A identificação e genotipagem para determinação da provável espécie e genótipo foi realizada no Laboratório de Fitopatologia de Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Isolado	Provável espécie	Provável genótipo	Origem
1	Fmer	NIV	Guarapuava
2	Fmer	NIV	Goioxim
3	Fmer	NIV	Pinhão
4	Fmer	NIV	Goixim
5	Fmer	NIV	Guarapuava
6	Fmer	NIV	Reserva do Iguaçú
7	Fmer	NIV	Roncador
8	Fmer	NIV	Guarapuava
9	Fmer	NIV	Reserva do Iguaçu
10	Fmer	NIV	Guarapuava
11	Fmer	NIV	Foz do Jordão
12	Fmer	NIV	Guarapuava
13	Fmer	NIV	Goioxim
14	Fmer	NIV	Reserva do Iguaçu
15	Fmer	NIV	Goioxim
16	Fmer	NIV	Goioxim
17	Fmer	NIV	Goioxim
18	Fmer	NIV	Pinhão
19	Fmer	NIV	Guarapuava
20	Fmer	NIV	Pinhão
21	Fgra	15-ADON	Roncador

22	Fgra	15-ADON	Turvo
23	Fgra	15-ADON	Turvo
24	Fgra	15-ADON	Turvo
25	Fgra	15-ADON	Guarapuava
26	Fmer	15-ADON	Pinhão
27	Fgra	15-ADON	Roncador
28	Fgra	15-ADON	Turvo
29	Fgra	15-ADON	Turvo
30	Fgra	15-ADON	Roncador
31	Fgra	15-ADON	Guarapuava
32	Fgra	15-ADON	Pinhão
33	Fgra	15-ADON	Pinhão
34	Fgra	15-ADON	Guarapuava
35	Fgra	15-ADON	Roncador
36	Fgra	15-ADON	Pinhão
37	Fgra	15-ADON	Turvo
38	Fgra	15-ADON	Pinhão
39	Fgra	15-ADON	Desconhecida
40	Fgra	15-ADON	Desconhecida
41	Faus	3-ADON	Candoi
42	Faus	3-ADON	Turvo
43	Faus	3-ADON	Turvo
44	Faus	3-ADON	Reserva do Iguaçú
45	Faus	3-ADON	Reserva do Iguaçu
46	Faus	3-ADON	Candoi
47	Faus	3-ADON	Guarapuava
48	Faus	3-ADON	Teixeira Soares
49	Faus	3-ADON	Pinhão
50	Faus	3-ADON	Pinhão
51	Faus	3-ADON	Guarapuava
52	Faus	3-ADON	Guarapuava
53	Faus	3-ADON	Guarapuava
54	Faus	3-ADON	Pinhão
55	Faus	3-ADON	Pinhão
56	Faus	3-ADON	Pinhão

O isolamento dos fungos foi realizado a partir de espigas de trigo sintomáticas coletadas em plantações comerciais do cereal. Os grãos que apresentavam sintomas de FET foram desinfetados na superfície com hipoclorito de sódio a 1% durante 2 minutos, enxaguados duas vezes com água destilada estéril e mantidos em três camadas de papel absorvente úmido.

Antes do processamento, pequenos segmentos dos grãos foram desinfetados na superfície em etanol a 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 0,2% por 30 segundos, depois, lavados três vezes em água deionizada estéril. Sob o microscópio, um único peritécio foi removido do segmento do grão e transferido em placas com BDA – batata, dextrose e ágar

(100 g de batata, 10 g de dextrose e 7,5g de ágar por litro de água) (NELSON et al., 1983). Após sete dias de crescimento, em sala climatizada (25 ºC ± 2), a massa de esporos foi coletada com alça de inoculação e aplicada em nova placa de petri com meio BDA. Após obtenção dos isolados, estes foram previamente genotipados utilizando um conjunto de *primers* desenvolvidos para os genes *Tri3* e *Tri12* por Ward et al. (2002). Após a genotipagem, 20 isolados de cada genótipo, 15-ADON e NIV e 16 isolados identificados como sendo do genótipo 3-ADON, foram enviados ao Laboratório Central da Cooperativa Agrária, onde foram multiplicados para a obtenção do material para este estudo. A genotipagem foi repetida neste estudo para confirmação do genótipo de cada isolado.

5.1.2. Repicagem de fungos fitopatogênicos e condições de armazenamento

Os isolados foram mantidos por meio de repiques periódicos em meio BDA quantas vezes foram necessárias o seu uso para os experimentos (Figura 4 A e 4 B).

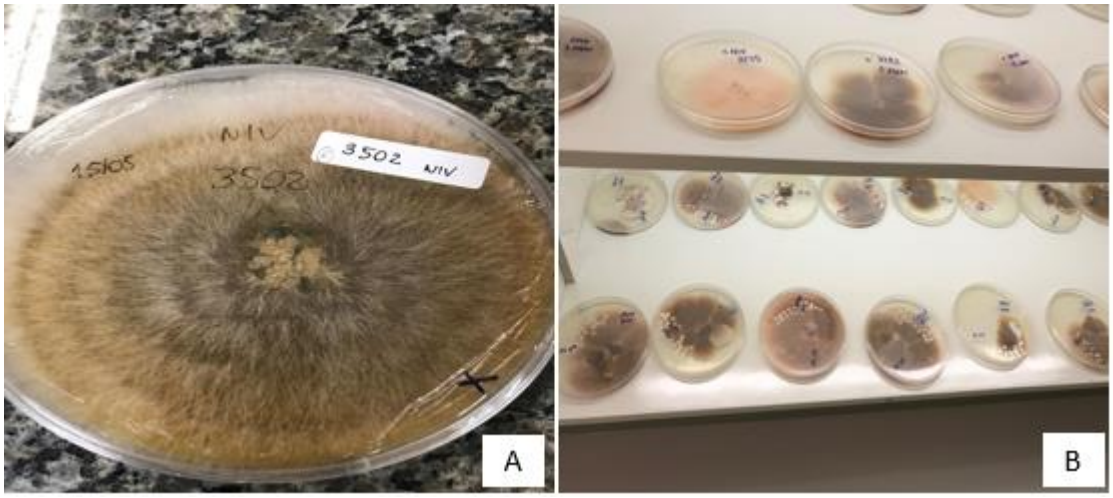

Figura 4. Preparação dos isolados para armazenamento. A) Cultura fúngica crescida em meio BDA. B) Sala de incubação com parte das placas onde foram crescidos os isolados avaliados neste estudo.

Para preservação dos isolados, após 7 dias de crescimento em meio BDA e sala climatizada (25 ºC ± 2), 5 a 6 discos de micélios do fungo medindo 7 mm foram transferidos para um microtubo, previamente esterilizado. Posteriormente os tubos foram preenchidos com água destilada esterilizada e mantidos a 10 °C até serem utilizados (CASTELANI, 1995) (Figura 5A, 5B, 5C). Os esporos/micélios de *Fusarium* spp., quando armazenados em água, permanecem viáveis por até 10 anos (DHINGRA; SINCLAIR, 1995; FIGUEIREDO, 1967).

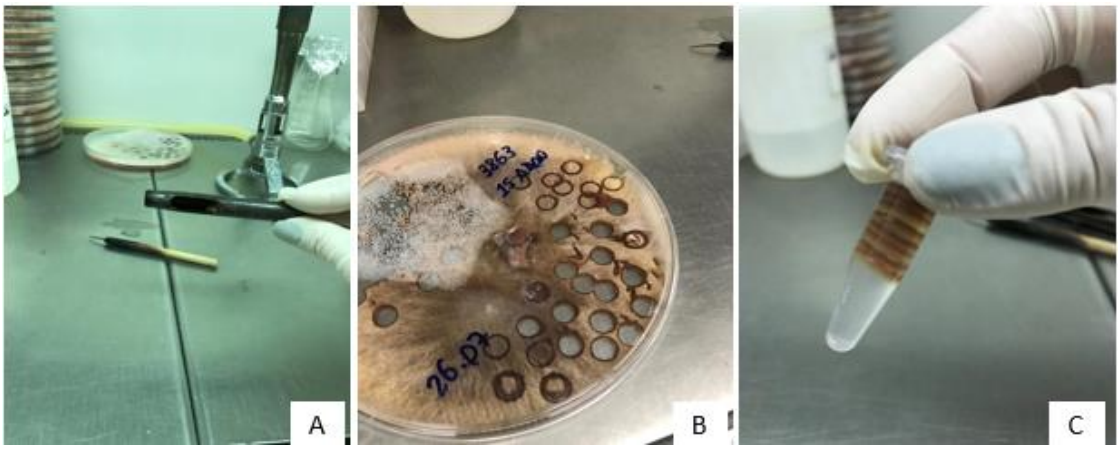

Figura 5. Etapas realizadas para manutenção dos isolados de *Fusarium* spp. A) Furador utilizado para cortar os discos. B) Placa após a retirada dos discos para armazenamento. C) Tubo com discos de meio/micélio.

5.1.3. Obtenção de material para extração de DNA

Para extração do DNA, um disco do material armazenado foi plaqueado em meio BDA mantido por sete dias em sala climatizada (25 ºC ± 2). Após esse período o micélio crescido nas placas (4 repetições para cada isolado) foi raspado com alça de platina e tritirado com auxílio de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino (Figura 6A e 6B). A massa micelial após triturada foi armazenado em microtubo e mantido em refrigerador a -20 ºC até o momento da extração do DNA.

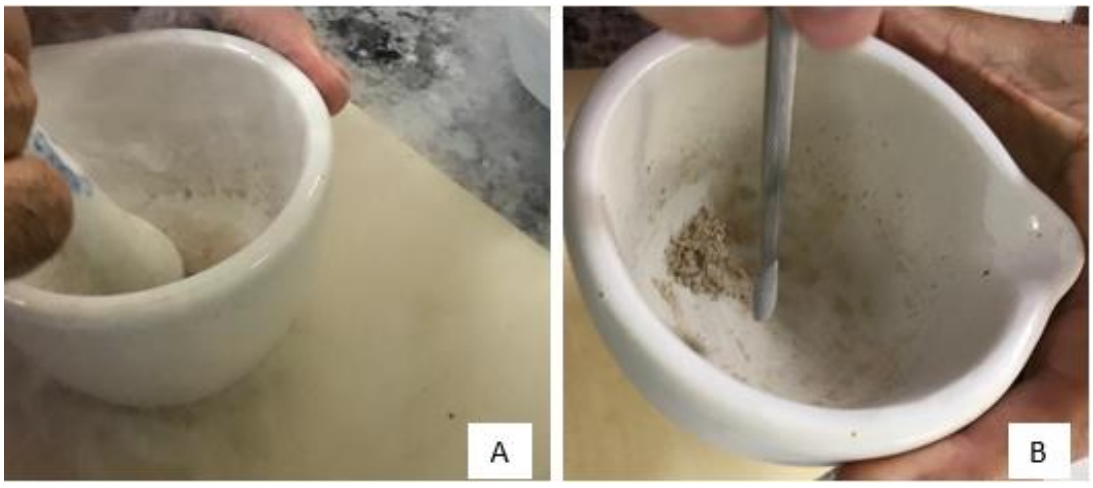

Figura 6. Etapas para obtenção de material para extração do DNA dos isolados de *Fusarium* spp. A) Esmagamento do tecido fúngico. B) Material esmagado utilizado na extração do DNA.

5.1.4. Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo proposto por Doyle; Doyle (1987). Para cada isolado, em um microtubo contendo 100 mg da massa micelial foram adicionadas em 1 mL de tampão de extração (20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 0,4% β-mercaptoethanol); os microtubos foram mantidos em banho maria a 65 °C por 45 minutos. O DNA foi separado da solução por precipitação, utilizando clorofórmio:alcoolisoamílico (24:1) seguido de centrifugação. Para obter material genético de alto grau de pureza, sucessivas lavagens com etanol foram realizadas. Após a extração, o DNA foi ressuspenso em TE (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA), tratado com RNAse a 37 °C por 1 hora e armazenado a -20 °C até o uso. A quantificação do DNA e confirmação da sua integridade foi por eletroforese em gel de agarose 0,9%. Para determinação da quantidade de DNA, após eletroforese cada amostra foi comparada ao padrão de massa molecular do DNA do fago *Lambda*, cuja quantidade de DNA já era conhecida.

5.1.5. Genotipagem dos isolados

Para a genotipagem dos isolados foram utilizados um conjunto de primers desenvolvidos para os genes *Tri3* e *Tri12* (WARD et al., 2002) (Tabela 4).

Tabela 4. Relação dos primers utilizados para a genotipagem dos isolados de *Fusarium* spp. avaliados neste estudo. Dados obtidos de Ward et al., (2002).

Primer	**Sequência (5'- 3')**	**Gene**	**Genótipo**	**Tamanho do fragamento esperado**
3CON **3NA** **3D15A** **3D3A**	TGGCAAAGACTGGTTCAC GTGCACAGAATATACGAGC ACTGACCCAAGCTGCCATC CGCATTGGCTAACACATG	*Tri3*	3-ADON 15-ADON NIV	243 610 840
12CON **12NF** **12-15F** **12-3F**	CATGAGCATGGTGATGTC TCTCCTCGTTGTATCTGG TACAGCGGTCGCAACTTC CTTTGGCAAGCCCGTGCA	*Tri12*	3-ADON 15-ADON NIV	410 670 840

Estas combinações de *primers* produzem um padrão de bandas espécie-específico dentro do CFg. Os primers 3CON, 3NA, 3D15A e 3D3A desenvolvidos para o gene *Tri3* , amplificam um fragmento de 243, 610 e 840 pb em *F. austroamericanum, F. graminearum*, e *F. meridionale,* respectivamente. Já os *primers* 12CON, 12NF, 12-15F e 12-3F,

desenvolvidos para o gene *Tri12*, amplificam um frgamento de 410, 670 e 840 pb em *F. austroamericanum, F. graminearum,* e *F. meridionale* respectivamente. Paralelamente a genotipagem realizada neste estudo, o DNA destes isolados foi enviado pelo Laboratório de Fitopatologia da UEM à Universidade de Illinois, USA, para identificação molecular das espécies também pela técnica Luminex.

As reações de amplificação do DNA de cada genótipo via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 μL contendo: 20 ng de DNA, 0,2 μM de *primer*, 200 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 2 U de Taq DNA Polimerase, 1X de tampão para PCR e água ultrapura para completar o volume. Para a amplificação o termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 94 ºC por 10 minutos, seguida de dois ciclos de 94 ºC por 30 s, 59 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Após estes dois ciclos, a temperatura de anelamento foi decaindo a cada dois ciclos para 58, 56, 54, 53, 52 e 51 °C. Em seguida foram realizados mais 21 ciclos com temperatura de anelamento de 50 °C. Após completar os ciclos, um passo final de 72 °C por 10 minutos foi adicionado para extensão final dos fragmentos. Os produtos de amplificação foram resolvidos por eletroforese, em corrente constante de 110 V por duas horas, em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,5 $\mu g\ mL^{-1}$). Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Ladder 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e documentado com fotodocumentador digital.

5.1.6. Análise dos géis

De acordo com Ward et al. (2002), quando utilizados os primers mencionados na Tabela 4, para o gene *Tri3* e genótipos 3-ADON, 15-ADON e NIV, são observadas no gel de agarose as bandas com as alturas de 243, 610 e 840 pb (pares de base) respectivamente. E para o gene *Tri12* os genótipos 3-ADON, 15-ADON e NIV, são observadas no gel bandas na altura de 410, 670 e 840 pb respectivamente. Neste sentido os isolados foram visualmente genotipados. O isolado foi somente considerado pertencente a um genótipo (3-ADON ou 15-ADON ou NIV) quando apresentou o padrão de bandas esperado para os dois genes avaliados.

5.1.7. Sequenciamento dos isolados que não apresentaram padrão de bandas para genótipos 3-ADON ou 15-ADON ou NIV

Após obtenção dos resultados da genotipagem realizada neste estudo, para alguns isolados não foi possível a determinação da espécie/genótipo devido ao padrão de bandas ser

diferente do descrito para cada provável espécie pré-estabelecida pelo Laboratório de Fitopatologia da UEM. Para quatro destes isolados (18, 28, 45 e 55) a região do DNA nuclear, ITS (*Internal Transcribed Spacer*), consideradas mais informativas para fungos do gênero *Fusarium*, foram amplificadas por PCR e sequênciadas para determinação da espécie. Os *primers* utilizados foram os propostos por White et al. (1990) (*forward* 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG – 3') e *reverse* (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'). Para amplificação foi preparada uma reação utilizando 20 ng de DNA genômico, 1X de tampão de PCR, 1,0 mM de $MgCl_2$, 10 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,25 mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA polimerase e água ultrapura para completar um volume final de 10 µL. O programa de amplificação foi constituído de uma desnaturação inicial a 94ºC por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 ºC por 30 s, 50 ºC por 1 min e 72 ºC por 1 min. Ao final dos ciclos foi acresentado um passo final de 72 ºC por 7 min para a extensão final dos fragmentos. Para comprovar a amplificação das regiões a serem sequenciadas, os produtos de amplificação foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose com concentração de 1,8%, corados com brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador sob luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular o marcador DNA *Ladder* 100 pb.

Para a região ITS é esperado um fragmento de 600 a 700 pb. Após a confirmação da amplificação, foi realizada nova amplificação por PCR em maior quantidade para obter quantidade suficiente para sequenciamento. Após a amplificação, parte da reação foi novamente resolvida por eletroforese em gel de agarose a 1,8%. Confirmada a amplificação, os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit de purificação GenElute da Sigma Aldrich. Os produtos de PCR purificados foram quantificados por eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corados com brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador sob luz UV, utilizando como base os marcadores DNA fago λ 100 ng/uL e DNA *Ladder* 100 pb. Foi avaliada a concentração de DNA obtida e preparada para cada isolado, uma solução contendo 50 ng de DNA e 4,5 pmol de *primer*. As amostras foram secas a 60 ºC. O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando o aparelho *ABI-Prism 3500 Genectic Analyzer* (Applied Biosystems). Ambas as fitas de DNA foram sequenciadas para a determinação mais robusta da sequência de nucleotídeos.

A ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1997) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - http://www.ncbi.nlm.nih.gov) foi

utilizada para verificar homologias das sequências obtidas com as sequências depositadas no *GenBank.*

5.1.8. Quimiotipagem

Para a quimiotipagem foram selecionados seis isolados de cada genótipo/espécie (NIV, 3-ADON e 15-ADON) totalizando 18 isolados (Tabela 5). Estes isolados foram inoculados em plantas de trigo e em meio de cultura de arroz, seguindo o protocolo proposto por Gimeno et al. (1992), conforme detalhado a seguir. O meio de cultura de arroz é utilizado como meio de referência para crescimento de fungos.

Tabela 5. Detalhamento dos tratamentos realizados com os isolados das espécies *Fusarium meridionale* (Fmer), *F. austroamericanum* (Faus) e *F. graminearum* (Fgra) com genótipo, local de origem.

Isolado	Espécie	Genótipo	Origem
20	Fmer	NIV	Pinhão
5	Fmer	NIV	Guarapuava
6	Fmer	NIV	Reserva do Iguaçú
11	Fmer	NIV	Foz do Jordão
7	Fmer	NIV	Roncador
2	Fmer	NIV	Goioxim
54	Faus	3-DON	Pinhão
51	Faus	3-ADON	Guarapuava
48	Faus	3-ADON	Teixeira Soares
42	Faus	3-ADON	Turvo
41	Faus	3-ADON	Candói
44	Faus	3-ADON	Reserva do Iguaçú
34	Fgra	15-ADON	Guarapuava
31	Fgra	15-ADON	Guarapuava
38	Fgra	15-ADON	Pinhão
22	Fgra	15-ADON	Turvo
27	Fgra	15-ADON	Roncador
36	Fgra	15-ADON	Pinhão

5.1.9. Obtenção da suspensão de esporos

Para a obtenção da suspensão de esporos a ser utilizada nas inoculações, a partir dos discos fúngicos armazenados conforme descrito anteriormente, os isolados foram inoculados e multiplicados em gerbox esterilizados contendo 50 mL do meio SNA (*synthetic nutrient-*

poor agar) por gerbox. A temperatura de incubação das placas foi de 20 a 25 ºC. Para o preparo da suspensão dos esporos fúngicos foram utilizados 18 unidades de gerbox, sendo um para cada genótipo utilizado. Após inoculação em meio, foi aguardado aproximadamente 30 dias para que os micélios recobrissem toda a superfície do gerbox. Em cada gerbox foi adicionado aproximadamente 100 mL de água deionizada esterilizada. Em seguida, a superfície do meio de cultura foi raspada com alça de Drigalski e a suspensão filtrada em gaze (Figura 7B). A concentração de conídios por mL de filtrado foi determinada utilizando uma Câmara de Neubauer (Figura 7C). A concentração de conídios por mL foi padronizada adicionando água deionizada esterilizada para 10^4 conídios mL^{-1} (STACK, 1989).

As suspensões obtidas foram inoculadas nas plantas no mesmo dia do preparo. Todas estas etapas para obtenção das suspensões foram conduzidas no Laboratório Central da Cooperativa Agrária Agroindustrial.

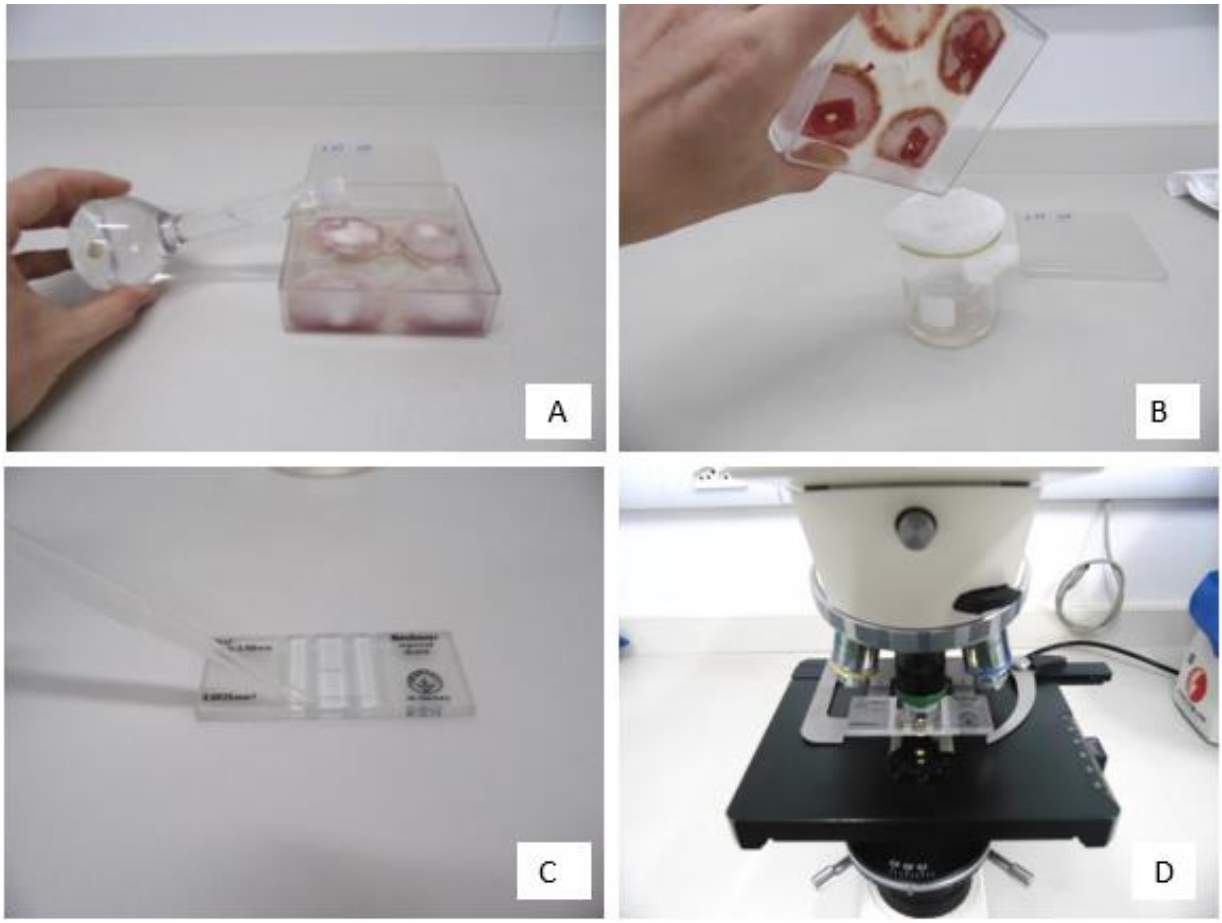

Figura 7. Etapas realizadas para a obtenção da suspensão de conídios utilizados na inoculação de plantas de trigo. A) Adição de água deionizada; B) Filtragem da suspensão; C)

Quantificação da concentração de conídios em câmara de Neubauer; D) Visualização com auxílio de microscópio óptico com aumento de 400x.

5.1.10. Quimiotipagem em planta

O experimento de quimiotipagem em planta foi conduzido na safra agrícola de trigo de 2017, em ambiente controlado, no município de Guarapuava-PR, especificamente na Colônia Samambaia e no Laboratório Central da Cooperativa Agrária Agroindustrial. As coordenadas geográficas e a altitude do local de manutenção das plantas foram, latitude de 22°50’ Sul e longitude de 51º30’ Oeste e 1.100 metros.

5.1.10.1. Obtenção de plantas de trigo e condições de crescimento

Para obtenção das plantas de trigo e realização das inoculações em planta foi selecionado um lote de semente de trigo da cultivar LG ORO, suscetível a FET. As sementes foram produzidas no distrito de Entre Rios, Município de Guarapuava, estado do Paraná (PR), na safra 2016/2016. As sementes foram beneficiadas logo após a colheita, e armazenadas em sacarias em ambiente climatizado. O lote selecionado foi submetido as análises de germinação padrão e vigor, antes do plantio em vasos.

A análise de germinação foi realizada com quatro repetições de 100 sementes cada. As sementes foram germinadas em papel germitest, umedecido com água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco e mantido em germinador na temperatura de 20 ºC ± 2 ºC (Figura 8). As avaliações foram efetuadas no quinto dia após a semeadura e o resultado expresso em porcentagem de plântulas normais, anormais, sementes dormentes e mortas conforme proposto por (BRASIL, 2009).

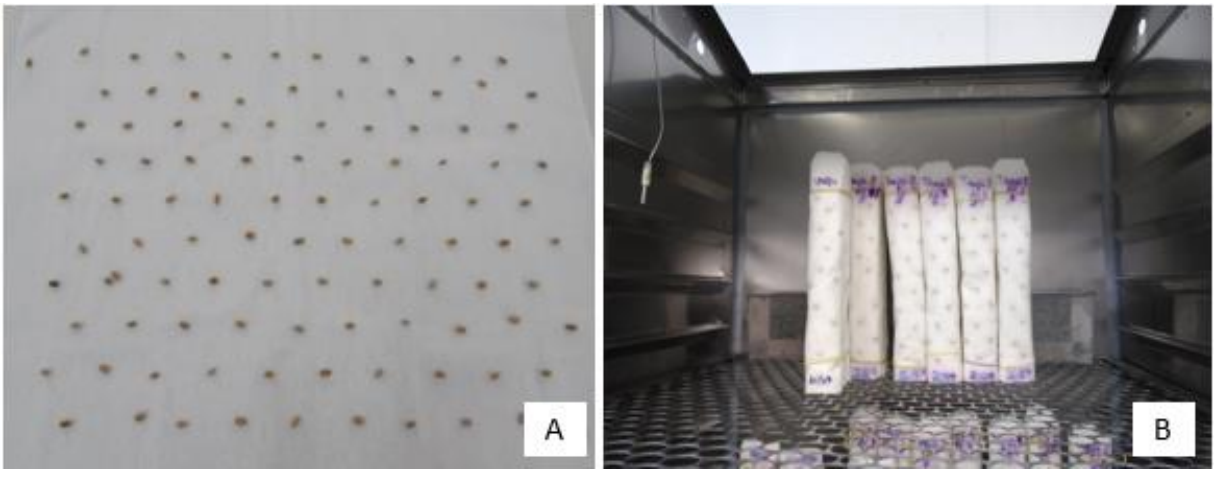

Figura 8. Teste de germinação do lote de sementes utilizado no experimento. A) Semeadura em substrato de papel; B) Vista das sementes no germinador.

Para o teste de vigor, aproximadamente 250 sementes foram pré-condicionadas em caixas plásticas tipo gerbox, medindo 11,0 x 11,0 x 3,0 cm com tela em seu interior, (Figura 9) contendo 40 mL de água, por um período de 24h a temperatura de 42 ºC (MARCOS FILHO, 1999). Após esse período, as sementes foram dispostas em papel germitest e levadas ao germinador com as mesmas condições do teste de germinação, porém, com duas repetições de 100 sementes cada e mantidas em germinador a temperatura de 20 ºC ± 2 ºC por um período de cinco dias (Figura 9). Após, foi realizado a leitura das plântulas vigorosas.

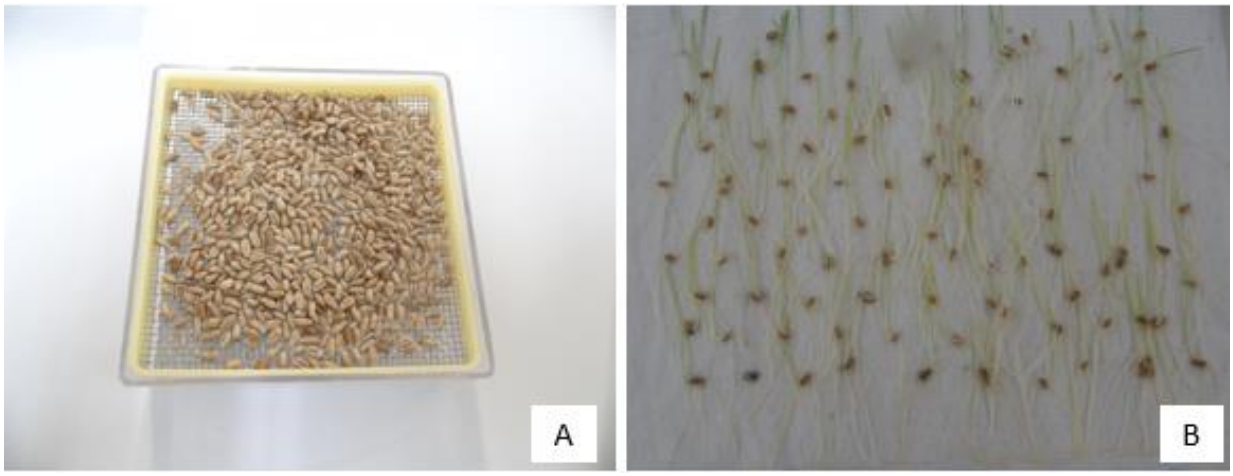

Figura 9. Teste de vigor do lote de sementes de trigo. A) Caixa tipo gerbox com o preparo para o teste de vigor; B) Plântulas com 5 dias, teste de vigor.

Após testado o poder germinativo e o vigor do lote, as sementes foram plantadas em vasos (30 x 26 cm), previamente preparados com pedra brita no fundo, seguido de solo de área cultivada anteriormente com trigo. Os vasos foram mantidos em estufa, conforme Figura 10. Em cada vaso foi semeado 20 sementes. A irrigação foi por gotejamento duas vezes ao dia. O plantio das sementes nos vasos foi realizado dia 23/07/2017, e as plantas foram mantidas nesta condição até o momento da inoculação dos isolados fúngicos. A umidade do ar e temperatura interna da estufa foram acompanhadas diariamente durante todo o período do experimento e comportou-se conforme detalhado na Tabela 6.

Figura 10. Vasos com plantas de trigo na fase de emergência, sete dias após plantio.

Tabela 6. Fase de desenvolvimento e duração em dias, da cultura do trigo, Tº (temperatura média em graus Celsius) e UR (umidade relativa) dentro da estufa.

Fase	Duração(dias)	Tº média dentro da estufa	% UR dentro estufa
Plântula	5-7	19,3	69
Perfilhamento	15-17	19,5	68
Alongamento	15-18	20,4	72
Espigamento	12-16	25,2	77
Maturação	30-40	25,5	74

5.1.10.2. Inoculação em planta

Quando as plantas atingiram o estádio de florescimento ou antese, 67 dias após semeadura (Figura 11), com o auxílio de um dosador foram aplicados 4 mL da suspensão de esporos por espiga. Cada vazo continha 16 a 18 espigas. A padronização do volume da suspensão aplicado foi adotado visando reduzir o erro experimental. Após a aplicação da suspensão, as espigas inoculadas foram cobertas com sacos plásticos umedecidos com água destilada, formando uma câmara úmida (Figura 12), condição ideal para o patógeno iniciar o desenvolvimento na planta. Duas vezes ao dia os sacos plásticos foram umedecidos com o uso de um borrifador contendo água destilada. Essa condição foi mantida por 72 h. Após esse período, os sacos plásticos foram retirados e a irrigação foi retomada. A partir desta etapa o

fornecimento de água foi via aérea, realizada duas vezes ao dia com uso de regador. A irrigação foi mantida até o momento da avaliação da severidade.

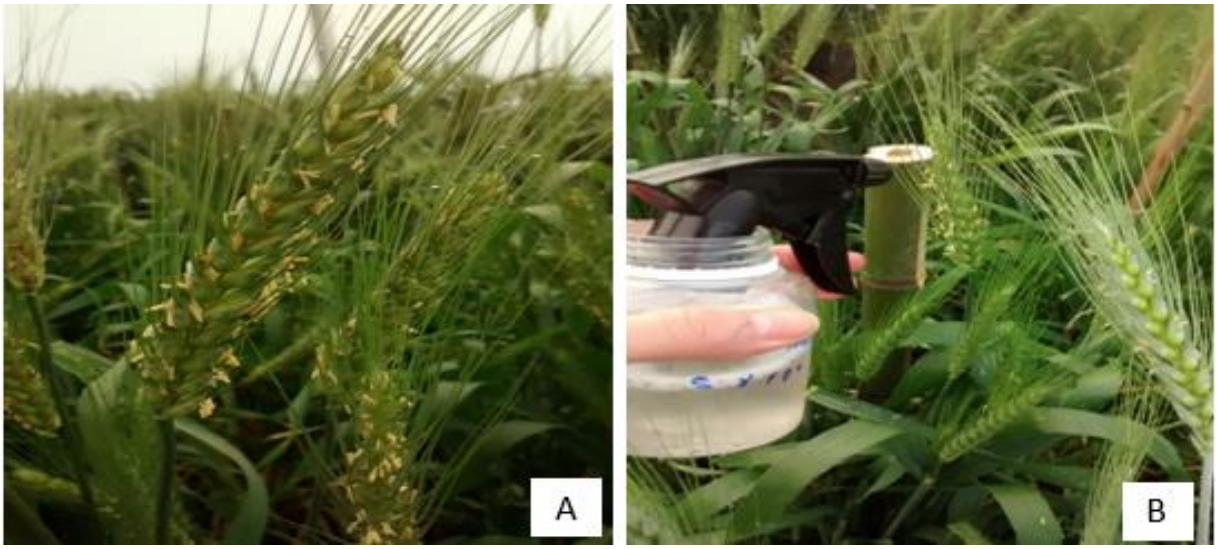

Figura 11. Inoculação dos isolados de *Fusarium* em plantas de trigo. A) Plantas de trigo em estádio de florescimento com as anteras extrusadas; B) e aplicação da suspensão de esporos.

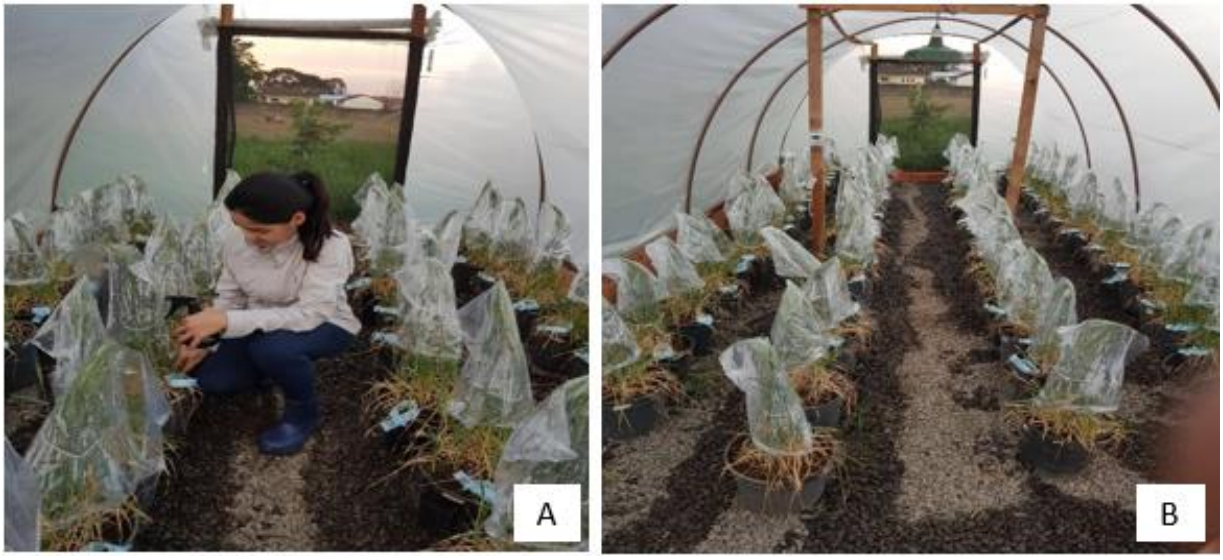

Figura 12. Manutenção das plantas de trigo após inoculação. A) Vistoria das plantas inoculadas; B) Visão geral do experimento.

5.1.10.3. Avaliação de severidade da FET

Sete dias após a inoculação (dai) surgiram os primeiros sintomas da doença. As espiguetas adquiriram coloração amarelada e posteriormente marrom palha. Além dos

sintomas, pôde-se observar também os sinais do fungo sobre as superfícies afetadas das espiguetas, como peritécios (corpos enegrecidos e esféricos), conforme Figura 13.

Dezessete dai foi realizado a avaliação de severidade da doença, com o auxílio da escala diagramática para avaliação da severidade de FET (STACK; MCMULLEN, 2011) e demonstrado na Figura 13. A avaliação foi realizada uma vez, em todas as espigas inoculadas (15 por vaso), em todos os tratamentos, por um só avaliador. Com os dados obtidos das avaliações foi calculada a severidade da doença (SD). Para cada vaso inoculado foi medida com base na % da área das espiguetas infectadas, conforme Tabela 7.

Tabela 7. Critério para avaliação da severidade da doença conforme proposto por STACK; MCMULLEN (2011).

severidade	**% espigueta infectada**
nenhuma infecção	0
uma espigueta infectada	7
duas espiguetas infectadas	14
três espiguetas infectadas	21
quatro espiguetas infectadas	33
metade da espigueta infectada	50
dois terços da espigueta infectados	67
três quartos da espigueta infectada	75
toda a espigueta infectada ou rachis morto	100

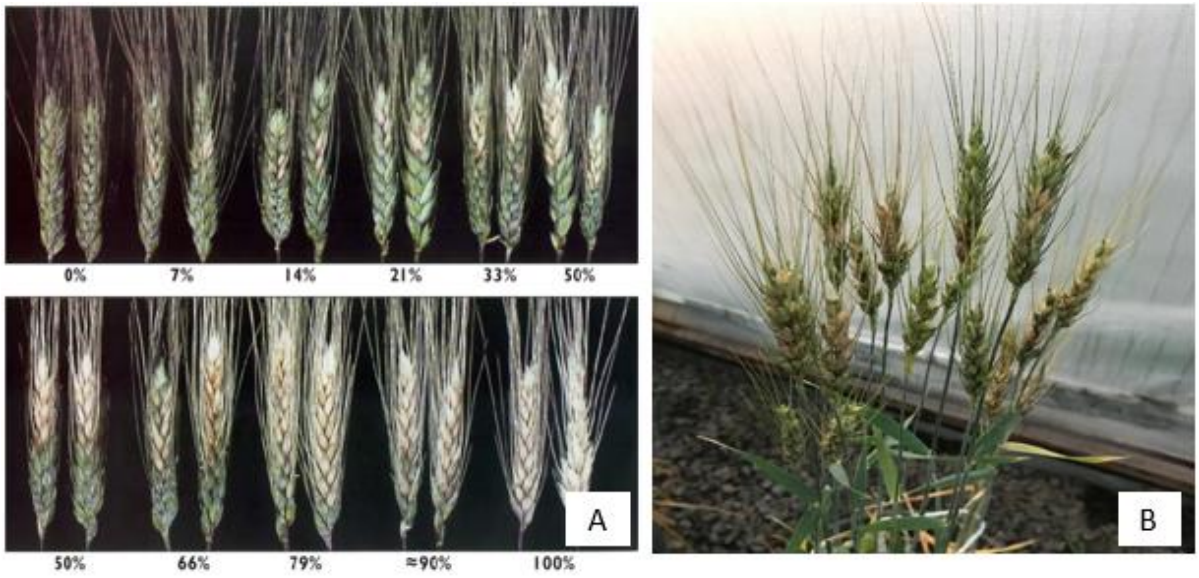

Figura 13. Avaliação da severidade da doença. A) Escala diagramática para avaliação de severidade de fusariose da espiga de trigo expressa em percentual de áreada espiga lesionada

(STACK; MCMULLEN, 2011); B) Plantas do experimento com sintomas da fusariose da espiga do trigo.

5.1.10.4. Colheita do material vegetal e preparo das amostras

Após completado o ciclo da cultura do trigo, que teve duração de 110 dias, foi realizada a coleta dos grãos. Com o auxílio de uma tesoura foram cortadas as espigas de cada tratamento (vasos). Estas foram acondicionadas em sacos de papel, acompanhadas da identificação. Os sacos com o material foram fechados e mantidos em sala climatizada (16 °C ± 2) até o momento da debulha.

As espigas foram debulhadas em debulhador experimental e os grãos de trigo foram armazenados em potes plásticos e mantidos em sala climatizada até serem triturados.

Os grãos foram triturados em moinho de discos para obtenção da farinha integral. A farinha integral consite na moagem do grão inteiro, mantendo a estrutura do farelo e gérmen. Após a moagem de cada amostra o moinho foi limpo com ar comprimido isento de óleo. A granulometria da farinha integral obtida foi de 2,5 mm, a qual foi utilizada para a extração e quantificação das micotoxinas (Figura 14).

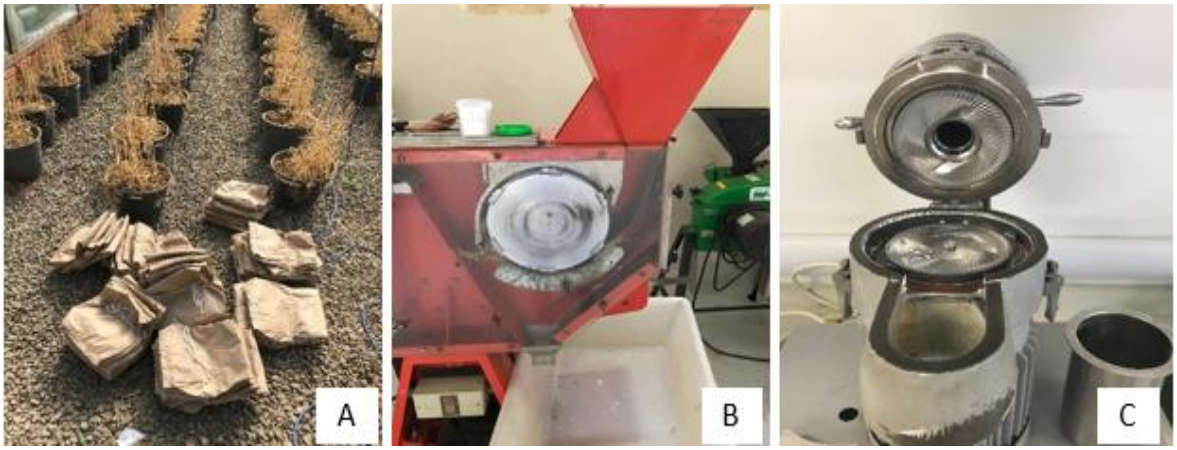

Figura 14. Colheita e processamento das amostras. A) Colheita das plantas de trigo; B) Debulhador experimental de grãos; C) Moinho de discos.

5.1.10.5. Extração e quantificação de micotoxinas

Para a extração das micotoxinas em um tubo de 50 mL (utilizou-se um tubo por amostra) foram adicionados 2,5 g ± 0,009 de amostra triturada. Em seguida, adicionou-se no tubo 2 mL de água ultrapura. O tubo foi bem fechado e agitado manualmente para que toda a amostra entrasse em contato com a água. Após, adicionou-se 2 mL do composto químico

ACN (acetonitrila) e 6 mL de ácool metílico (metanol), na proporção (40:60, v/v) e novamente agitou-se manualmente, para homogeneizar a solução.

Após, as amostras foram submetidas a agitação em mesa agitadora por período de 1 hora, na rotação de 330 rpm. Em seguida os tubos com as amostras foram centrifugados por 10 minutos à rotação de 4000 rpm. Após, foram transferidos 250 µL do sobrenadante para o microtubo de 2 mL, contendo 750 µL de água ultrapura. Os microtubos foram submetidos novamente a centrifugação por 10 minutos à rotação de 14000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em filtro pvdf (fluoreto de polivinilideno) de 0,2 µm de espessura, acoplado em seringa sem agulha tipo "Luer Lock" (reduz a pressão, permitindo o movimento suave do êmbolo). Concluídas as etapas descritas acima, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida, utilizando o equipamento cromatógrafo líquido de alta performance (UPLC), acoplado a detector de massas (UPLC-MS/MS - *ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*), conforme demonstrado na Figura 15. Os resultados da cromatografia foram expressos em µg Kg^{-1}.

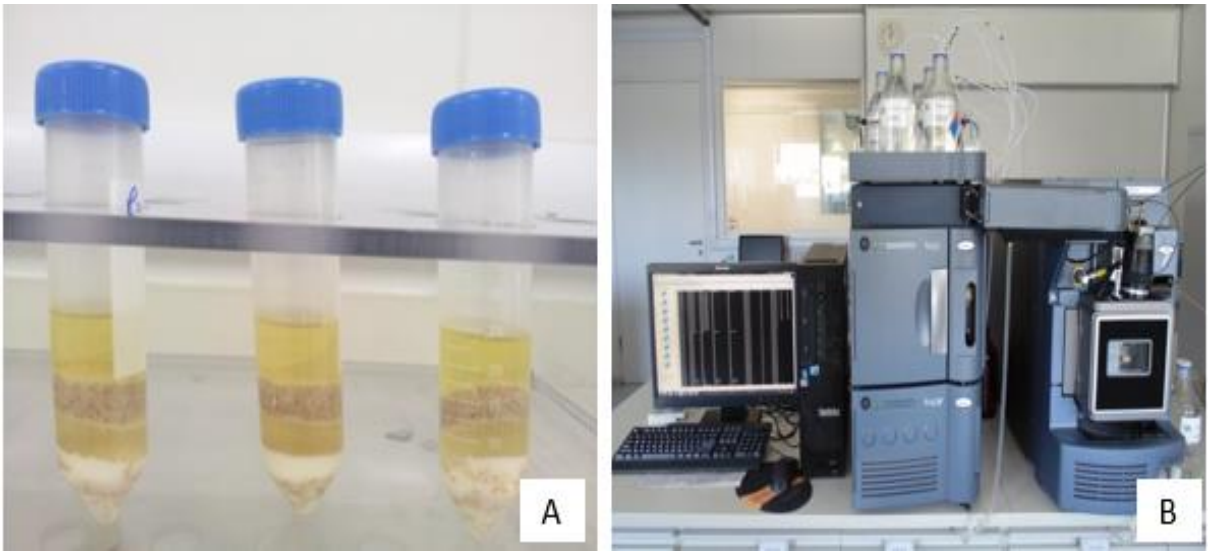

Figura 15. Etapa da análise de micotoxinas. A) Separação dos componentes; B) Equipamento UPLC (*ultra-performance liquid chromatography*) acoplado a detector de massa.

5.1.10.6. Análise estatística

Os dados da quantidade das micotoxinas produzidas pelos isolados das espécies Fmer e Faus foram não paramétricos de acordo com o teste de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$) tanto em planta como em meio de arroz. Neste sentido a comparação de médias foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis com significância de 5%. Já os dados obtidos para os isolados da espécie Fgra

os dados foram paramétricos, sendo assim a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Também, para a comparação entre a quantidade de micotoxinas produzidas por cada isolado em planta e meio de arroz os dados foram paramétricos, neste sentido a comparação par-a-apar foi feita pelo teste *t Student* ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa PAST versão 3.16 (HAMMER et al., 2001).

Para obtenção dos dados para comparação da produção de micotoxinas entre espécies e dentro da espécie considerando inoculação em planta de trigo e meio de arroz, foi calculada a média considerando os valores obtidos para todos os isolados de cada espécie. A significância nas diferenças das médias obtidas em planta de trigo e meio de arroz de cada espécie foi obtida pelo teste t *Student* ($P < 0,05$). Já, a significância nas diferenças das médias entre espécies foi obtida utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para as espécies que apresentaram diferença estatística quando comparada a produção de micotoxinas em planta e em meio de cultura de arroz foi calculado a porcentagem superestimação ou subestimação da produção de micotoxinas em meio de arroz comparada com a produção em plantas de trigo.

5.1.11. Quimiotipagem em meio de cultura de arroz

Para avaliar o potencial de produção de micotoxinas dos isolados das espécies *F. meridionale* (Fmer), *F. austroamericanum* (Faus) e *F. graminearum* (Fgra) em meio de arroz foram utilizados os mesmos isolados do estudo em plantas de trigo (Tabela 5). Porém, após a repicagem dos micélios fúngicos, o período de incubação em meio BDA foi de 12 dias a 25 °C ± 2.

5.1.11.1. Meio utilizado e inoculação

O meio de cultivo (substrato) utilizado foi arroz branco tipo 1, sem casca. . O meio de arroz é padrão para avaliação da produção de micotoxinas. As amostras do meio de cultivo foram individualmente acondicionadas em sacos plásticos contendo 87,5 g de arroz e 37,5 g de água destilada (Figura 16). Os sacos plásticos com o meio foram autoclavados por 1 h a 121 °C. A autoclavagem foi repetida duas vezes em dias diferentes.

Figura 16. Preparo de meios de cultura de arroz. A) Adição de água nas unidades experimentais; B) Amostras preparadas para autoclavagem; C) Autoclavagem.

Para cada isolado (total de 18), foram preparados 3 repetições do meio de arroz, totalizando 54 unidades experimentais, mais a testemunha. A repicagem dos isolados esporulados foi realizada em câmara de fluxo laminar, retirando três discos de micélio do fungo, medindo aproximadamente 7 mm, e transferindo para o saco plástico de cada isolado.

5.1.11.2. Incubação, condições de crescimento e extração das micotoxinas

Os isolados cultivados em arroz permaneceram em câmara de crescimento durante 14 dias a temperatura de 28 ºC. Após esse período até o momento da análise, os sacos plásticos com os isolados permaneceram em refrigerador a 0 ºC. Os cultivos foram triturados na sua totalidade em liquidificador por aproximadamente 2 minutos, até a granulometria de farinha fina. Para o processo de extração e análise das micotoxinas foram utilizados aproximadamente 2,5 g ± 0,009 de material triturado por amostra, conforme etapas descritas anteriormente no item 5.1.10.5.

5.1.11.3. Quantificação das micotoxinas

Após a extração, as amostras foram analisadas pela técnica de cromatografia líquida em cromatógrafo líquido de alta performance (UPLC), acoplado a detector de massas, conforme descrito anteriormente no item 5.1.10.5, para quantificação da produção em plantas de trigo (Figura 17).

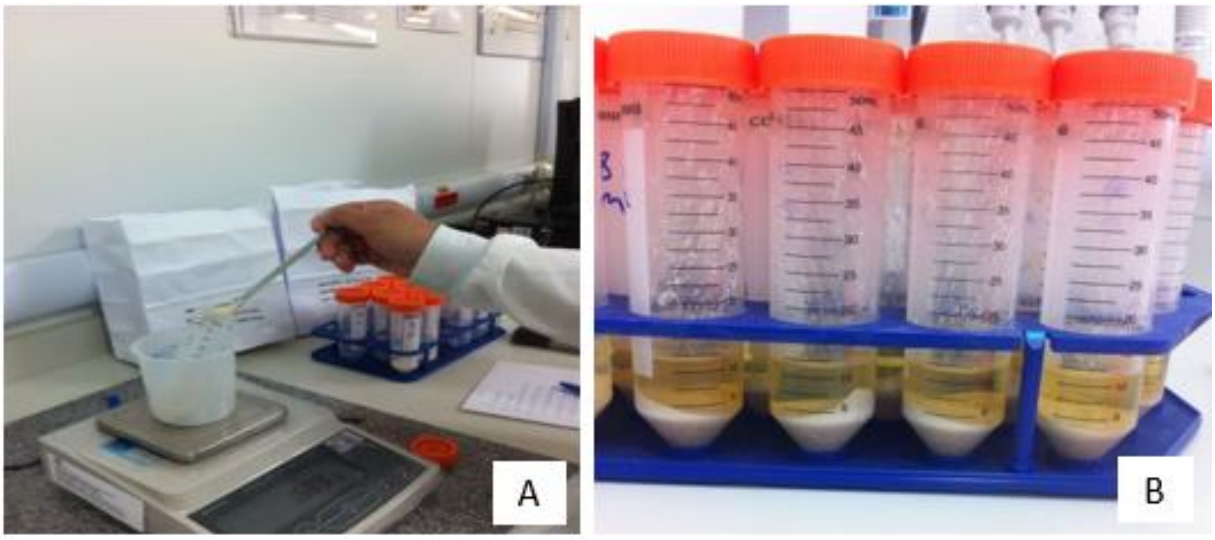

Figura 17. Etapas da extração de micotoxinas dos isolados do CFg cultivados em meio de cultura. A) Pesagem das alíquotas; B) Amostras preparadas para cromatografia.

5.1.11.4. Análise estatística

A análise estatística utilizada foi a mesma descrita para quantificação em plantas.

5.2. Obtenção de cultura monospórica de isolados potencialmente híbridos

Para os isolados 18, 26, 45 e 55, os quais não foi possível serem genotipados por apresentarem padrão de bandas diferente do esperado e/ou mostrarem-se diferentes do quimiotipo previamente estabelecido, foram preparadas culturas monospóricas e mantidas como descrito anteriormente. A partir das culturas monospóricas realizou-se a inoculação em meio de cultura de arroz, para a realização da quimiotipagem utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente no item 5.1.11.1.

5.3. Inibição do crescimento micelial entre isolados do CFg

Para avaliar se os isolados fúngicos genótipos 3-ADON e 15-ADON inibem o crescimento de isolados fúngicos genótipos NIV foi delineado um experimento baseado no método de pareamento de culturas, proposto por Ethur et al. (2005). A multiplicação inicial dos isolados 3-ADON, 15-ADON e NIV foi realizada em placas contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA), acondicionadas em sala apropriada para cultivo, a 25 ºC ± 2, por 10 dias. Para os ensaios de competição, foram selecionados 4 isolados de cada genótipo (NIV, 3-ADON e 15-ADON), os quais foram submetidos ao crescimento no meio de cultura BDA conforme Tabela 8.

Dois discos de 7 mm de diâmetro, de cada isolado NIV foram retirados das culturas puras dos patógenos e depositados a uma distância de 2,0 cm da borda em caixas plásticas tipo gerbox contendo meio BDA. Após, 2 discos de 7 mm de diâmetro de cada isolado de 3-ADON e 15-ADON foram posicionados em cada gerbox, no lado oposto ao genótipo NIV. Foram também mantidos isolados NIV como tratamentos testemunha (2 discos em cada gerbox) no mesmo período do experimento (Figura 18).

As culturas foram incubadas por 5 dias (120 h) até o momento em que uma das testemunhas atingiu a borda do lado oposto do gerbox. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas a partir de três dias (72 h) de inoculação, seguindo com avaliações no quarto dia (96 h) e quinto dia (120 h) após inoculação. As medidas de diâmetro das colônias foram realizadas nos dois sentidos opostos, com o auxílio de um paquímetro. Cada cultivo pareado foi conduzido com quatro repetições. Os tratamentos foram distribuídos ao acaso na sala de crescimento que foi mantida a 25 ºC.

Tabela 8. Tratamentos e genótipos utilizados no experimento para avaliação do potencial de inibição entre isolados fúngicos de *Fusarium*.

Isolado	**Genótipo**	**Origem**
2	NIV	Goioxim
5	NIV	Guarapuava
7	NIV	Roncador
11	NIV	Foz do Jordão
51	3-ADON	Guarapuava
44	3-ADON	Reserva do Iguaçu
41	3-ADON	Candoi
54	3-ADON	Pinhão
34	15-ADON	Guarapuava
27	15-ADON	Roncador
36	15-ADON	Pinhão
22	15-ADON	Turvo
2 x 51	NIV x 3-ADON	-
2 x 44	NIV x 3-ADON	-
2 x 41	NIV x 3-ADON	-
2 x 54	NIV x 3-ADON	-
2 x 34	NIV x 15-ADON	-
2 x 27	NIV x 15-ADON	-
2 x 36	NIV x 15-ADON	-
2 x 22	NIV x 15-ADON	-
5 x 51	NIV x 3-ADON	-
5 x 44	NIV x 3-ADON	-
5 x 41	NIV x 3-ADON	-
5 x 54	NIV x 3-ADON	-

5 x 34	NIV x 15-ADON	-
5 x 27	NIV x 15-ADON	-
5 x 36	NIV x 15-ADON	-
5 x 22	NIV x 15-ADON	-
7 x 51	NIV x 3-ADON	-
7 x 44	NIV x 3-ADON	-
7 x 41	NIV x 3-ADON	-
7 x 54	NIV x 3-ADON	-
7 x 34	NIV x 15-ADON	-
7 x 27	NIV x 15-ADON	-
7 x 36	NIV x 15-ADON	-
7 x 22	NIV x 15-ADON	-
11 x 51	NIV x 3-ADON	-
11 x 44	NIV x 3-ADON	-
11 x 41	NIV x 3-ADON	-
11 x 54	NIV x 3-ADON	-
11 x 34	NIV x 15-ADON	-
11 x 27	NIV x 15-ADON	-
11 x 36	NIV x 15-ADON	-
11 x 22	NIV x 15-ADON	-

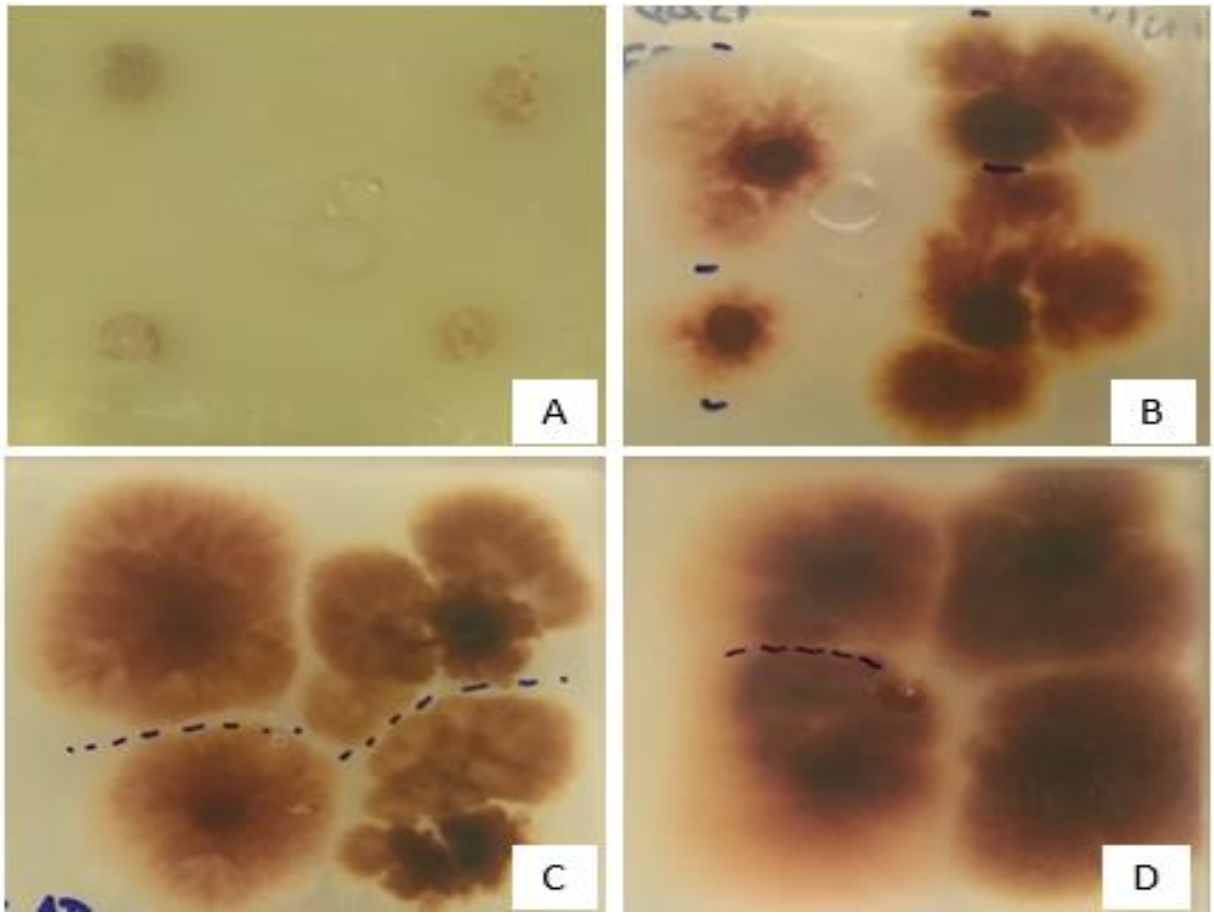

Figura 18. Ensaio de inibição do crescimento entre isolados de *Fusarium*. Em cada figura a direita estão os discos inoculados com micélios de quimiotipo NIV, e a esquerda discos com

quimiotipo 15-ADON. A) Gerbox com isolados recém repicados; B) Primeiro dia de avaliação; C) Segundo dia de avaliação; D) Terceiro dia de avaliação.

5.3.1. Análise estatística

Os resultados do experimento de inibição entre isolados foram submetidos à análise de normalidade, homogeneidade e análise de variância em esquema fatorial 4 x 8 (4 isolados de NIV e 8 isolados de 3-ADON e 15-ADON) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Os dados foram avaliados no programa PAST versão 3.16.

5.4. Diversidade e estruturação genética de isolados das espécies Fmer, Faus e Fgra do estado do Paraná

5.4.1. Obtenção dos isolados e extração e quantificação do DNA

Nesta etapa foram utilizados 16 isolados de Fmer, 19 de Fgra e 14 de Faus (Tabela 9). Estes isolados foram os que na genotipagem apresentaram o padrão esperado para a espécie em questão. A obtenção dos isolados e a extração e quantificação do DNA dos isolados foram conforme descrito anteriormente para genotipagem, item 5.1.4.

Tabela 9. Isolados das espécies *Fusarium meridionale* (Fmer) (NIV), *F. graminearum* (Fgra) (15-ADON) e *F. austroamericanum* (Faus) (3-ADON) utilizados no estudo genético-populacional.

Isolado	Espécie	Genótipo	Origem
2	Fmer	NIV	Goioxim
4	Fmer	NIV	Goioxim
5	Fmer	NIV	Guarapuava
6	Fmer	NIV	Reserva do Iguaçu
7	Fmer	NIV	Roncador
8	Fmer	NIV	Guarapuava
9	Fmer	NIV	Reserva do Iguaçu
10	Fmer	NIV	Guarapuava
11	Fmer	NIV	Foz do Jordão
12	Fmer	NIV	Guarapuava
14	Fmer	NIV	Reserva do Iguaçu
15	Fmer	NIV	Goioxim
16	Fmer	NIV	Goioxim
17	Fmer	NIV	Goioxim
20	Fmer	NIV	Pinhão
26	Fmer	NIV	Pinhão
19	Fgra	15-ADON	Guarapuava
22	Fgra	15-ADON	Turvo

23	Fgra	15-ADON	Turvo
24	Fgra	15-ADON	Turvo
25	Fgra	15-ADON	Guarapuava
27	Fgra	15-ADON	Roncador
28	Fgra	15-ADON	Turvo
29	Fgra	15-ADON	Turvo
31	Fgra	15-ADON	Guarapuava
32	Fgra	15-ADON	Pinhão
33	Fgra	15-ADON	Pinhão
34	Fgra	15-ADON	Guarapuava
35	Fgra	15-ADON	Roncador
36	Fgra	15-ADON	Pinhão
37	Fgra	15-ADON	Turvo
38	Fgra	15-ADON	Pinhão
39	Fgra	15-ADON	?
40	Fgra	15-ADON	?
53	Fgra	15-ADON	Guarapuava
3	Faus	3-ADON	Pinhão
41	Faus	3-ADON	Candói
42	Faus	3-ADON	Turvo
43	Faus	3-ADON	Turvo
44	Faus	3-ADON	Reserva do Iguaçu
46	Faus	3-ADON	Candói
47	Faus	3-ADON	Guarapuava
48	Faus	3-ADON	Teixeira Soares
49	Faus	3-ADON	Pinhão
50	Faus	3-ADON	Pinhão
51	Faus	3-ADON	Guarapuava
52	Faus	3-ADON	Guarapuava
54	Faus	3-ADON	Pinhão
56	Faus	3-ADON	Pinhão

5.4.2. PCR, eletroforese e análise dos géis

Para amplificação do DNA de cada isolado foram utilizados 10 *primers* ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá (Tabela 10). As reações de amplificação do DNA de cada isolado via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 µL contendo: 20 ng de DNA, 0,2 µM de *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 1 U de Taq DNA Polimerase, 1X de tampão para PCR e água ultrapura para completar o volume. Para a PCR o termociclador foi programado com um passo inicial de desnaturação a 94 ºC por 5 min, seguido de 35 ciclos a 90 ºC por 45 s, temperatura de pareamento do *primer* por 30 s (Tabela 10) e 72 ºC por 60 s. Ao final, um passo de 72 ºC por 10 min foi adicionado para extensão final dos fragmentos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,8% corados com brometo de etídio (0,5 µg mL^{-1}),

submetidos a corrida de 4 horas a 110 V. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentador com sistema digital.

Tabela 10. Relação dos *primers* ISSR utilizados para o estudo genético-populacional das espécies *Fusarium meridionale* (Fmer) (NIV), *F. graminearum* (Fgra) (15-ADON) e *F. austroamericanum* (Faus) (3-ADON) coletadas no estado do Paraná. TA - temperatura de anelamento.

Primer	**Sequência***	**TA ºC**
UBC 807	$(AG)_8T$	52
UBC 808	$(AG)_8C$	50
UBC 809	$(AT)_8T$	55
UBC 811	$(GA)_8C$	53
UBC 827	$(AC)_8G$	53
UBC 835	$(AG)_8YC$	54
UBC 848	$(CA)_8RG$	55
UBC 861	$(ACC)_6$	52
UBC 868	$(GGA)_6$	50
UBC 873	$(GACA)_4$	50

* Y = C,T; R = A, G

5.4.3. Análise estatística

Somente as bandas com frequência entre 5 e 95% nos isolados foram consideradas polimórficas e utilizadas para construção da matriz binária utilizada nas análises estatísticas. O índice de diversidade de Shannon (I), a diversidade genética de Nei (h), a porcentagem de polimorfismo (P) e o Coeficiente de Diferenciação Genética (G_{ST}) foram calculadas pelo software POPGENE (YEH et al., 1999).

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada no software GenAlEx versão 6.501 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A análise Bayesiana, para obtenção dos clusters (grupos genéticos), foi feita utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al.; 2010). Para determinar o número ideal de clusters (K), foram feitas simulações partindo do princípio que é possível a obtenção de qualquer número de clusters entre de 1 e 10, sendo que para cada simulação foram feitas 10 repetições. Para esta análise foi utilizado o modelo de ascendência sem mistura, e as frequências alélicas foram correlacionados por 500000 *burn-in* e 1000000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) repetições após burn-in. Para definição do *K* (número de clusters - grupos genéticos) mais provável em relação aos propostos pela análise, foram utilizados os critérios sugeridos por Earl (2012) com o auxílio do programa STRUCTURE

HARVESTER (EARL, 2012). Para todas as análises, cada grupo de isolados pertencente a mesma espécie foi considerado como uma população.

6. RESULTADOS

6.1. Genotipagem molecular

A genotipagem dos 56 isolados do CFg oriundos do estado do Paraná evidenciou que a maioria dos isolados apresentaram padrão de bandas características de genótipos produtores de NIV ou 15-ADON ou 3-ADON confirmando os resultados previamente obtidos no Laboratório de Fitopatologia da UEM (Figura 19). Sete isolados não apresentaram padrão para nenhum genótipo (Tabela 11). Também, com base no padrão de bandas observado em cada isolado foi possível identificar a espécie de 49 isolados do CFg dentre os 56 estudados (Tabela 11). Paralelamente a genotipagem realizada neste estudo, o DNA destes isolados foi enviado pelo Laboratório de Fitopatologia da UEM à Universidade de Illinois, USA para identificação das espécies pela técnica Luminex. Os resultados obtidos pela técnica Luminex confirmaram a identificação aqui realizada utilizando os genes *Tri3* e *Tri12*.

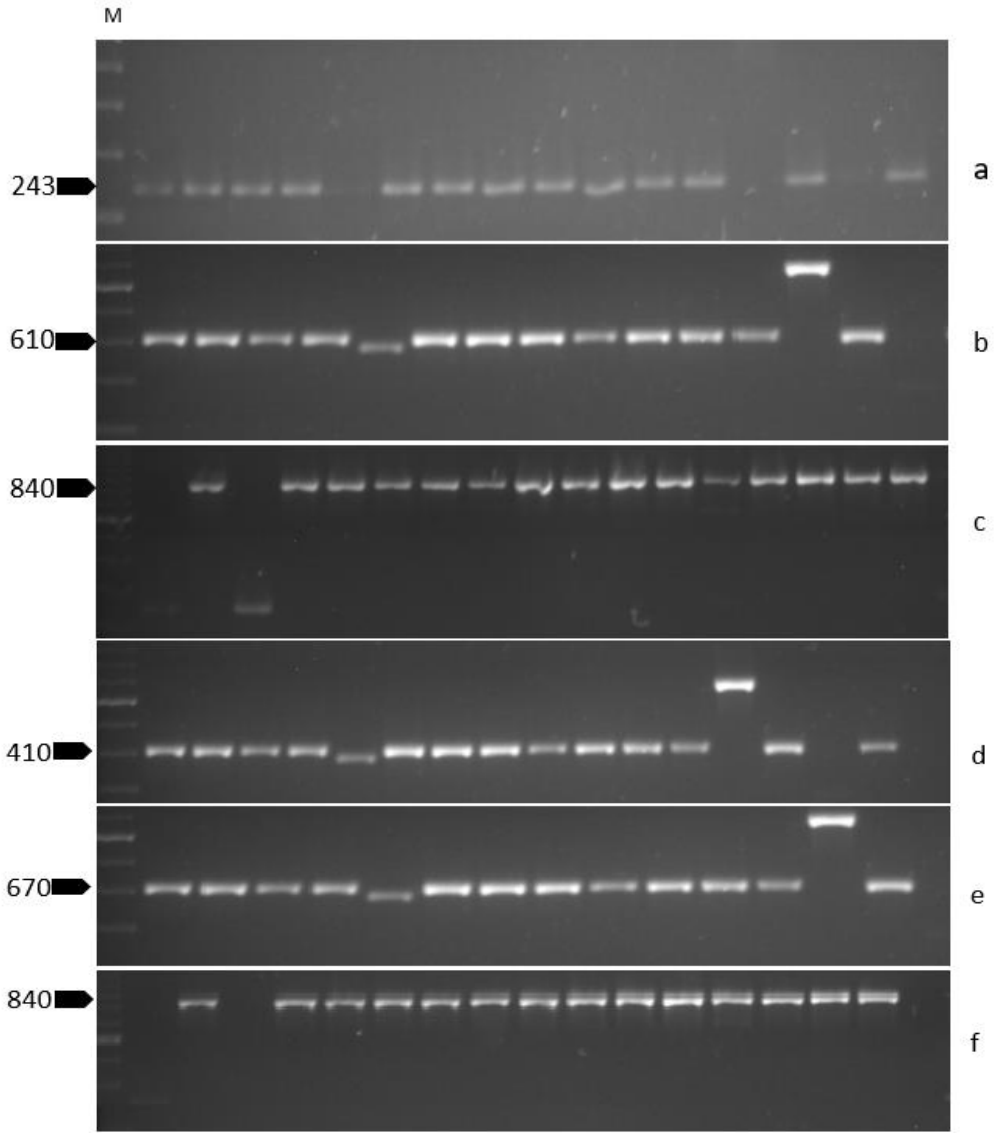

Figura 19. Géis de agarose com o padrão de amplificação dos *primers* designados para genotipagem de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em parte dos isolados estudados. M - indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. Os números do lado esquerdo da figura representam o tamanho esperado de banda "em pares de base" obtida pelo PCR multiplex utilizando os *primers* para os genes *Tri3* (a, b, c) e *Tri12* (d, e, f) nos genotipos 3-ADON (a, d), 15-ADON (b, e) e NIV (c, f). Os isolados que não apresentam a combinação de bandas esperadas para ambos os genes são os que não foi possível determinar o genótipo.

Tabela 11. Resultado da genotipagem e identificação dos isolados do complexo *Fusarium graminearum* coletados no estado do Paraná e avaliados neste estudo.

Isolado	Origem	Genótipo	Provável espécie*
1	Guarapuava	3-ADON	não identificado
2	Goioxim	NIV	*F. meridionale*
3	Pinhão	3-ADON	*F. austroamericanum*
4	Goixim	NIV	*F. meridionale*
5	Guarapuava	NIV	*F. meridionale*
6	Reserva do Iguaçú	NIV	*F. meridionale*
7	Roncador	NIV	*F. meridionale*
8	Guarapuava	NIV	*F. meridionale*
9	Reserva do Iguaçu	NIV	*F. meridionale*
10	Guarapuava	NIV	*F. meridionale*
11	Foz do Jordão	NIV	*F. meridionale*
12	Guarapuava	NIV	*F. meridionale*
13	Goioxim	NIV	Não identificado
14	Reserva do Iguaçu	NIV	*F. meridionale*
15	Goioxim	NIV	*F. meridionale*
16	Goioxim	NIV	*F. meridionale*
17	Goioxim	NIV	*F. meridionale*
18	Pinhão	não estabelecido	não identificado
19	Guarapuava	15-ADON	*F. graminearum*
20	Pinhão	NIV	*F. meridionale*
21	Roncador	15-ADON	*F. graminearum*
22	Turvo	15-ADON	*F. graminearum*
23	Turvo	15-ADON	*F. graminearum*
24	Turvo	15-ADON	*F. graminearum*
25	Guarapuava	15-ADON	*F. graminearum*
26	Pinhão	NIV	não identificado
27	Roncador	15-ADON	*F. graminearum*
28	Turvo	15-ADON	*F. graminearum*
29	Turvo	15-ADON	*F. graminearum*
30	Roncador	não estabelecido	não identificado
31	Guarapuava	15-ADON	*F. graminearum*
32	Pinhão	15-ADON	*F. graminearum*
33	Pinhão	15-ADON	*F. graminearum*
34	Guarapuava	15-ADON	*F. graminearum*
35	Roncador	15-ADON	*F. graminearum*
36	Pinhão	15-ADON	*F. graminearum*
37	Turvo	15-ADON	*F. graminearum*
38	Pinhão	15-ADON	*F. graminearum*
39	não estabelecido	15-ADON	*F. graminearum*
40	não estabelecido	15-ADON	*F. graminearum*
41	Candoi	3-ADON	*F. austroamericanum*
42	Turvo	3-ADON	*F. austroamericanum*

43	Turvo	3-ADON	*F. austroamericanum*
44	Reserva do Iguaçú	3-ADON	*F. austroamericanum*
45	Reserva do Iguaçú	não estabelecido	não identificado
46	Candoi	3-ADON	*F. austroamericanum*
47	Guarapuava	3-ADON	*F. austroamericanum*
48	Teixeira Soares	3-ADON	*F. austroamericanum*
49	Pinhão	3-ADON	*F. austroamericanum*
50	Pinhão	3-ADON	*F. austroamericanum*
51	Guarapuava	3-ADON	*F. austroamericanum*
52	Guarapuava	3-ADON	*F. cortaderiae*
53	Guarapuava	15-ADON	*F. graminearum*
54	Pinhão	3-ADON	*F. austroamericanum*
55	Pinhão	não estabelecido	não identificado
56	Pinhão	3-ADON	*F. austroamericanum*

* identificação realizada com os dados deste estudo e com os obtidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá- UEM.

6.2. Severidade em espécies Fmer, Faus e Fgra

O potencial germinativo do lote utilizado no experimento para quimiotipagem em planta dos isolados de *Fusarium* foi de 97% de plântulas normais, e vigor de 92 %, mostrando-se adequado para o experimento.

A avaliação das plantas de trigo realizada aos dezessete dias após a inoculação dos isolados genotipados como NIV, 3-ADON e 15-ADON evidenciou que não houve diferença significativa na severidade da FET tanto entre genótipos, quanto entre isolados (Tabela 12) o que torna os resultados de quantificação de micotoxinas robustos por não serem possíveis de apresentarem erros devido a menor ou maior incidência do patógeno nas espigas de trigo.

Tabela 12. Resultados obtidos da leitura de severidade dos genótipos de *Fusarium meridionale* (Fmer), *F. austroamericanum* (Faus) e *F. graminearum* (Fgra) inoculados em plantas de trigo crescidas em vasos em casa de vegetação, aos dezessete dias após a inoculação.

Isolado	**Espécie (genótipo)**	**Severidade (%)^{ns}**
20		33,66
5		34,28
6	Fmer (NIV)	34,28
11		27,22
7		33,81

2		33,81
54	Faus (3-ADON)	27,41
51		41,35
48		32,57
42		32,25
41		33,41
44		30,19
34	Fgra (15-ADON)	43,6
31		38,35
38		35,03
22		46,19
27		45,88
36		47,07

[ns] não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

6.3. Produção de micotoxinas por isolados do CFg em meio de cultura e em planta

Quando comparado a produção de NIV pelos isolados da espécie Fmer não diferiu estatisticamente quando crescidos em plantas de trigo e também em meio de arroz (Tabela 13). Já, quando comparado a quantidade de NIV produzida em plantas de trigo com a produzida em meio arroz, a produção em planta de trigo foi significativamente maior (Tabela 13). Para a produção de 3-ADON e 15-ADON dos isolados Fmer não houve diferença estatística quando comparado a quantidade produzida por cada isolado, assim como quando comparado a quantidade produzida em plantas de trigo e meio de arroz (Tabela13). Para a produção de DON, não houve diferença na produção da micotoxina entre os isolados, porém houve diferença quando comparada a produção em plantas de trigo e meio de arroz, o que pode ser atribuído a erro experimental e deve ser melhor investigado (Tabela 13).

Tabela 13. Produção de micotoxinas em µg kg^{-1} por isolados de *Fusarium meridionale* (Fmer genótipo nivalenol) em plantas de trigo e meio de cultura de arroz. Cada valor apresentado corresponde a média de quatro repetições em plantas e três em meio de arroz quantificadas em duplicata.

*	Planta	Meio	Planta	Meio	Planta	Meio	Planta	Meio
Isolado	NIV	NIV	3ADON	3ADON	15ADON	15ADON	DON	DON
Fmer 20	1763,8 Aa	380,8 Ab	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Ba	0,0 Aa
Fmer 5	2062,6 Aa	62,8 Ab	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	4,9 Ba	0,0 Aa
Fmer 6	2472,7 Aa	748,2 Aa	1,4 A a	3,7 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	424,6 Ba	0,0 Aa

Fmer 11	1340,4 Aa	853,0 Aa	0,0 Aa	69,9 Aa	0,0 Aa	6,3 Aa	29,9 Ba	0,0 Aa
Fmer 7	2674,9 Aa	1233,5 Aa	0,0 Aa	11,8 Aa	9,5 Aa	0,0 Aa	675,8 Ba	0,0 Aa
Fmer 2	2864,4 Aa	867,2 Aa	0,0 Aa	0,1 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	195,9 Ba	0,0 Aa

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha. A comparação na coluna foi pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. A comparação na linha foi feita somente entre a quantidade da mesma toxina produzida em planta e em meio pelo teste *t Student* a 5% de probabilidade.

A produção de 3-ADON pelos isolados da espécie Faus foi váriável entre os isolados crescidos em planta (Tabela 14). Um isolado (Faus 42) apresentou diferença na produção de 3-ADON quando comparado a quantidade de micotoxinas produzidas em plantas de trigo com a quantidade produzida em meio de cultura de arroz. O mesmo aconteceu para produção de DON dos isolados Faus 42 e Faus 44 (Tabela 14). A produção de NIV e 15-ADON não diferiu estatisticamente entre si quando crescidos em plantas de trigo e também em meio de arroz e também quando comparados a produção em planta com a produção em meio (Tabela 14). A produção de 3-DON entre os isolados crescidos em meio também não apresentou diferenças estatísticas (Tabela 14). Para DON produzido em planta, dois isolados foram estatistiamente diferentes (Tabela 14).

Tabela 14. Produção de micotoxinas em µg kg^{-1} por isolados de *Fusarium F. austroamericanum* (Faus) genótipo 3-ADON em plantas de trigo e meio de cultura de arroz. Cada valor apresentado na tabela corresponde a média de quatro repetições realizadas em plantas de trigo e três em meio de arroz.

*	Planta	Meio	Planta	Meio	Planta	Meio	Planta	Meio
Isolado	**NIV**	**NIV**	**3-ADON**	**3ADON**	**15ADON**	**15ADON**	**DON**	**DON**
Faus 54	85,4Aa	96,8Aa	185,8ABDa	7044,5Aa	0 ,0Aa	957,0Aa	7286,2Aa	43395,1Aa
Faus 51	23,7Aa	18,1Aa	263,5ABa	6788,7Aa	8,0Aa	842,6Aa	10427,7Aa	18781,1Aa
Faus 48	35,4Aa	46,0Aa	361,8Aa	1613,6Aa	24,5Aa	194,4Aa	13700,6Aa	13505,8Aa
Faus 42	17,3Aa	34,9Aa	191,8ABCa	19,7Ab	6,0Aa	0,0Aa	8935,9Aa	289,6Ab
Faus 41	64,6Aa	20,8Aa	147,5BCa	985,9Aa	0,5Aa	100,9Aa	8519,5Aa	9662,1Aa
Faus 44	10,6Aa	25,0Aa	49,5Da	25,3Aa	0,0Aa	0,0Aa	4076,1Aa	183,5Ab

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha. A comparação na coluna foi pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. A comparação na linha foi feita somente entre a quantidade da mesma toxina produzida em planta e em meio de arroz pelo teste *t Student* a 5% de probabilidade.

Quando comparada a quantidade de micotoxinas produzidas entre os isolados da espécie Fgra, para todas as micotoxinas avaliadas não houve diferença estatística tanto quando crescidos em plantas de trigo como também em meio de arroz (Tabela 15). Também, não houve diferença para a produção de NIV pelos isolados quando comparado a produção em plantas de trigo com a produção em meio de arroz. Já, para produção de 3-ADON e 15-

ADON, em cinco de seis isolados a produção foi maior em meio, e para DON em dois isolados a produção foi também maior em meio e um foi maior em planta (Tabela 15).

Tabela 15. Produção de micotoxinas em µg kg^{-1} por isolados de *Fusarium graminearum* (Fgra) genótipo 15-ADON em plantas de trigo e meio de cultura de arroz. Cada valor apresentado na tabela corresponde a média de quatro repetições realizadas em planta e três em meio de arroz.

	Planta	**Meio**	**Planta**	**Meio**	**Planta**	**Meio**	**Planta**	**Meio**
Isolado	**NIV**	**NIV**	**3ADON**	**3ADON**	**15ADON**	**15ADON**	**DON**	**DON**
Fgra34	37,6Aa	91,3Aa	90,5Ab	2341,7Aa	79,8Ab	5189,9Aa	10786,2Aa	41084,1Aa
Fgra 31	9,1Aa	54,4Aa	99,3Ab	1459,2Aa	294,7Ab	6116,0Aa	12045,6Aa	38785,6Aa
Fgra 38	17,3Aa	123,3Aa	93,3Ab	2295,1Aa	261,2Ab	8579,2Aa	9145,7Ab	49624,0Aa
Fgra 22	36,1Aa	14,9Aa	65,1Aa	81,4Aa	133,9Aa	436,3Aa	7869,0Aa	695,0Ab
Fgra 37	45,3Aa	272,7Aa	94,3Ab	1834,2Aa	230,7Ab	5171,7Aa	11145,8Aa	30873,0Aa
Fgra 36	11,0Aa	11,3Aa	47,9Ab	854,6Aa	157,8Ab	2607,3Aa	7746,0Ab	20054,4Aa

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha. A comparação na coluna foi pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A comparação na linha foi feita somente entre a quantidade da mesma toxina produzida em planta e em meio pelo teste *t Student* a 5% de probabilidade.

Quando comparada a quantidade de cada micotoxina produzida entre as diferentes espécies, Fmer produziu maiores quantidades de NIV e menores quantidades de 3-ADON, 15-ADON e DON tanto em planta, quanto em meio. Porém, a quantidade produzida foi muito baixa, podendo ser erro experimental. Faus produziu elevadas quantidades de 3-ADON em meio de arroz e de DON tanto em planta quanto em meio, e baixas quantidades de NIV em meio e em plantas, de 3-ADON em planta e de 15-ADON em planta e meio (Tabela 16). Fgra produziu elevadas quantidades de 3-ADON e 15-ADON em meio de arroz e de DON tanto em planta quanto em meio, e baixas quantidades de NIV em meio e em plantas, e de 3-ADON e 15-ADON em planta (Tabela 16).

Tabela 16. Produção de micotoxinas em µg kg^{-1} pelas espécies *F. meridionale* (Fmer genótipo NIV), *F. austroamericanum* (Faus genótipo 3-ADON) e *F. graminearum* (Fgra genótipo 15-ADON) em plantas de trigo e meio de cultura de arroz. Cada valor obtido em planta corresponde a média de 48 leituras oriundas de seis isolados por espécie e quatro repetições por isolado, lidas em duplicata. Para arroz foram três repetições por isolado, perfazendo 36 leituras.

	Planta	Meio	Planta	Meio	Planta	Meio	Planta	Meio
Especie	**NIV**	**NIV**	**3ADON**	**3ADON**	**15ADON**	**15ADON**	**DON**	**DON**
Fmer	2196,50Aa	690,91Ab	0,23Ca	14,25Ba	1,58Ba	1,06Ba	221,85Ba	0,01Ba
Faus	39,55Ba	25,00Ba	199,97Aa	2746,28Aa	6,48Ba	349,16Ba	8824,31Aa	14302,85Aa
Fgra	26,11Ba	94,63Ba	81,72Bb	1477,69Aa	81,72Ab	4683,39Aa	9789,70Ab	30186,02Aa

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha. A comparação na coluna foi pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A comparação na linha foi feita somente entre a quantidade da mesma toxina produzida em planta e em meio pelo teste *t Student* a 5% de probabilidade.

Para a espécie Faus não houve influência do substrato na quantidade de micotoxinas produzidas (Tabela 16). Já para a espécie Fmer o crescimento em meio de arroz subestimou a capacidade de produção de NIV por esta espécie em 318%. Para a espécie Fgra o resultado foi o oposto, o meio de arroz superestimou a produção de 3-ADON em 1808%, de 15-ADON em 5731%, e de DON em 308% quando comparado ao cultivo em planta.

6.4. Isolados com genótipos indefinidos

Os isolados listados na Tabela 11 já haviam sido previamente identificados quanto ao genotipo pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá- UEM. Dentre os isolados previamente identificados como NIV, dois foram genotipados neste estudo como 3-ADON (1 e 3), um como 15-ADON (19) e um (18) não foi possível determinar o genótipo (Tabela 11). Dentre os previamente identificados como 15-ADON, dois foram aqui genotipados como NIV (20 e 26) e três (29, 30 e 37) não foi possível identificar o genotipo (Tabela 11). Já, entre os previamente identificados como 3-ADON somente dois (45 e 55) não foi possível estabelecer o genótipo (Tabela 11).

O estabelecimento de cultura monospórica dos isolados 18, 26, 45 e 55 e posterior quimiotipagem evidenciou que nenhum deles produziu as micotoxinas NIV ou 3-ADON ou 15-ADON (Tabela 17). O sequenciamento da região ITS destes isolados e posterior comparação com sequências já depositadas no *GenBank* mostrou que o isolado 18 pertence a espécie *F. avenaceum* (identidade de 100%, e-value 0,0), o isolado 26 a espécie *F. asiaticum* (identidade de 100%, e-value 0,0), o isolado 45 a espécie *F. proliferatum* (identidade de 99,80%, e-value 0,0) e o isolado 55 a espécie *F. avenaceum* (identidade de 100%, e-value 0,0).

Tabela 17. Produção de micotoxinas por isolados fúngicos os quais não foi possível estabelecer um genótipo tricoteceno.

Isolado	Quim*	NIV		3-ADON		15-ADON		DON		ZEA	
		Arroz	Trigo	Arroz	Trigo	Arroz	Trigo	Arroz	Trigo	Arroz	Trigo
18	não id	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	245	143	<LQ	<LQ
26	não id	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	89	157	5.063	10.898
45	não id	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	330	<LQ	<LQ
55	não id	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	214	375	<LQ	<LQ

Quim - Quimiotipo; <LQ - menor que o limite de detecção (50µg Kg^{-1}).*Não identificado

6.5. Potencial de inibição de crescimento micelial entre isolados de *Fusarium*

Os resultados apresentados até aqui evidenciam que no estado do PR a espécie Fmer é eficiente na produção de NIV, entretanto, em rotinas de quantificação de micotoxinas em grãos de trigo em empresas processadoras de grãos do estado esta micotoxina não é detectada. Essa não detecção de NIV levanta o questionamento do porquê desta não detecção. Inicialmente acreditava que não haviam isolados bom produtores de NIV em plantas de trigo no estado, no entanto os resultados aqui obtidos negam esta hipótese. A partir deste resultado, fica a dúvida se as espécies de genótipo 3-ADON e 15-ADON, seriam capazes de inibir o crescimento das espécies de genótipo NIV. No experimento realizado para verificar esta hipótese, quando os isolados genotipados como NIV foram submetidos ao crescimento na mesma placa com isolados genotipados como 3-ADON ou 15-ADON, não apresentaram diferença significativa de crescimento em nenhum dos dias de avaliação (Figura 20). Este resultado evidencia que os isolados das espécies Faus e Fgra por nós avaliados não inibem o crescimento das espécie Fmer.

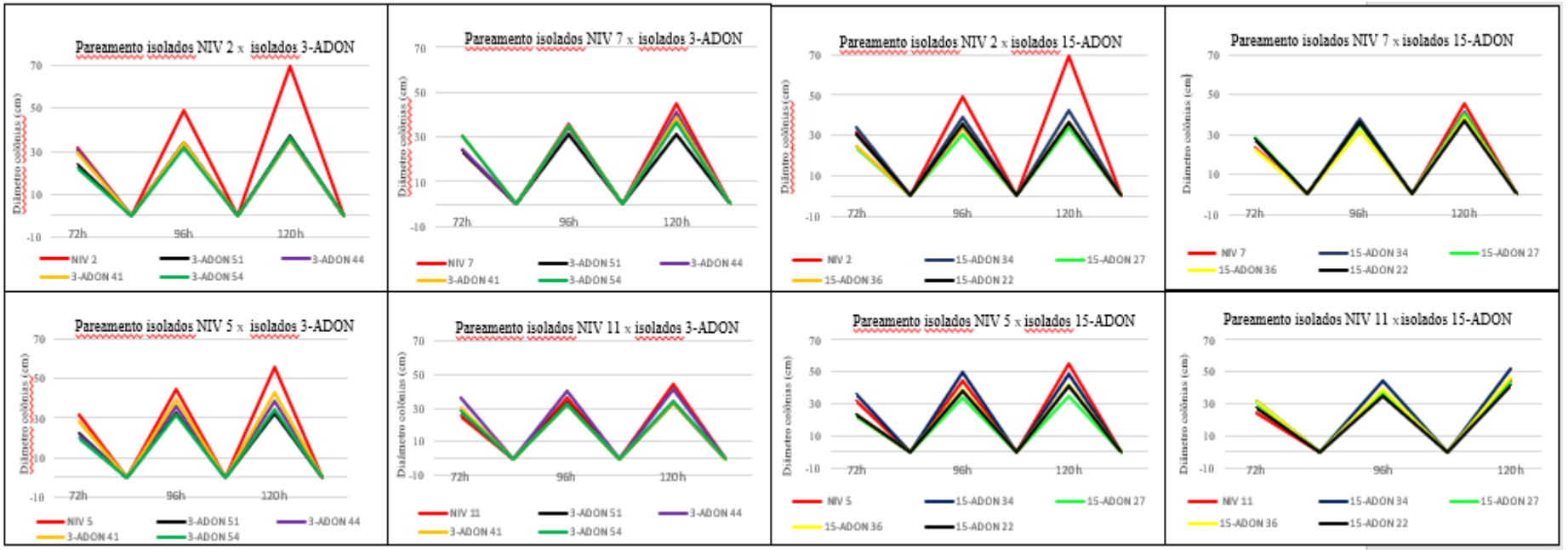

Figura 20. Potencial de inibição de crescimento micelial entre isolados da espécie *Fusarium meridionale* (NIV) versus isolados das espécies *F. austroamericanum* (3-ADON) e *F. graminearum* (15-ADON), crescidos em meio BDA a 25 °C por 10 dias. Os isolados Fmer 2, 5, 7 e 11 foram submetidos ao teste de pareamento com os isolados Faus 51, 44, 41 e 54 e com os isolados Fgra 34, 27, 36 e 22, com avaliações após 72, 96 e 120 h após a inoculação. Médias seguidas da mesma letra na mesma avaliação não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

6.6. Diversidade e estruturação genética de isolados das espécies Fmer, Faus e Fgra do estado do Paraná

Os 10 primers ISSR amplificaram 128 bandas e destas, 112 (87%) foram polimórficas e utilizadas nas análises estatísticas. Os dados de cada primer ISSR estão detalhados na Tabela 18.

Tabela 18. Relação dos 10 primers ISSR utilizadas na avaliação da diversidade e estrutura genética de isolados de *Fusarium meridionale*, *F. austroamericanum e F. graminearum*. Temperatura de anelamento em °C (TAºC), número total de fragmentos amplificados (NT), porcentagem de polimorfismo (P).

Primer	Sequencia*	TAºC	NT	P
UBC 807	$(AG)_8T$	52	14	71,42%
UBC 808	$(AG)_8C$	50	15	73,33%
UBC 809	$(AT)_8T$	55	13	92,30%
UBC 811	$(GA)_8C$	53	8	87,50%
UBC 827	$(AC)_8G$	53	15	100,0%
UBC 835	$(AG)_8YC$	54	13	92,30%
UBC 848	$(CA)_8RG$	55	11	72,72%
UBC 861	$(ACC)_6$	52	14	92,85%
UBC 868	$(GGA)_6$	50	12	100,0%
UBC 873	$(GACA)_4$	50	13	92,30%

* Y = (C,T); R = (A, G)

A espécie Fgra foi a mais basal e mais próxima de Faus do que de Fmer (Figura 21). Os isolados de Fgra apresentaram o maior polimorfismo e foram mais diversos geneticamente tanto pelo índice de diversidade de Nei como pelo índice de Shannon (Tabela 19). O indice de diferenciação genética (G_{st} = 0.27) evidenciou estruturação muito alta e consequente, elevada diferenciação das espécies. Os dendrogramas obtidos com base na distância genética de Nei considerando indivíduos (Figura 21) e também populações (Figura 22) evidenciam que as espécies Fmer e Faus são mais geneticamente relacionadas. A análise de coordenadas principais (PCoA) reduziu a dimensionalidade dos dados e permitiu a observação da estrutura espacial dos isolados e a observação de sua contribuição para a diversidade das espécies avaliadas (Figura 23). As coordenadas 1, 2 e 3 explicam 20,88, 12,79 e 10,42%, da variabilidade genética observada, respectivamante. A explicação acumulada das três coordenadas foi de 44,09% (Figura 23). Também, a PCoA permitiu observar que os isolados apresentaram-se estruturados de acordo com a espécie que pertencem excetuando dois

isolados de Faus que foram geneticamente mais semelhantes com Fmer (Figura 23), corroborando com o agrupamento observado no dendrograma (Fig 21).

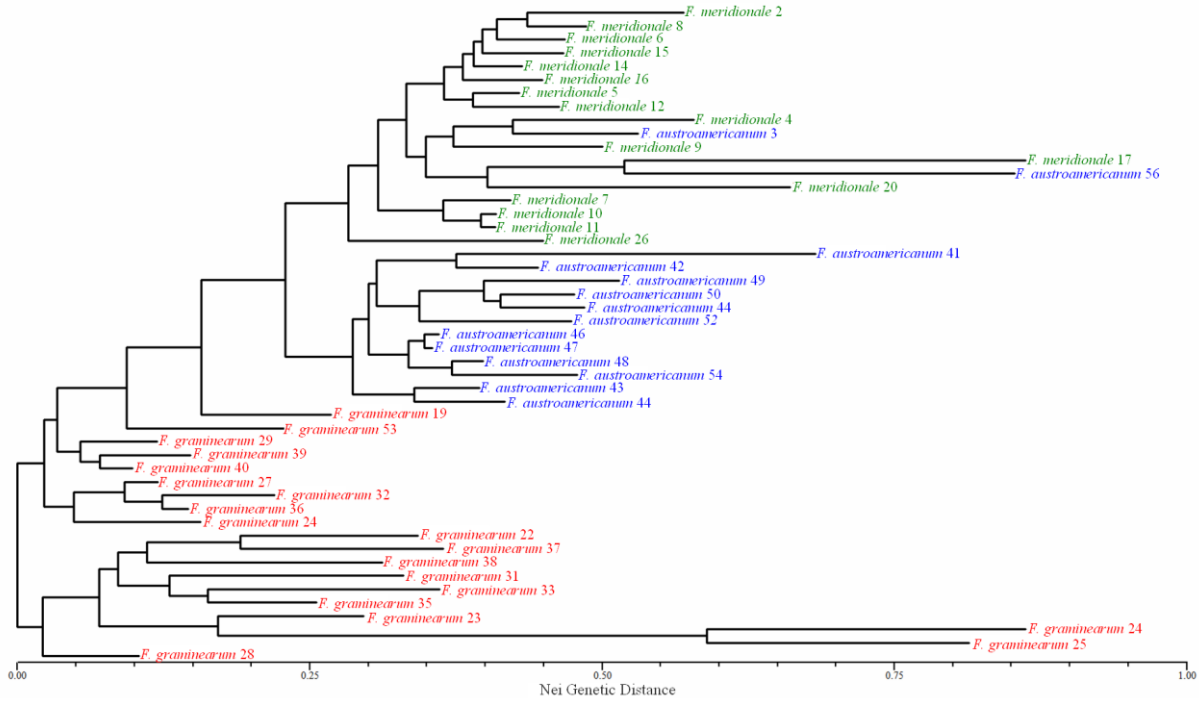

Figura 21. Dendrograma baseado na distância genética de Nei dos isolados de *Fusarium graminearum*, *F. austroamericanum* e *F. meridionale* coletados no Sul do Brasil. O dendograma foi obtido utilizando 112 loci ISSR (*Inter-semple sequence repeat*) e pelo método de agrupamento neighbor joining.

Tabela 19. Indice de diversidade genética de Shannon (I), diversidade genética de Nei (h), e porcentagem de polimorfismo (P), observado nas espécies de *Fusarium* coletados no Sul do Brasil.

População	**I**	**h**	**P%**
F. graminearum	0,37	0,25	77,04 %
F. meridionale	0,31	0,20	67,41 %
F. austroamericanum	0,29	0,19	60,00 %
Total	0,44	0,29	87,00%

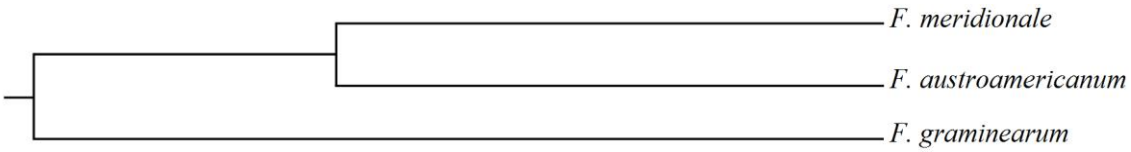

Figura 22. Relação genética baseado na distância genética de Nei das espécies de *Fusarium* coletados no Sul do Brasil. O dendrograma foi obtido utilizando 112 loci ISSR (*Inter-semple sequence repeat*).

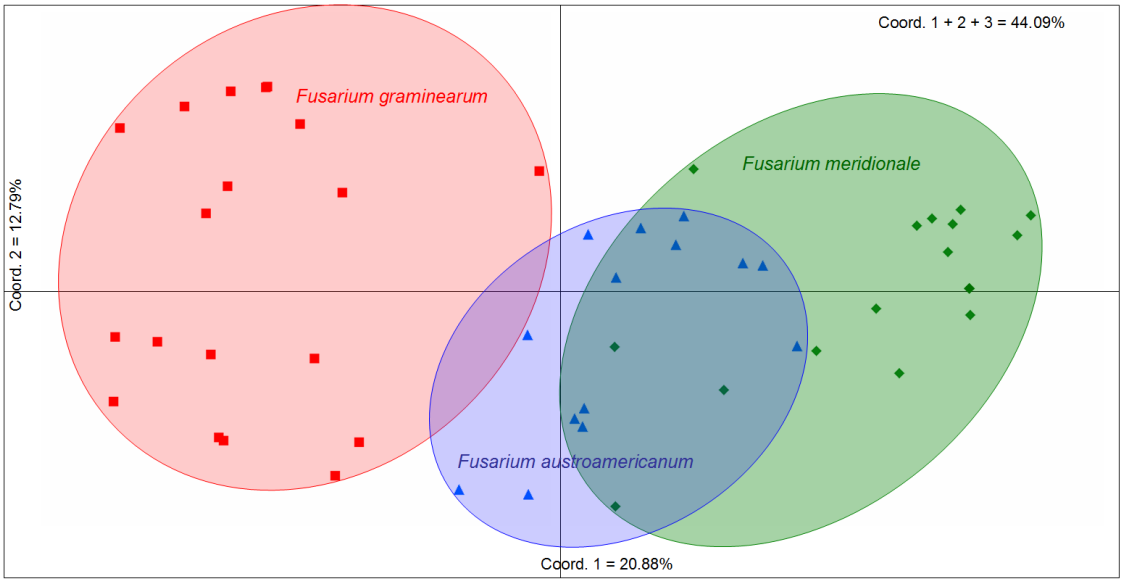

Figura 23. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos isolados das espécies de *Fusarium* coletados no Sul do Brasil, com base em 112 loci ISSR (Inter-semple sequence repeat).

Nas simulações feitas pelo programa STRUCTURE com abordagem Bayesiana, as maiores probabilidades foram para os números de Ks (clusters, grupos genéticos) de dois e quatro (Figura 24). Em K=2 as espécies Fmer e Faus apresentam predominância do grupo genético representado pela cor verde, enquanto Fgra mostrou predominância do grupo genético representado pela cor vermelha (Figura 25). Em K=4 cada espécie apresentou predominância de um grupo genético (Figura 25). O grupo genético da cor magenta é o que está distribuído entre as três espécies estudadas (Figura 25).

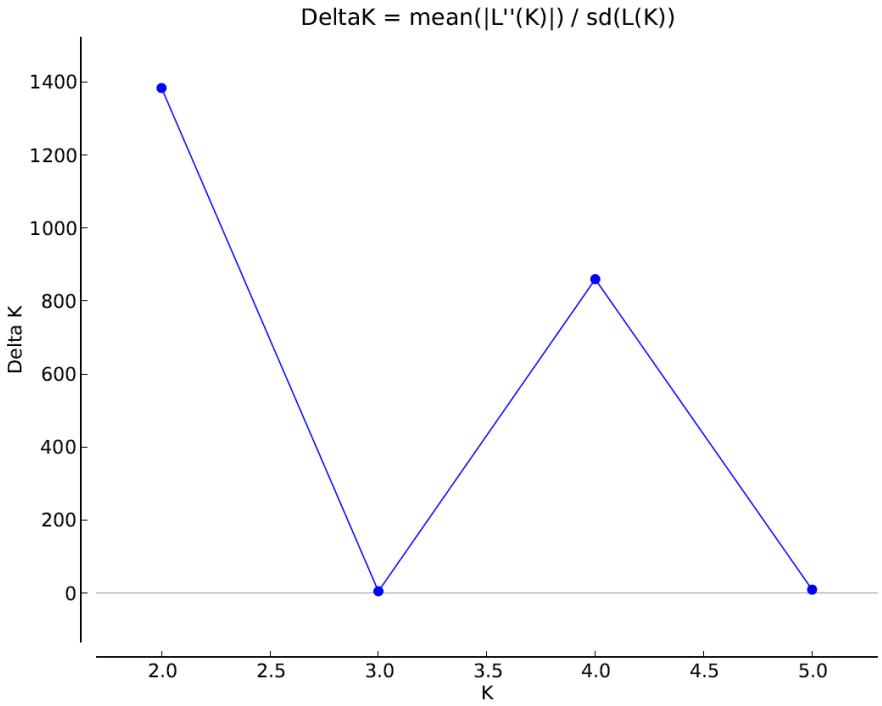

Figura 24. Determinação do número ótimo de K (grupos genéticos) em *Fusarium* spp. pelo método Bayesiano. O ponto de intersecção entre o maior valor no eixo Y com o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos).

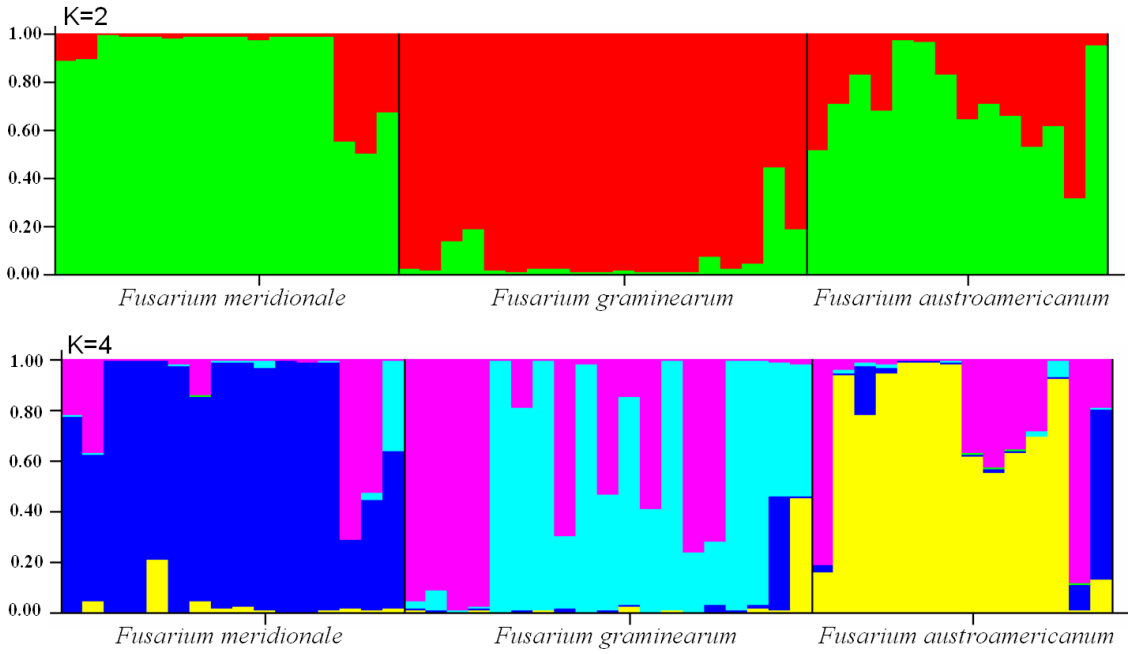

Figura 25. Estrutura genética das populações de *Fusarium* avaliadas neste estudo de acordo com a divisão em dois (K=2) e quatro (K=4) grupos genéticos obtidos pela análise Bayesiana.

7. DISCUSSÃO

7.1. Genotipagem molecular

Os marcadores específicos para os genes *Tri 3* e *Tri 12* utilizados neste estudo foram eficientes na identificação dos isolados avaliados. Segundo Ward et al. (2002), a genotipagem dos genes *Tri3* e *Tri12* é um método genético rápido e eficaz de identificação de isolados produtores de NIV ou 3-ADON ou 15-ADON, e também, indica que o uso da técnica em programas de monitoramento global de contaminação de cereais pode mostrar as diferenças biogeográficas da distribuição dos quimiotipos. Também, Wei et al. (2017) e Pasquali; Miguelli (2014), apontam que os ensaios mais robustos para identificação de genótipos tricotecenos de isolados do CFg são os que utilizam os marcadores para os genes *Tri3* e *Tri12*. Neste sentido, neste estudo foi considerado suficiente os resultados obtidos pela genotipagem dos genes *Tri3* e *Tri12* para seleção de isolados para a quimiotipagem em planta e em meio de cultura.

7.2. Isolados com genótipos indefinidos

A genotipagem dos isolados 1, 13, 18, 26, 30, 45 e 55 não foi possível devido estes apresentarem padrão para diferentes genótipos para cada gene utilizado. Resultados semelhantes foram observados na Argentina, onde pesquisadores utilizando PCR multiplex para os genes *Tri3*, *Tri7* e *Tri13* para determinar o genótipo de 116 linhagens do CFg coletados de três locais, evidenciaram que nove isolados apresentaram genótipo misto (DON/NIV) (REYNOSO et al., 2011). No entanto, quando estes genótipos foram quimiotipados, produziram somente DON. O estudo concluiu que as populações argentinas de Fgra são semelhantes às do trigo em outras partes do mundo, em que todas as linhagens produziram DON/15-ADON. Entretanto, aproximadamente 8% dos isolados testados foram diagnosticados incorretamente pela genotipagem como produtores de DON/NIV e eram apenas produtores de DON por análise química (REYNOSO et al., 2011). O genótipo DON/NIV é inesperado e sugere que os isolados com este genótipo podem produzir as micotoxinas NIV e DON simultaneamente e só poderiam ser derivados de cruzamentos entre espécies do CFg, hipótese que não pode ser descartada até a quimiotipagem. Como nesse estudo a genotipagem dos isolados 1, 13, 18, 26, 30, 45 e 55, foi repetida três vezes, suspeitávamos de contaminação ou a possibilidade destes isolados serem híbridos.

O estabelecimento de cultura monospórica dos isolados 18, 26, 45 e 55 e posterior quimiotipagem evidenciou que nenhum deles produziu NIV ou 3-ADON ou 15-ADON

(Tabela 17). O sequenciamento da região ITS (*Internal Transcriber Spacer*) destes isolados evidenciou que estes pertecem a outras espécies de *Fusarium*. Esta observação contraria a hipótese de ocorrência de híbridos de espécies do CFg nas áreas tritícolas do Paraná. Não identificar a ocorrência de híbridos traz um certo conforto a cadeia produtiva de trigo, pois sabe-se que os tricotecenos podem ter um papel na virulência e agressividade do patógeno (DESJARDINS et al., 1993) e a presença de dois tricotecenos no mesmo isolado poderia aumentar a virulência do isolado, dificultando o manejo da FET.

7.3. Produção de micotoxinas por isolados do CFg em meio de cultura e em planta

As espécies Fmer, Faus e Fgra avaliadas nesse estudo foram eficientes na produção de uma ou mais toxinas (Tabelas 13 a 16). Fmer foi eficiente na produção somente de NIV, Faus na produção de 3-ADON e DON, e Fgra na produção de 3-ADON, 15-ADON e DON. Também, a quantidade destas micotoxinas foi variável pelos diferentes isolados da mesma espécie. As espécies do CFg apresentam diferentes quimiotipos em diferentes regiões do mundo (WARD et al., 2008; YLI-MATTILA et al., 2009; NIELSEN et al., 2011), e apesar da possibilidade de haver mais de um quimiotipo em uma região, sempre há o predomínio de um destes (KHALED et al., 2016). Quimiotipos produtores de DON ocorrem em todo mundo, já os quimiotipos produtores das demais micotoxinas são específicos de algumas regiões do globo (QIU; SHI, 2014). Neste sentido, o conhecimento do potencial de produção de micotoxinas das espécies do CFg de uma determinada região é fundamental para a elaboração de estratégias para garantia da segurança alimentar. Para o Sul do Brasil, estudos utilizando genotipagem por PCR têm demostrado a predominância de Fgra genótipo DON/15-ADON e Fmer genótipo NIV e, baixa frequência de Faus genótipo 3-ADON (SCOZ et al., 2009; DEL PONTE et al., 2015; TRALAMAZZA et al., 2016). Referente aos estudos de quimiotipagem, a avaliação tem sido majoritariamente para a presença da micotoxina DON (DEL PONTE et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SAVI et al., 2014; SILVA et al., 2015; CALORI-DOMINGUES et al., 2016; DUFFECK et al., 2017; TRALAMAZZA et al., 2016; MALLMANN et al., 2017). Para detecção de NIV os estudos são escassos (DEL PONTE et al., 2012; CALORI-DOMINGUES et al., 2016). A maior avaliação de DON por quimiotipagem é esperada, uma vez que esta micotoxina é a prevalente nos demais países da América do Sul (GONZÁLES et al., 2008; PAN et al., 2009) e também possui níveis em alimentos determinados por legislações em diversos países (PEREIRA et al., 2014; ANVISA, 2017). O reduzido estudo para detecção de NIV, associado à especificidade da produção de

NIV por Fmer, a considerável toxicidade desta micotoxina e a ocorrência no Sul do Brasil, nos leva a emitir um alerta sobre a necessidade de mais estudos que evidenciem a necessidade de avaliação da micotoxina NIV em grãos de trigo oriundos do Sul do Brasil, afim de garantir a segurança alimentar dos consumidores. Porém, deve haver subsídios para as empresas e setores de controle de qualidade em relação a implantação dessas análises nas rotinas, pois a técnica de detecção e quantificação de micotoxinas ainda é extremamente cara. Em Laboratórios no Brasil que possuem essa tecnologia, a análise de uma micotoxina pode custar em média R$ 200,00.

7.4. Especificidade na produção de micotoxinas por *F. meridionale*, *F. austroamericanum* e F. *graminearum*

Os isolados de Fmer foram os que apresentaram maior homogeneidade na produção de micotoxinas, mostrando serem altamente especializados na produção de Nivalenol (Tabela 13). Sampietro et al. (2012) avaliando a produção de tricotecenos tipo B por isolados de Fmer oriundos de campos de milho da Argentina observaram que 51% dos isolados produziram somente NIV, 41% produziram NIV em altas quantidades e baixas quantidades de DON, e 8% produziram DON em altas quantidades e baixas quantidades de NIV. Estes dados são contrastantes com o apontado por Munkvold (2017) onde, em um trabalho de revisão aponta que Fmer é deficiente em estudos em relação à capacidade de produção de micotoxinas e parece ser específica na produção de NIV. No presente estudo, a produção simultânea e significativa de NIV e 3-ADON e/ou 15-ADON não foi observada em nenhum isolado Fmer. Também, nenhum dos isolados desta espécie produziu DON em quantidades relevantes (Tabela 13) estando de acordo com o apontado por Munkvold (2017). Outra informação importante é que apesar de Fmer genótipo NIV ter sido amplamente detectado em milho na Argentina (SAMPIETRO et al., 2010; SAMPIETRO et al., 2011; SAMPIETRO et al., 2012), esta espécie ainda não foi detectada atacando campos de trigo naquele país (ALVAREZ et al., 2009; REYNOSO et al., 2011; MALBRÁN et al., 2014; ORTEGA et al., 2016). Neste sentido, é possível inferir que os isolados de Fmer são produtores eficazes de NIV, e que acometem as plantações de trigo no estado do Paraná, e estes podem possuir uma constituição genética única, diferenciando dos isolados de Fmer ocorrentes em milho na Argentina. Esta condição de produção elevada somente de NIV é uma constatação importante para a segurança alimentar. Quando os isolados Fmer de uma região produzem NIV e DON, os grãos contaminados podem ser detectados quantificando somente DON, micotoxina de

avaliação obrigatória pela legislação. Já, quando há alta produção de NIV e não de DON, como ocorreu nos isolados de Fmer por nós avaliados, pode haver uma ameaça a segurança alimentar, visto que NIV não possui obrigatoriedade de avaliação pela legislação da maioria dos países, conforme portarias regulamentares emitidas por cada país.

Os isolados de Faus apresentaram alta variabilidade quanto a produção de 3-ADON e DON e baixa e homogênea produção de 15-ADON e NIV (Tabela 14). Todos os isolados Faus por nós estudados são do genótipo 3-ADON, assim o padrão de produção de micotoxinas foi de acordo com o esperado. Na literatura são escassos os trabalhos de quantificação de micotoxinas utilizando isolados Faus, porém já foi observado que esta espécie pode produzir DON ou NIV (MUNKVOLD, 2017). No Brasil, os trabalhos tem sido de genotipagem de isolados oriundos de diversos campos de trigo (SCOZ et al., 2009; ASTOLFI et al., 2011; ASTOLFI et al., 2012) e quimiotipagem utilizando grãos de trigo destas regiões (FURLONG et al., 1995; DEL PONTE et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Com base nos resultados obtidos realiza-se correlações entre os genótipos dos isolados e o tipo de micotoxinas encontradas nos grãos, obtendo uma relação indireta. Neste sentido, este estudo auxilia no entendimento desta relação de forma direta, ou seja, estabelecendo a micotoxina produzida por cada isolado. Interessantemente a maioria dos isolados Faus deste estudo foram mais efetivos na produção de DON a 3-ADON (Tabela 14). Esta constatação é importante, pois facilita a detecção de contaminação por micotoxinas nos grãos oriundos de regiões com ocorrência da espécie Faus, considerando que os ensaios para detecção de DON são obrigatórios pela legislação brasileira. No entanto é preocupante para os agricultores, visto que isolados com maior produção de DON são mais fitotóxicos, e consequentemente podem ser mais agressivos em campo (WARD et al., 2008; VON DER OHE et al., 2010; PURI; ZHONG, 2010).

Os isolados Fgra foram efetivos na produção de 3-ADON em plantas e na produção de 15-ADON e DON em meio e em planta (Tabela 15). *F. graminearum* é a espécie do CFg mais estudada e já foi descrita com capacidade de produzir todas as micotoxinas avaliadas nesse estudo (MUNKVOLD, 2017). Porém, a produção de NIV por isolados da espécie é menos frequente. Os resultados do estudo aqui realizado evidenciam que os isolados de Fgra por nós estudados são efetivos na produção de grande quantidade de 3-ADON, 15-ADON e DON, porém produzindo mais a micotoxina DON (Tabela 15). Assim como Faus, esta é uma informação preocupante uma vez que DON é mais fitotóxico (WARD et al., 2008; PURI; ZHONG, 2010; VON DER OHE et al., 2010; CHEAT et al., 2015), podendo causar mais

perdas nas plantações. No entanto, considerando que a legislação brasileira determina a quantificação de DON em lotes de sementes de trigo para alimentação humana, esta espécie quando comparada com Fmer apresenta menor potencial tóxico em humanos e animais e, consequentemente menor risco à segurança alimentar.

7.5. Influência do substrato na produção de micotoxinas

Para as espécies Fmer e Fgra a quantidade da micotoxina produzida foi influenciada pelo substrato utilizado (Tabela 16). Esta diferença na produção de micotoxina quando avaliado em planta e em meio de arroz tem sido relatada em espécies de *Fusarium* (VOGELGSANG et al., 2008; KOKKONEN et al., 2010; KOKKONEN et al., 2012; CASTANÃRES et al., 2014). Jestoi et al. (2008) observaram que a produção de algumas micotoxinas (dentre estas DON) por algumas espécies do CFg difere quando submetida ao crescimento em meio de arroz e planta, e alerta para possíveis erros no uso de meio arroz como parâmetro para predizer a capacidade de produção de micotoxinas de um isolado ou espécie. Este trabalho foi o primeiro a avaliar e comparar a produção de micotoxinas em plantas e em meio, a partir de Fmer e Faus. Esses resultados apontam que a utilização de meio arroz pode ser utilizada para a espécie Faus com obtenção de resultados semelhantes aos obtidos em plantas de trigo. Porém, para a espécie Fmer o uso do meio de arroz leva a uma subestimação da produção de NIV em 318%, e para Fgra uma superestimação da produção de 3-ADON em 1808%, de 15-ADON em 5731%, e de DON em 308%. Neste sentido, é preciso tomar cuidado ao estabelecer parâmetros do potencial de produção de micotoxinas por isolados ou espécies de *Fusarium* utilizando meio de arroz. Este cuidado deve ser especialmente com a espécie Fmer, a qual o meio de arroz parece induzir a expressão de genes com potencial de produção de NIV.

A maior produção de NIV em planta do que em meio pela espécie Fmer pode evidenciar alta especificidade pelo hospedeiro. O processo evolutivo molda a relação estabelecida entre os patógenos e seus hospedeiros tornando esta relação cada vez mais específica (KARASOV et al., 2014). Neste sentido, provavelmente substâncias produzidas pela planta de trigo desencadeiam algum processo em Fmer que eleva a produção de NIV, como já citado na literatura para DON (GARDINER et al., 2010). Em espécies de *Fusarium* os tricotecenos têm sido relatados como possíveis fatores de virulência e/ou facilitadores do avanço da infecção no hospedeiro (KHALEDI et al., 2016; TUNALI et al., 2012; PANTHI et al., 2014; SPOLTI et al., 2013). Neste sentido, a elevação da produção de micotoxina pode

estar relacionada ao estresse causado pelo hospedeiro no fungo, fazendo com que este responda para sua defesa (FOROUD et al., 2012). Também, pode estar relacionado a melhor adaptação do patógeno ao hospedeiro, facilitando o metabolismo do patógeno e consequente melhor aptidão deste (GARDINER et al., 2010). No CFg a especificidade da espécie e/ou isolados para determinados hospedeiros tem sido relatada (BOUTIGNY et al., 2011). Um exemplo desta especificidade está na observação onde Fmer foi detectado com elevada prevalência nos campos de trigo do Sul do Brasil (SCOZ et al., 2009; DEL PONTE et al., 2015; TRALAMAZZA et al., 2016) e na Argentina, esta espécie não foi detectada em grãos de trigo (ALVAREZ et al., 2009; REYNOSO et al., 2011; MALBRÁN et al., 2014; ORTEGA et al., 2016). Naquele país, até o momento Fmer foi detectado atacando somente plantações de milho (SAMPIETRO et al., 2010; SAMPIETRO et al., 2011; SAMPIETRO et al., 2012). Neste sentido, a produção de NIV pelos isolados de Fmer do Sul do Brasil em plantas de trigo e a co-ocorrência com isolados da espécie Fgra, apta a produzir DON, nos alerta para a necessidade de quantificação de ambas as micotoxinas em grãos de trigo oriundos desta região visando a segurança alimentar.

Na espécie Fgra, a comparação da produção de micotoxinas entre planta e meio evidênciou que a planta parece inibir o potencial de produção tanto de 3-ADON quando de 15-ADON e em menor quantidade a produção de DON (Tabela 16). Fgra produtora de DON/15-ADON tem sido relatada como a micotoxina de maior prevalência na América do Sul (VAN DER LEE et al., 2015) evidenciando ampla adaptabilidade desta espécie ao trigo produzido na região. Pereira et al., (2020) também encontraram em seus estudos a dominância de Fgra, quimitipo 15-ADON, seguido por Fmer, quimiotipo NIV em uma frequência semelhante nas 17 regiões do estado do Paraná onde realizam as coletas de isolados, e, confirmarm menor ocorrência de isolados produtores de NIV de Faus e *F. cortaderiae* em epidemias de FET. Porém, uma descoberta importante foi que as espécies do CFg produtoras de NIV foram mais prevalentes na cevada do que no trigo, concordando com estudos anteriores no estado do RS (ASTOLFI et al., 2012; DEL PONTE et al., 2015; MACHADO et al., 2017).

O tricoteceno DON tem sido relatado como um importante fator na agressividade de Fgra em plantas (PANTHI et al., 2014; NICOLLI et al., 2015). Neste sentido, devido a alta pressão do patógeno, é provável que o hospedeiro desenvolva mecanismos que possam interferir na produção das micotoxinas tricotecenos (FOROUD et al., 2012), podendo auxiliar na explicação da redução da produção das micotoxinas por Fgra quando inoculado em plantas

de trigo. Mesmo com a inibição observada, os isolados de Fgra por nós estudados mostraram-se excelentes produtores de DON (Tabela 16). Aliada à aptidão para a produção de DON a observação que Fgra é a espécie prevalente na América do Sul, a regulamentação relacionada à segurança alimentar em vigência nos países desta região determina a quantificação de DON em grãos de trigo. Neste sentido, os dados obtidos para Fgra nesse estudo reforçam a necessidade e importância da regulamentação da presença de DON em trigos oriundos da região Sul do Brasil, garantindo assim a segurança alimentar dos consumidores.

Feksa et al., (2019) sugerem que há mudanças anuais nas frequências das espécies e essas são influenciadas pela diminuição da população dominante de Fgra em favor de outros contribuintes. Por exemplo, em 2012, a prevalência de *F. poae* atingiu o pico na cevada e *Fmer* atingiu o pico no trigo e na cevada. Neste mesmo ano, o clima foi relativamente mais seco e a incidência da FET nas parcelas não tratadas de experimentos foi baixa. Nesse contexto, compreender o espectro geral de patógenos causadores da FET e seu potencial de micotoxinas podem ajudar a informar os programas de monitoramento de toxinas quando as condições são menos favoráveis para Fgra. A hipótese de que os fatores ecológicos ou sazonais podem conduzir essas flutuações devem ser mais investigados, pois pode causar riscos a segurança alimentar.

A análise conjunta dos dados deste estudo associados à literatura nos permite concluir que Faus é uma espécie que não oferece riscos a segurança alimentar em trigos oriundos do estado do Paraná, devido a baixa frequência e capacidade de produção de micotoxinas. Fgra é uma espécie que requer muita atenção, pois possui alta prevalência, alta agressividade em campo e alta capacidade de produção de DON. Porém, Fgra, e é uma micotoxina considerada como obrigatória nas análises de rotina das empresas processadoras de grãos. Por fim, apontamos Fmer como uma espécie que requer mais estudos, por apresentar alta prevalência no Sul do Brasil, ser excelente produtora de NIV em planta, ser uma micotoxina altamente tóxica para os animais, e principalmente por até o momento não constar como de quantificação obrigatória pelas autoridades de vigilância em segurança alimentar no Brasil.

7.6. Potencial de inibição de crescimento micelial entre isolados das espécies Fmer, Faus e Fgra

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que a espécie Fmer ocorrente no estado do Paraná é excelente produtora de NIV, entretanto, em rotinas de quantificação de micotoxinas em grãos de trigo, em empresas processadoras de grãos do estado, esta toxina

não é detectada. A ausência de NIV levou ao questionamento sobre o por quê da não detecção. Inicialmente foi cogitado que não haviam isolados produtores de NIV no estado, no entanto os resultados obtidos neste estudo para Fmer negam esta hipótese. A partir deste resultado, foi questionado se as espécies de genótipo 15-ADON (Fgra) e 3-ADON (Faus), seriam capazes de inibir o crescimento das espécies de genótipo NIV (Fmer). Esta situação já foi observada entre algumas espécies de fungos, por exemplo em cultivo pareado de *Stenocarpella maydis* com fungos dos gêneros *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. *e Aspergillus* spp. foi observado que *Fusarium* spp. inibiu o crescimento de fungos de outras espécies (FEDRIGO, 2014). No experimento realizado nesse estudo para verificar esta hipótese, quando os isolados Fmer, produdores de NIV foram submetidos ao crescimento na mesma placa com isolados Faus, produtores de 3-ADON ou Fgra, produtores de 15-ADON, não apresentaram diferença significativa de crescimento durante o período avaliado (Figura 20). Este resultado evidencia que os isolados das espécies Fgra e Faus por nós avaliados não inibem isolados da espécie Fmer.

Diante destes resultados, o questionamento sobre o porquê da ausência de NIV nos grãos de trigo provenientes das regiões tritícolas do PR continuam sem resposta uma vez que em torno de 30% da ocorrência de FET possa ser em função de Fmer genótipo NIV (DEL PONTE et al., 2015).

7.7. Diversidade genética

A variabilidade genética é a matéria-prima da evolução pois permite a adaptação (NEVO, 1978; BARRET; SCHLUTER, 2008). Nesse sentido, o conhecimento da variabilidade genética em populações de patógenos vegetais permite prever seu comportamento adaptativo diante da resistência genética do hospedeiro e do controle químico. A capacidade de prever um provável comportamento evolutivo de um patógeno pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de manejo para reduzir perdas ou até prevenir epidemias (BURDON et al., 2006). As espécies Fgra, Fmer e Faus avaliadas neste estudo apresentaram alta variabilidade e diversidade genética, exibindo alta capacidade de adaptação. Alta estrutura genética também foi observada nas populações, corroborando o conceito de espécie filogenética proposto por O'Donnell et al. (2004).

A conclusão de alta variabilidade genética nas espécies incluídas neste estudo é evidenciada pela porcentagem de polimorfismo (Tabela 18) e individualização dos isolados no dendrograma (Figura 21). A porcentagem de polimorfismo foi superior a 60% ao

considerar espécies individualmente e 87% considerando todas as espécies (Tabela 18). Para as espécies Faus e Fmer, não havia dados anteriores sobre a porcentagem de polimorfismo na literatura. Assim, a comparação com estudos realizados com Fgra pode ajudar a entender a variabilidade nessas espécies. Para Fgra, o polimorfismo tem sido variável usando marcadores ISSR. Albayrak et al. (2016) relataram apenas 5,62% de polimorfismo em isolados de Fgra da Turquia e do Irã. Mishra et al. (2004) avaliando isolados de Fgra do Canadá relataram polimorfismo variando de 56 a 85%. Pan et al. (2016) avaliando isolados de Fgra do Uruguai observaram polimorfismo de 89,5%. Malbran et al. (2014) e Palacios et al. (2017), obtiveram respectivamente 71% e 92% de polimorfismo avaliando isolados de Fgra amostrados na Argentina. No Sul do Brasil, Astolfi et al. (2011) avaliando populações de três municípios do Rio Grande do Sul, através de marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) identificaram polimorfismo variando de 63% a 67%. Cunha et al. (2015) avaliando com marcadores ISSR para 152 isolados de *F. oxysporum* f. *cubense* amostrado em 21 municípios do Sul do Brasil obteve 81% de polimorfismo. Nesse sentido, comparar os dados obtidos neste estudo com os dados de polimorfismo para Fgra em nível global e para o gênero *Fusarium* a nível regional leva à conclusão de que as populações de Faus e Fmer aqui estudadas têm alto polimorfismo. No entanto, é importante enfatizar que os isolados das três espécies estudadas pertencem a uma pequena área geográfica, comparada à de outros estudos na literatura, o que reforça ainda mais o alto polimorfismo nessas populações. A mesma comparação acima aplicada à população Fgra avaliada neste estudo também mostrou o alto polimorfismo dessa espécie na região estudada. Os níveis de polimorfismo são informações importantes quando trabalha-se com marcadores dominantes, porque são parâmetros que indicam variabilidade genética (FEDRIGO et al., 2016; ROSA et al., 2017; MARIANO et al., 2019).

Ao comparar os valores de diversidade genética nas três espécies estudadas (Tabela 19) com os dados da literatura, observamos que os valores obtidos foram semelhantes. Mishra et al. (2004) relataram a diversidade genética de Nei variando de 0,18 a 0,23 em isolados de Fgra amostrados no Canadá. Talas et al. (2011) avaliando isolados de Fgra da Alemanha usando marcadores microssatélites obtiveram diversidade genética de Nei variando de 0,30 a 0,54 e diversidade de Shannon de 0,53 a 0,96. Para a região Sul do Brasil, Astolfi et al. (2011), utilizando marcadores AFLP, obtiveram diversidade genética de Nei variando de 0,12 a 0,13 nas populações de Fgra quando todos os loci polimórficos foram utilizados. Entre as três populações deste estudo, Fgra apresentou a maior diversidade genética, corroborando os

dados de variabilidade genética. Para as espécies de Fmer e Faus, não havia dados sobre diversidade na literatura; no entanto, comparando dados de outras espécies do gênero *Fusarium* e considerando a origem geográfica limitada dos isolados utilizados neste estudo, é possível concluir que, além da alta variabilidade genética, essas espécies também apresentam alta diversidade genética, aumentando a sua capacidade adaptativa.

Os dendrogramas obtidos para isolados (Figura 21) e populações (Figura 23) e sem politomias corroboraram com a alta variabilidade e diversidade genética. Além disso, é possível observar maior proximidade genética entre as espécies Fmer e Faus (Figura 23). Também, no dendrograma, considerando isolados (Figura 21), foi possível observar maior estruturação da espécie Fgra e também um posicionamento mais basal dessa espécie em relação às demais. Abayrak et al. (2016) avaliando 43 isolados de Fgra e 20 de *F. colmorum* da Turquia também obtiveram grupos no dendrograma de acordo com a espécie e sem politomia; no entanto, os isolados de cada grupo foram geneticamente mais semelhantes em comparação aos deste estudo. Dinolfo et al. (2010) avaliando isolados de *F. poae* da Argentina e Inglaterra não conseguiram separar os isolados de acordo com sua origem geográfica e também observaram politomias no dendrograma. Os resultados desses estudos mostram que existem diferenças na diversidade genética e na relação genética entre isolados, tanto na comparação de espécies quanto na consideração de regiões geográficas, justificando a necessidade de estudos de populações com menor cobertura geográfica para melhor entender a dinâmica da variabilidade nas espécies de *Fusarium* na escala regional. Essas informações podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o manejo do patógeno em regiões com histórico de epidemias de FET.

Os resultados da PCoA (Figura 23) corroboraram com os dendrogramas e mostraram que a variação genética está bem distribuída entre as espécies, além de ilustrar maior proximidade genética entre as espécies Fmer e Faus. *F. graminearum* foi a espécie que mais contribuiu para a variação no grupo, o que era esperado por apresentar maior variabilidade e diversidade. A análise por inferência Bayesiana mostrou que Fmer e Faus foram as espécies com maior semelhança genética ao considerar K = 2, corroborando com os dados do dendrograma e da PCoA. Além disso, ao considerar K = 4 (que também apresentou alta probabilidade de explicar a variação genética das populações), as espécies foram mais distinguíveis, onde cada uma delas apresentou um grupo genético predominante. Um dos grupos genéticos (representado pela cor magenta) não é predominante em nenhuma espécie e parece ser responsável pelas relações genéticas entre as espécies (Figura 25). O número de

grupos genéticos que melhor explica a variação genética de populações ou espécies depende do tipo de dados analisados (espécies ou populações da mesma espécie) e do tamanho da amostra. Por exemplo, Altinok et al. (2017) avaliando 200 isolados da Turquia observaram cinco grupos genéticos (K = 5) em populações de *F. oxysporum* f. sp. *melongenae*. Yerkovich et al. (2019) avaliando 75 isolados de Fgra da Argentina observaram dois grupos genéticos. No estudo aqui realizado, embora o número da amostra tenha sido menor ao dos estudos da literatura, o número de grupos genéticos que melhor explica a variação nas populações está de acordo com o esperado, considerando o número de espécies avaliadas.

Neste estudo, o índice de fixação (G_{ST} = 0,27) evidencia estrutura genética muito alta nas populações, corroborando com a proposta de O'Donnell et al. (2004) de espécies filogenéticas no CFg. Além disso, o dendrograma obtido pela distância genética de Nei ao considerar isolados (Figura 21) e espécies (Figura 22) e os dados estruturantes obtidos pela inferência Bayesiana (Figura 25) mostraram alta diferenciação genética entre as populações, o que era esperado por serem populações de diferentes espécies. No entanto, a relação genética observada entre as populações concordou com a proposta de O'Donnell et al. (2004), que identificaram uma maior relação genética entre as espécies Fmer e Faus quando comparadas com Fgra.

A ocorrência de mais de uma espécie capaz de causar FET em campos de trigo no Sul do Brasil e a alta variabilidade genética e diversidade das populações dessas espécies podem ser fatores agravantes no controle desta doença. Feksa et al. (2019), após realizar avaliações utilizando uma série de fungicidas com diferentes princípios ativos para prevenir ou controlar a FET obtida por uma mistura de 10 isolados com os genótipos 15-ADON, 3-ADON e NIV, sugeriu que a melhor estratégia para o controle da FET e a redução da produção de DON nas regiões úmidas do estado do Paraná devem envolver múltiplas aplicações de fungicidas com diferentes modos de ação. Alguns isolados utilizados neste estudo foram os mesmos utilizados no estudo de Feksa et al. (2019). Nesse sentido, é provável que a alta variabilidade genética observada no estudo aqui realizado para os membros do CFg causadores de FET em campos de trigo no estado do Paraná possa ter sido um dos fatores da variação nos resultados do controle da FET e DON encontrados por Feksa et al. (2019). Essa observação reforça a hipótese sobre a dificuldade de controlar uma doença quando ela é causada por uma série de espécies relacionadas e com alta variabilidade genética, como mostrado neste trabalho. A alta variabilidade genética e diversidade de patógenos podem contribuir para a ineficiência no uso de fungicidas para o controle da doença

(GEORGOPOULOS; SKYLAKAKIS, 1986), bem como para a ineficácia de cultivares resistentes (MCDONALD; LINDE, 2002). Isso se deve a populações com alta variabilidade e diversidade possuírem diferentes constituições genéticas, permitindo a seleção rápida de genótipos que sobrepõe o controle químico ou a resistência das cultivares. Portanto, isso reforça a hipótese de que alta variabilidade dificulta o controle da FET.

A análise geral dos dados deste estudo juntamente com a literatura, evidencia que a alta variabilidade encontrada nas populações de Fgra, Faus e Fmer que causam FET no Sul do Brasil deve ser um fator importante a ser considerado no manejo dos campos de trigo com fungicidas e por programas de melhoramento voltados à obtenção de cultivares de trigo com resistência a FET. Certamente, as estratégias de seleção nos programas de melhoramento serão mais eficazes quando a seleção de linhagens considerar mais de um isolado do agente causal da FET.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FET é uma doença importante na triticultura brasileira e o conhecimento dos agentes etiológicos é um passo importante tanto para o melhor manejo da doença como para o desenvolvimento de cultivares de trigo resistentes. Neste estudo houve contribuição para o conhecimento de um dos agentes etiológicos desta doença no Paraná, as espécies do CFg. Os resultados evidenciaram a presença de isolados do CFg com genótipo 3-ADON, 15-ADON e NIV e os isolados estudados apresentam diferenças na produção de micotoxinas quando submetidos ao crescimento em planta e em meio de arroz. Porém, não evidenciamos entre os isolados de Faus maior agressividade em relações aos isolados de Fgss e Fmer, apesar de já constatado em outras partes do mundo. Não identificamos possíveis híbridos entre as espécies estudadas capazes de produzir simultaneamente quantidades significativas de 3-ADON e NIV ou 15-ADON e NIV. Também observamos que as espécies do CFg genotipadas como 3-ADON, 15-ADON não tem potencial de inibir o crescimento das espécies genotipadas como NIV, quando crescidos em meio de cultura a base de BDA. Os dados também evidenciam que Fmer ocorre no ambiente e é específico na produção de NIV, apesar da não detecção desta micotoxina em análise de rotina em empresas processadoras de grãos no estado do Paraná. Esta não detecção pode ser explicada pela baixa prevalência e menor competitividade da espécie produtora de NIV no estado, ocorrendo em menor proporção ao Fgra. O conhecimento do potencial de produção de micotoxinas das espécies do CFg de uma determinada região é fundamental para a elaboração de estratégias para garantia da segurança alimentar. A evidência da produção de NIV por Fmer no Sul no Brasil, apesar de ainda não ser preocupante, requer mais estudos para avaliar a necessidade de avaliação da micotoxina , afim de garantir a segurança alimentar dos consumidores. Os dados genéticos do presente estudo evidenciam alta variabilidade, estrutura genética e diversidade entre as populações e espécies do CFg estudados, aumentando a capacidade adaptativa dessas populações. Essas informações são úteis a programas de melhoramento de trigo, indicando a necessidade de aumentar o número de linhagens e genótipos, visando estabelecer estratégias de manejo para reduzir perdas ou até prevenir epidemias de FET. Populações com alta variabilidade e diversidade possuem diferentes constituições genéticas, reforçando a hipótese de que alta variabilidade dificulta o controle da FET. Essa evidência nos permite alertar sobre os cuidados com o manejo químico na cultura do trigo, como não trabalhar com subdosagens e adotar a rotação de princípios ativos a base de triazóis e benzimidazóis, bem como

eventualmente fazer uso de multi-sítios de fungicidas, Para as espécies Faus e Fmer, não havia dados anteriores sobre a porcentagem de polimorfismo na literatura, onde nossa pesquisa contribui com o avanço nesta área e sinaliza a necessidade de mais estudos relacionados ao assunto. Por fim, evidenciamos alta diversidade e estruturação genética nas populações das espécies do CFg ocorrentes no Paraná o que pode ser um obstáculo no controle com fungicidas destes patógenos e também, pode dificultar na obtenção de cultivares com ampla resistência à fusariose da espiga do trigo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617–631, 2008.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology.** Amsterdam, Elsevier Academic Press, v. 5., 2004, 922 p.

ALBAYRAK, G.; YÖRÜK, E.; GAZDAĞLI, A.; SHARIFNABI, B.; Genetic diversity among *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates based on ISSR markers. **Archives of Biological Sciences**, v. 68, n. 2, p. 333–343, 2016.

ALEXANDER, N. J.; MCCORMICK, S. P.; WAALWIJK, C.; VAN DER LEE, T.; PROCTOR, R. H. The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 5, p. 485–495, 2011.

ALEXANDER, N. J.; PROCTOR, R. H.; MCCORMICK, S. P. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. **Toxin Reviews**, v. 28, n. 2/3, p. 198–215, 2009.

ALTINOK, H. H.; CAN, C.; ALTINOK, M. A. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* isolates from Turkey with ISSR markers and DNA sequence analyses. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, p. 609–621, 2017.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research,** Vol. 25, n.17, p. 3389–3402, 1997.

ALVAREZ, C. L.; AZCARATE, M. P.; PINTO, V. F. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. **International Journal of Food Microbiology,** v. 135, n. 2, p. 131–135, 2009.

AMARASINGHE, C. C.; FERNANDO, W. G. D. Comparative analysis of deoxynivalenol biosynthesis related gene expression among different chemotypes of *Fusarium graminearum* in spring wheat. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–10, 2016.

ANGELOTTI, F.; TESSMANN, D. J.; ALVES, T. C. A.; VIDAL, J. B.; FILHO, D. J.; HARAKAVA, R. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticale no sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 2, p. 177–179, 2005.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Disponível em

Http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/. Acesso em 18 de Outubro de 2019, 2016.

ANVISA. Rdc Nº 138, de 8 de Fevereiro de 2017. **Ministério da Saúde - MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, p. 2–3, 2017.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em Http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388701/Codex+Alimentarius/. Acesso em 18 de Outubro de 2019, p. 160–164, 2018.

AOKI, T.; WARD, T. J.; KISTLER, H. C.; O'DONNELL, K. Systematics, Phylogeny and Trichothecene Mycotoxin Potential of *Fusarium* Head Blight Cereal Pathogens. **Mycotoxins**, v. 62, n. 2, p. 91–102, 2012.

APPELS, R. et al. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. **Science**, v. 361, n. 6403, eaar 7191, 2018.

ARRÚA, A. A.; ARRUA, J. M. M.; CAZAL, C. C.; IEHISA, J. M.; CABALLERO, Y. M. R.; RÍOS, D. F.; KOHLI, M. M. First report of *Fusarium poae* associated with *Fusarium* head blight in wheat in paraguay. **Plant Disease**, v. 103, n. 3, p. 580, 2019.

ASTOLFI, P.; DOS SANTOS, J.; SCHNEIDER, L.; GOMES, L. B.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J.; DEL PONTE, E. M. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 197–201, 2011.

ASTOLFI, P., REYNOSO, M. M., RAMIREZ, M. L., CHULZE, S. N., ALVES, T. C. A., TESSMANN, D. J., DEL PONTE, E. M. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 289–295, 2012.

BARCO, L.; LETTINI, A. A.; DALLA POZZA, M. C.; RAMON, E.; FASOLATO, M.; RICCI, A. Fluoroquinolone Resistance Detection in Campylobacter coli and Campylobacter jejuni by Luminex ® xMAP^{TM} Technology. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, p. 1039–1045, 2010.

BARRET R. D.; SCHUTER, D. Adaptation from standing genetic variation. **Trends Ecology & Evolution**, v. 23, n. 1, p. 38-44, 2008.

BERNARDI, C. M. G.; RESENDE, D. O.; ALBUQUERQUE, A. C. S.; TIBOLA, C. **Cartilha do Agricultor - Micotoxinas**. EMBRAPA, v.1, p. 8, 2018.

BERTHILLER, F.; MARAGOS, C. M.; DALL'ASTA, C. **Introduction to masked mycotoxins.** In Masked Mycotoxins in Food: Formation, Occurrence and Toxicological

Relevance; DallAsta, C., Berthiller, F., Eds.; London, Royal Society of Chemistry, v. 24, 2016, pp. 13.

BEYER, M.; POGODA, F.; PALLEZ, M.; LAZIC, J.; HOFFMANN, L.; PASQUALI, M. Evidence for a reversible drought induced shift in the species composition of mycotoxin producing *Fusarium* head blight pathogens isolated from symptomatic wheat heads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 182–183, p. 51–56, 2014.

BOUTIGNY, A. L.; WARD, T. J.; COLLER, G. J. V.; FLETT, B.; LAMPRECHT, S. C; O'DONNELL, K.; VILJOEN, A. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 9, p. 914–920, 2011.

BRANCHARD, M.; BORNET, B. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 3, p. 209–215, 2001.

BRASIL. Regras para Análise de Sementes. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Brasília, DF: Mapa/ACS, 398p, 2009.

BRASIL, M. DA S. **Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União – D.O.U., de 22 de fevereiro de 2011, 2011.

BROEKAERT, N.; DEVREESE, M.; DE BAERE, S.; DE BACKER, P.; CROUBELS, S. Modified *Fusarium* mycotoxins unmasked: From occurrence in cereals to animal and human excretion. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, p. 17–31, 2015.

BURDON, J. J.; THRALL, P. H.; ERICSON, L. The current and future dynamics of disease in plant communities. **Annual Review Phytopathology**, v. 44, p. 19–39, 2006.

CALORI-DOMINGUES, M. A.; BERNARDI, C. M. G.; NARDIN, M. S., DE SOUZA, G. V., DOS SANTOS, F. G. R.; STEIN, M. D. A., DA GLORIA, E. M., DIAS, C. T. D.; CAMARGO, A. C. Co-occurrence and distribution of deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in wheat from Brazil. **Food Additives & Contaminant: Part B**. Surveill. v. 9, p. 142–151, 2016.

CASTAÑARES, E.; ALBUQUERQUE, D. R.; DINOLFO, M. I.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A.; STENGLEIN, S.A. Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina.

International Journal of Food Microbiology, v. 179, p. 57–63, 2014.

CASTELANI, A. CASTELANI.A. A maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distiled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine** v.70, p. 181-184, 1967.

CHAVES, M. S.; MARTINELLI, J.A.; CAROLINE, W.; GRAICHEN, F. A. S.; BRAMMER, S. P.; SCAGLIUSI, S. M.; DA SILVA, P. R.; WIETHÖLTER, P.; TORRES, G. A. M.; LAU, E. Y.; CONSOLI, L.; CHAVES, A. L. S.. The importance for food security of maintaining rust resistance in wheat. Food Security, v. 5, n. 2, p. 157–176, 2013.

CHEAT, S., GEREZ, J.R., COGNIE, J., ALASSANE-KPEMBI, I., BRACARENSE, A.P., RAYMOND-LETRON, I. et al. Nivalenol has a greater impact than deoxynivalenol on pig jejunum mucosa in vitro on explants and in vivo on intestinal loops. **Toxins,** 7, 1945–1961. https://doi.org/10.3390/toxins7061945, 2015.

CONAB. **Companhia Nacional do Abastecimento. Séries hostóricas. Trigo**. Disponível <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_15_17_45_53_trigoserieh ist.xls>. Acesso em 10 de Junho de 2018. Conab, p. 1–5, 2018.

CONSOLO, V. F.; ORTEGA, L. M.; SALERNO, G.; ASTORECA, A.; ALCONADA, T. M. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* sensu lato isolates from wheat associated with Fusarium Head Blight in diverse geographic locations of Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 47, n. 3, p. 245–250, 2015.

COVARELLI, L.; BECCARI, G.; PRODI, A.; GENEROTTI, S.; ETRUSCHI, F.; JUAN, C.; FERRER, E.; MAÑES, J. *Fusarium* species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 540–551, 2014.

CUNHA, C. M. S.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; TCACENCO, F. A.; STADNIK, M. J. Aggressiveness and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from Santa Catarina, southern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 326–334, 2015.

DE ALMEIDA, J. L.; TESSMANN, D. J.; DO COUTO, H. T. Z.; FOSTIM, M. L. Effect ou *Fusarium* head blight on deoxynivalenol levels in whole grain and patent flours from different wheat genotypes. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 2, p. 229-236, 2016.

DEAN, R.; VAN KAN, J. A. L.; PRETORIUS, Z. A.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P. D.; RUDD, J. J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J.; FOSTER, G. D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular**

Plant Pathology, v. 13, n. 4, p. 414–430, 2012.

DEL PONTE, E.; FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R.; BERGSTROM, G. C. Giberela do trigo: aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 587–605, dez. 2004.

DEL PONTE, E.; FERNANDES, J. M. C.; PAVAN, W.; BAETHGEN, W. E. A model-based Assessment of the Impacts of Climate Variability on *Fusarium* Head Blight Seasonal Risk in Southern Brazil. **Journal of Phytopatholy**, v. 157, n. 11/12 p. 157-681, 2009.

DEL PONTE, E. M.; SPOLTI, P.; WARD, T. J.; GOMES, L. B.; NICOLLI, C. P.; KUHNEM, P.R.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J. et al. Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, v. 105, n. 2, p. 246–254, 2015.

DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to *Fusarium* head blight epidemics in southern Brazil. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1087–1091, 2012.

DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: Chemistry, genetics, and significance. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p. 595–604, 1993.

DESJARDINS, A. E. Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. St. Paul, MN: **American Phytopathol.** Society. ISBN: 978-0-89054-335-1, p-260, 2006.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology, Methods. 2 nd ed.CRC Press, 448p, 1995.

DINOLFO, M. I.; STENGLEIN, S. A.; MORENO, M. V.; NICHOLSON, P.; JENNINGS, P.; SALERNO, G. L. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. **European Journal of Plant Pathology,** v. 127, p. 483-491, 2010.

DINOLFO, M. I.; CASTAÑARES, E.; STENGLEIN, S. A. Characterization of a *Fusarium poae* world-wide collection by using molecular markers. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, n. 1, p. 119–132, 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. a Rapid DNA Isolation Procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p.11-15, 1987.

DUCEY, T. F.; PAGE, B.; USGAARD, T.; BORUCKI, M. K.; PUPEDIS, K.; WARD, T. J. A single-nucleotide-polymorphism-based multilocus genotyping assay for subtyping lineage I isolates of *Listeria monocytogenes*. **Applied & Environmental Microbiology**,

v. 73, n. 1, p. 133–147, 2006.

DUFFECK, M. R.; TIBOLA, C. S; GUARIENTI, E. M.; DEL PONTE, E. M. Survey of mycotoxins in Southern Brazilian wheat and evaluation of immunoassay methods. **Scientia Agricola**, v. 74, n. 4, p. 343-348, 2017.

EARL, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EFSA-CONTAM (Panel on Contaminants in the Food Chain). Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. **EFSA Journal,** v. 11 n 6 , 3262, 2013.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) 2014. Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modifiedforms of certain mycotoxins in food and feed. **EFSA Journal**, v.12 n. 12, pp. 107, 2014.

EHRLICH, K. C.; DAIGLE, K. W. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. **BBA - General Subjects**, v. 923, n. 2, p. 206–213, 1987.

ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 205–239, 2004.

ETHUR, L. Z. et al. Fungos Antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em Pepineiro Cultivado em Estufa . **Fitopatologia Brasileira,** v. 30, n. 2, p. 127–133, 2005.

FALEIRO, G. **Marcadores Genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Brasilia, Embrapa Informações Tecnológicas, 2007, p. 99.

Fedrigo, K. Levantamento de fungos causadores de podridão de espiga em milho e variabilidade genética em *Stenocarpella maydis*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR, 2014.

FEDRIGO, K.; GIACOMIN, R. M.; FARIA, C. M. D. R.; DA-SILVA, P. R.; ISSR primers for analysis of genetic variability of *Stenocarpella maydis*. **Tropical Plant Pathology,** v. 41, p. 1–6, 2016.

FEKSA, H.; SILVA, C. N.; PEREIRA, C. B.; DE ALMEIDA, J.; TESSMANN, D. J. A Regional Study on Trichothecene-B Type composition of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat and barley in southern Paraná state, Brazil. 5th International Symposium on Fusarium Head Blight. Florianópolis, Brasil. p. 1, 2016.

FEKSA, H. R.; COUTO, H. T. Z.; GAROZI, R.; ALMEIDA, J. L.; GARDIANO, C. G.; TESSMANN, D. J. Pre- and postinfection application of strobilurin-triazole premixes and single fungicides for control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol mycotoxin in wheat. **Crop Protection,** v. 117, p. 128-134, 2019.

FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação de método de Castellani para conservação dev fungos patógenos em plantas. **O Biológico**, v. 9, p. 33, 1967.

FOROUD, N. A.; EUDES, F. Trichothecenes in cereal grains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 147–173, 2009.

FOROUD, N. A.; OUELLET, T.; LAROCHE, A.; OOSTERVEEN, B.; JORDAN, M. C.; ELLIS, B. E.; EUDES, F. Differential transcriptome analyses of three wheat genotypes reveal different host response pathways associated with *Fusarium* head blight and trichothecene resistance. **Plant Pathology,** v. 61, p. 296-314, 2012.

FRANKHAM, R.; BALLOU, D. J.; BRISCOE, A. D. Introduction to Conservation Genetics. **Forest Ecology and Management**, v. 190, n. 2–3, p. 385–386, 2002.

FURLONG, E. B.; VALENTE, SOARES, L. M. V.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 131, p. 185-190, 1995.

GALE, R.; CHEN, L. F.; HERNICK, C. A.; TAKAMURA, K.; KISTLER, H.C. Population Analysis of *Fusarium graminearum* from Wheat Fields in Eastern China. **Phytopathology**, v. 92, n. 12, p. 1315–1322, 2007.

GALE, L. R.; WARD, T. J.; BALMAS, V.; KISTLER, H. C. Population Subdivision of *Fusarium graminearum* Sensu Stricto in the Upper Midwestern United States. **Phytopathology**, v. 97, n. 11, p. 1434–9, 2007.

GARDINER, D. M.; KAZAN, K.; PRAUD, S.; TORNEY, F.; RUSU, A.; MANNERS, J. M. Early activation of wheat polyamine biosynthesis during *Fusarium* head blight implicates putrescine as an inducer of trichothecene mycotoxin production. **Plant Biology,** v. 10, e289, p. 1-13, 2010.

GEISER, D. M. et al. One Fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves long standing use. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 400-408. 2013.

GEORGOPOULOS, S.G.; SKYLAKAKIS, G. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. **Crop Protection**, v. 5, p. 299–305, 1986.

GIMENO, A.; RAMOS, A. J.; HERNÁNDEZ, E. Estudio de la Producción de Deoxinivalenol (DON) por *Fusarium graminearum*. Rev. Iberoam. **Micology, v.** 9, p. 55-57, 1992.

GONZÁLES, H. H. L.; MOLTÓ, G. A.; PACIN, A.; RESNIK, S. L.; ZELAYA, M. J.; MASANA, M.; MARTÍNEZ, E. J. Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina. **Mycopathologia**, v. 165, p. 105–114, 2008.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 6, p. 515–525, 2004.

GRATZ, S. W. Do plant-bound masked mycotoxins contribute to toxicity? **Toxins**, v. 9, n. 3, p. 1–10, 2017.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST : Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica.** v.4, n.9, p. 1-4, 2001.

JANSEN, C.; WETTSTEIN, D. V.; SCHÄFER, W.; KOGEL, K. H.; FELK, A.; MAIER, F. J. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum.* **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 46, p. 16892–16897, 2005.

JESTOI, M. Emerging *Fusarium* - Mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin—A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 91, p. 21-49, 2008.

JÍMENEZ, P.; COLLADA, C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. **Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales**, v. 2, p. 237–248, 2000.

KARASOV, T. L.; HORTON, M. W.; BERGELSON, J. Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution? **Plant Biology,** v. 18, p. 24-30, 2014.

KAZAN, K.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M. On the trail of a cereal killer: Recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 4, p. 399–413, 2012.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937–947, 2005.

KELLY, A. et al. The geographic distribution and complex evolutionary history of the NX-2 trichothecene chemotype from *Fusarium graminearum*. **Fungal Genetics and Biology**,

v. 95, p. 39–48, 2016.

KELLY, A. C.; WARD, T. J. Population genomics of *Fusarium graminearum* reveals signatures of divergent evolution within a major cereal pathogen. **Plos One**, v. 13, n. 3, e0194616, 2018.

KHALEDI, N.; TAHERI, P.; RASTEGAR, M. F. Identification, virulence factors characterization, pathogenicity and aggressiveness analysis of *Fusarium spp*., causing wheat head blight in Iran. **Journal Plant Pathology**, v. 147, p. 897-918, 2016.

KOKKONEN, M.; OJALA, L.; PARIKKA, P.; JESTOI, M. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. **International Journal Food Microbiology,** v. 143, p. 17-25, 2010.

KOKKONEN, M.; JESTOI, M.; LAITILA, A. Mycotoxin production of *Fusarium langsethiae* and *Fusarium sporotrichioides* on cereal-based substrates. **Mycotoxin Research**, v. 28, p. 25-35, 2012.

KUBO, K.; KAWADA, N.; FUJITA, M. Evaluation of *Fusarium* head blight resistance in wheat and the development of a new variety by integrating type I and II resistance. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 47, n. 1, p. 9–19, 2013.

LESLIE, J.; BOWDEN, R. *Fusarium graminearum* : When species concepts collide . **Cereal Research Communications**, v. 36, n. 6, p. 609–615, 2008.

LIANG, J. M.; XAYAMONGKHON, H.; BROZ, K.; DONG, Y.; MCCORMICK, S. P.; ABRAMOVA, S.; WARD, T. J.; MA, Z. H.; KISTLER, H. C. Temporal dynamics and population genetic structure of *Fusarium graminearum* in the upper Midwestern United States. **Fungal Genetics and Biology**, v. 73, p. 83–92, 2014.

LIDDELL, C. M.; LEONARD, K. J.; BUSHNELL, W. Systematics of *Fusarium* species and allies associated with *Fusarium* head blight. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2003.

LOFGREN, L.; RIDDLE, J.; DONG, Y.; KUHNEM, P. R.; CUMMINGS, J. A.; DEL PONTE, E. M.; BERGSTROM, G. C.; KISTLER, H. C. A high proportion of NX-2 genotype strains are found among *Fusarium graminearum* isolates from northeastern New York State. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, n. 3, p. 791–796, 2017.

MACHADO, F.J., NICOLLI, C.P., MÖLLER, P.A., ARRUDA, R., WARD, T.J.; DEL PONTE, E.M. Differential triazole sensitivity among members of the Fusarium graminearum species complex infecting barley grains in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, 42, 197–202. https://doi.org/10.1007/s40858-017-0158-0, 2017.

MALBRÁN, I.; MOURELOS, C. A.; GIROTTI, J. R.; BALATTI, P. A.; LORI, G. A. Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. **Phytopathology, v.** 104, p. 357–364, 2014.

MALLMANN, C. A., DILKIN, P., MALMANN, A. O. Prevalence and levels of deoxynivalenol and zearalenone in commercial barley and wheat grain produced in Southern Brazil: an eight-year (2008 to 2015) summary. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 146–152 , 2017.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, p.24,.

MARIANO, L. C.; ZCHONSKI, F. L.; SILVA, C. M DA.; DA-SILVA, P. R. Genetic variability in a Brazilian apple germplasm collection with low chilling requirements. **Peer J,** 6:e6265, p. 62-65, 2019.

MCCORMICK, S. P.; STANLEY, A. M.; STOVER, N. A.; ALEXANDER, N. J. Trichothecenes: From simple to complex mycotoxins. **Toxins**, v. 3, n. 7, p. 802–814, 2011.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance**. Euphytica**, v. 124. p. 163–180, 2002.

MCDONALD, B. A.; STUKENBROCK, E. H. Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: Global threats to agricultural sustainability and food security. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, 2016.

MCMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. **Plant Disease**, v. 81, p. 1340–1348, 1997.

MCMULLEN, M.; BERGSTROM, G.; DE WOLF, E.; DILL-MACKY, R.; HERSHMAN, D.; SHANER, G.; SANFORD, D. V. *Fusarium* Head blight disease cycle , symptoms , and impact on grain yield and quality frequency and magnitude of epidemics since 1997. **Plant Disease**, v. 96, n. 12, p. 171–1728, 2012.

MISHRA, P. K.; TEWARI, J. P.; CLEAR, R. M.; TURKINGTON, T. K. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. **Annals of Applied Biology,** v. 145, p. 299–307, 2004.

MIROCHA, C. J.; XIE, W.; FILHO, E. R. Chemistry and detection of *Fusarium* mycotoxins. In *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley; Leonard, K.J., Bushnell, W.R., Eds.; St. Paul, The American Phytopathological Society, 2003, 20 p.

MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M. A. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity**, v. 1, n. 1, p. 19–35, 2009.

MUNKVOLD, G. P. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. **Mycotoxigenic Fungi**. Springer: New York, USA; pp.51-106, ISBN 978-1-4939-6705-6, 2017.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species, An Ilustrated Manual for Identification**, Philadelfia, Penn State University Press, 1983, p. 206.

NICOLLI, C. P.; SPOLTI, P.; TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M.; DEL PONTE, E. M. Fusarium head blight and trichothecene production in wheat by *Fusarium graminearum* and *F. meridionale* applied alone or in mixture at post-flowering. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 2, p. 134–140, 2015.

NIELSEN, L. K., JENSEN, J. D., NIELSEN, G. C., JENSEN, J. E., SPLIID, N. H., THOMSEN, I. K., JUSTESEN, A. F., COLLINGE, D. B., JØRGENSEN, L. N. *Fusarium* head blight of cereals in Denmark: species complex and related mycotoxins. **Phytopathology,** v. 101, p. 960–969, 2011.

NEVO, E. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. **Theoretical Population Biology, v.** 1, p. 121-177, 1978.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology,** v. 13, n. 5, p. 1143–1155, 2004.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, B. I. Molecular Systematics and Phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 465, 1998.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; TACKE, B. K.; CASPER, H. H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 97, n. 14, p. 7905–7910, 2000.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; GEISER, D. M.; KISTLER, H. C.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 6, p. 600–623, 2004.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; ABERRA, D.; KISTLER, H. C.; AOKI, T.; ORWIG, N.; KIMURA, M.; BJØRNSTAD, Å.; KLEMSDAL, S. S. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 11, p. 1514–1522, 2008.

ORTEGA, L. M.; DINOLFO, M. I.; ASTORECA, A. L.; ALBERIONE, E. J.; STENGLEIN, S. A.; ALCONADA, T. M. Molecular and mycotoxin characterization of *Fusarium graminearum* isolates obtained from wheat at a single field in Argentina. **Mycological Progress**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.

PACIN, A.; BOVIER, E. C.; CANO, G.; TAGLIERI, D.; PEZZANI, C. H. Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 492–495, 2010.

PALACIOS, S. A.; MERLERA, G. G.; ERAZO, J.; REYNOSO, M. M.; FARNOCHI, M. C.; TORRES, A. M. Trichothecene genotype and genetic variability of *Fusarium graminearum* and *F. cerealis* isolated from durum wheat in Argentina. **European Journal of Plant Pathology**, v. 149, p. 969–981, 2017.

PAN, D., GRANERI, J., BETTUCCI, L. Correlation of rainfall and levels of deoxynivalenol in wheat from Uruguay, 1997–2003. **Food Additives & Contaminants. Part B**, Surveillance, v. 2, n. 2, p. 162–165, 2009.

PAN, D.; MIONETTO, A.; CALERO, N., REYNOSO, M. M., TORRES, A., BETTUCCI, L. Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-11, 2016.

PANTHI, A.; HALLEN-ADAMS, H.; WEGULO, S. N.; NOPSA, J. H; BAENZIGER, P. S. Chemotype and aggressiveness of isolates of *Fusarium graminearum* causing head blight of wheat in Nebraska. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 36, p. 447-55, 2014.

PASQUALI, M.; BEYER, M.; LOGRIECO, A.; AUDENAERT, K.; BALMAS, V.; BASLER, R.; BOUTIGNY, A.; CHRPOVÁ, J.; CZEMBOR, E.; GAGKAEVA, T.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; HOFGAARD, I. S.; KÕYCÜ, N. D.; HOFFMANN, L.; LEVIĆ, J.; MARIN, P.; MIEDANER, T.; MIGHELI, Q.; MORETTI, A.; MÜLLER, M. E. H.; MUNAUT, F.; PARIKKA, P.; PALLEZ-BARTHEL, M.; PIEC, J.; SCAUFLAIRE, J.; SCHERM, B.; STANKOVIĆ, S.; THRANE, U.; UHLIG, S.; VANHEULE, A.; YLI-MATTILA, T.; VOGELGSANG, S. A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. **Frontiers in**

Microbiology, v. 7, e406, 2016.

PASQUALI, M.; MIGHELI, Q. Genetic approaches to chemotype determination in type B-trichothecene producing *Fusaria*. **International Journal of Food Microbiology**, e189, p. 164-182, 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 96–136, 2014.

PEREIRA, C.B.; WARD, T. J.; DEL PONTE, E. M.; MOREIRA, G. M.; BUSMAN, M.; MCCORMICK, S. P.; FEKSA, H. R.; DE ALMEIDA, J. L.; TESSMANN, D. J. Five-year Survey Uncovers Extensive Diversity and Temporal Fluctuations Among Fusarium Head Blight Pathogens of Wheat and Barley in Brazil. **Preprint**, 2020.

PERRONE, G.; BOTTALICO, A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 611–624, 2002.

PIETA, S.; TIBOLA, C. S. **Distribuição da Micotoxina Deoxinivalenol (DON) nas Diferentes frações de Trigo**. Brasília, Embrapa, 2011, 148 p.

PRITCHARD, A.; J. K.; WENA., X.; FALUSHB.; D**. STRUCTURE. Version 2.3**: University of Chicago/University of Oxford, 2010.

PRODI, A.; TONTI, S.; NIPOTI, P.; PANCALDI, D.; PISI, A. Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of Northern Italy. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 3, p. 727–731, 2009.

PRODI, A.; SALOMONI, D.; BERTACCHINI, E.; ALKADRI, D.; PISI, A.; TONTI, S.; ALBERTI, I.; DAL PRÀ, M.; PANCALDI, D.; COVARELLI, L.; NIPOTI, P. Determination of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from durum wheat in different Italian regions. **Plant Breeding and Seed Science**, v. 64, n. 1, p. 12–17, 2011.

PRONK, M. E. J.; SCHOTHORST, R. C.; VAN EGMOND, H. P. Toxicology and occurrence of nivalenol, fusarenon X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol and 3- and 15-acetyldeoxynivalenol: a review of six trichothecenes. **RIVM Report,** p. 1–75, 2002.

PURI, K. D.; ZHONG, S. The 3ADON population of *Fusarium graminearum* found in North Dakota is more aggressive and produces a higher level of DON than the prevalent 15ADON population in spring wheat. **Phytopathology**, v. 100, n. 10, p. 1007–1014, 2010.

QIU, J.; SHI, J. Genetic relationships, Carbendazim Sensitivity and mycotoxin production of the *Fusarium graminearum* populations from Maize, wheat and rice in Eastern China. **Toxins**, v. 6, p. 2291-2309, 2014.

RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 9, n. 2, p. 221–238, 2004.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9–17, 2002.

REYNOSO, M. M.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A. M.; CHULZE, S. N. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2–3, p. 444–448, 2011.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369–378, 2005.

ROSA, J.; WEBER, G. G.; CARDOSO, R.; GÓRSKI, F.; DA-SILVA, P. R. Variability and population genetic structure in *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC., a species with high value in folk medicine in South America. **PLoS ONE,** v. 12, e0183533-1, 2017.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase Published by : American Association for the Advancement of Science Stable , **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487–491, 2016.

SALGADO, J. D.; MADDEN, L. V.; PAUL, P. A. Quantifying the Effects of *Fusarium* Head Blight on Grain Yield and Test Weight in Soft Red Winter Wheat. **Phytopathology**, v. 105, n. 3, p. 295–306, 2015.

SAMPIETRO, D. A.; MARÌN, P.; IGLESIAS, J.; PRESELLO, D. A.; VATTUONE, M. A.; CATALAN, C. A. N.; GONZALEZ JAEN, M. T. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. **Fungal Biology**, v. 114, n. 1, p. 74–81, 2010.

SAMPIETRO, D. A.; DÍAZ, C. G.; GONZALEZ, V.; VATTUONE, M. A.; PLOPER, L. D.; CATALAN, C. A. N.; WARD, T.J. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 359–364, 2011.

SAMPIETRO, D. A.; FICOSECO, M. E. I.; JIMENEZ, C. M.; VATTUONE, M. A.; CATALÁN, C. A. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* complex strains isolated from maize fields of northwest Argentina. **International Journal of Food Microbiology,** v. 153, p. 229 –233, 2012.

SANTOS, J. S.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y. S., HASHIMOTO, E. H., BASSOI, M. C., DE MIRANDA, M. Z., ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 90–95. 2013.

SARVER, B. A. J.; WARD, T. J.; GALE, L. R.; BROZ, K.; KISTLER. H. C.; AOKI, T.; NICHOLSON, P.; CARTER, J.; O'DONNELL, K. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. **Fungal Genetics Biology,** v. 48, p. 1096–1107, 2011.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; TIBOLA, C. S.; SCUSSEL, V. M.; Mycoflora and deoxynivalenol in whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from southern Brazil. **Food Additives & Contaminants**, v. 89, n. 1, p. 833-837, 2014.

SCHOTHORST, R. C.; JEKEL, A. A.; VAN EGMOND, H.P.; DE MUL, A.; BOON, P. E.; VAN KLAVEREN, J. D. Determination of trichothecenes in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 1, p. 48–55, 2004.

SCOZ, L. B.; ASTOLFI, P.; REARTES, D. S.; SCHMALE, D. G.; MORAES, M. G.; DEL PONTE, E. M. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. **Plant Pathology**, v. 58, n. 2, p. 344–351, 2009.

SCUDAMORE, K.; PATEL, S. The fate of deoxynivalenol and fumonisins in wheat and maize during commercial breakfast cereal production. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 4, p. 437–448, 2008.

SILVA, C.; BENIN, G.; ROSA, A. C.; BECHE, E.; BORNHOFEN, E.; CAPELIN, M. A. Monitoring levels of deoxynivalenol in wheat flour of Brazilian varieties**. Chilean Journal Of Agricultural Research**, v. *75*, n.1, p. 50-56, 2015.

SOBROVA, P.; ADAM, V.; VASATKOVA, A.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, n. 3, p. 94–99, 2010.

SPOLTI, P.; PONTE, E. M. DEL. Agressividade diferencial de espécies do complexo *Fusarium graminearum* em interação com o fungicida tebuconazole na redução do rendimento de trigo. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 9, p. 1569–1575, 2013.

STACK; MCMULLEN. **A Visual Scale to Estimate Severity of *Fusarium* Head Blight in Wheat**. Fargo, North Dakota State University, 2011, 1095 p.

STACK, R. W. A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *gibberella zeae*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 1–142, 1989.

STARKEY, D. E.; WARD, T. J.; AOKI, T.; GALE. L. R.; KISTLER, C.; GEISER, D. M.; SUGA. H.; TÓTH, B.; VARGA, J.; O'DONNELL, K. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. **Fungal Genetics and Biology,** v. 44, p. 1191–1204, 2007.

SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. Fifty years of *Fusarium*: How could nine species have ever been enough? **Fungal Diversity**, v. 50, p. 135–144, 2011.

SUMMERELL, B. A. Resolving Fusarium: Current Status of the Genus. Annual Review of Phytopathology is online at **phyto.annualreviews.org**. 57:15.1–15.17, 2019.

TALAS, F.; PARZIES, H. K.; MIEDANER, T. Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum* sensu stricto populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 39–48, 2011.

TELI, B.; CHATTOPADHYAY, A.; MEENA, S. C.; GANGWAR, G. P.; PANDEY, S. K. Present status of *Fusarium* head blight of wheat and barley in India. **Diseases of Wheat and Their Managament**, New Delhi, Astral Publishers p. 79–92, 2016.

TIBOLA, C. S.; FERNANDES, J. M. C.; GUARIENTI, E. M. Effect of cleaning, sorting and milling processes in wheat mycotoxin content. **Food Control**, v. 60, p. 174–179, 2015.

TKINS, S. D; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n. 1, p. 3–15, 2004.

TOK, F. M.; ARSLAN, M. Distribution and genetic chemotyping of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* populations in wheat fields in the eastern mediterranean region of Turkey. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 2, p. 254–260, 2016.

TOKAI, T.; TAKAHASHI-ANDO, N.; IZAWA, M.; KAMAKURA, T.; YOSHIDA, M.;

FUJIMURA, M.; KIMURA, M. 4-O-acetylation and 3-O-acetylation of trichothecenes by trichothecene 15-O-acetyltransferase encoded by *Fusarium* Tri3. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 9, p. 2485–2489, 2008.

TRAIL, F. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era. **Plant Physiology**, v. 149, n. 1, p. 103–110, 2009.

TRAIL, F.; GAFFOOR, I.; VOGEL, S. Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 6, p. 528–533, 2005.

TRALAMAZZA, S. M.; BRAGHINI, R.; CORRÊA, B. Trichothecene genotypes of the *Fusarium graminearum* species complex isolated from Brazilian wheat grains by conventional and quantitative PCR. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–7, 2016.

TUNALI, B.; OBANOR, F.; ERGINBAS, G.; WESTECOTT, R. A; NICOL, J.; CHAKRABORTY, S. Fitness of three *Fusarium* pathogens of wheat. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 81, p. 1–14, 2012

USDA. ESTADOS UNIDOS. **Databases: production, supply and distribution online**. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>. Acesso em: 07 junho, 2018.

USDA. ESTADOS UNIDOS. **Databases: production, supply and distribution online**. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>. Acesso em: 13 julho, 2020.

VALVERDE-BOGANTES, E. Species and trichothecene genotypes of Fusarium head blight pathogens in Nebraska , USA in 2015-2016. **Food Science and Technology Department**, University of Nebraska – Lincoln, 2017.

VAN DER LEE, T.; ZHANG, H.; VAN DIEPENINGEN, A.; WAALWIJKA, C. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. **Food Additives and Contaminants** - Part A, v. 32, n. 4, p. 453–460, 2015.

VARGA, E.; WIESENBERGER, G.; HAMETNER, C.; WARD, T. J.; DONG, Y.; SCHÖFBECK, D.; MCCORMICK, S.; BROZ, K.; STÜCKLER, R.; SCHUHMACHER, R.; KRSKA, R.; KISTLER, H.C.; BERTHILLER, F.; ADAM, G. New tricks of an old enemy: Isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 2588–2600, 2015.

WANG, J. H.; NDOYE, M.; ZHANG, J. B.; LI, H. P.; LIAO, Y.C. Population Structure and Genetic Diversity of the *Fusarium graminearum* Species Complex. **Toxins**, v. 3, n. 8, p. 1020–1037, 2011.

WANG, J.; ZHAO, Y.; YANG, X.; YANG, J.; GONG A.; ZANG, J.; CHEN, L.; ZHOU, C. *Fusarium graminearum* species complex and trichothecene genotype. In: **Mycotoxins and Food Safety,** 1st ed, DeVries JW, Trucksess MW, Jackson LS, Eds, IntechOpen: London UK, pp 1–19, 2019.

WARD, T. J.; BIELAWSKI, J. P.; KISTLER, H. C.; SULLIVANT, E.; O'DONNELL, K. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 99, n. 14, p. 9278–9283, 2002.

WARD, T. J.; CLEAR, R. M.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; GABA, D.; PATRICK, S.; STARKEY, D. E.; GILBERT, J.; GEISER, D. M.; NOWICKI, T. W. An adaptive evolutionary shift in Fusarium head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 4, p. 473–484, 2008.

WEGULO, S. N. Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. **Toxins**, v. 4, n. 11, p. 1157–1180, 2012.

WEGULO, S. N.; BAENZIGER, P. S.; NOPSA, J. H.; BOCKUS, W. W.; ADAMS, H. H. Management of Fusarium head blight of wheat and barley. **Crop Protection**, v. 73, p. 100–107, 2015.

WEI, S.; VAN DER LEE, T.; VERSTAPPEN, E.; VAN GENT, M.; WAALWIJK, C. Targeting trichothecene biosynthetic genes. **Methods in Molecular Biology**, v. 1542, p. 173–189, 2017.

WHITE, T. J; BRUNS, T.; LEE, TAYLOR, J. L. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications**. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, San Diego, Academic Press, p. 315–322, 1990.

WIESE, M. V. Compendium of Wheat Diseases. **Mycologia**, v. 83, n. 2, p. 249, 1987.

VOGELGSANG, S.; SULYOK, M.; BÄNZIGER, I.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R.; FORRER, H. R. Effect of fungal strain and cereal substrate on in vitro mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. **Food Additives & Contaminants**: Part A, v. 25, p. 745-757, 2008.

VON DER OHE, C.; GAUTHIER, V.; TAMBURIC-ILINCIC, L.; BRULE-BABEL, A.; FERNANDO, W. G. D.; CLEAR, R.; WARD, T. J.; MIEDANER, T. A comparison of aggressiveness and deoxynivalenol production between Canadian *Fusarium*

graminearum isolates with 3-acetyl and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes in field-grown spring wheat. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, n. 3, p. 407–417, 2010.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. **POPGENE: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Version 1.31**. University of Alberta, Canada and Centre for International Forestry Research, Canada, 1999.

YERKOVICH, N.; FUMERO, M.V.; CANTORO, R.; PALAZZINI, J. M.; CHULZE, S. N. Population structure and genetic diversity of *Fusarium graminearum* sensu stricto, the main wheat pathogen producing Fusarium head blight in Argentina. **European Journal of Plant Pathology,** v. 156. p. 635–646, 2019.

YLI-MATTILA, T.; GAGKAEVA, T.; WARD, T. J.; AOKI, T.; KISTLER, H. C.; O'DONNELL, K. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East . **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 841–852, 2009.

YLI-MATTILA, T.; RÄMÖ, S.; HIETANIEMI, V.; HUSSIEN, T.; LOPEZ, A. L. C.; CUMAGNUN, C. J. Molecular Quantification and Genetic Diversity of Toxigenic *Fusarium* species in Northern Europe as compared to those in Southern Europe. **Microorganisms**, v. 1, n. 1, p. 162–174, 2013.

ZAIN, M. E.; BAHKALI, A. H.; AL-OTHMAN, M. R. Effect of chemical compounds on amino acid content of some *Fusarium* species and its significance to fungal chemotaxonomy. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 183–192, 2012.

ZELLER, K. A.; BOWDEN, R. L.; LESLIE, J. F. Diversity of Epidemic Populations of *Gibberella zeae* from Small Quadrats in Kansas and North Dakota. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 874–880, 2003.

ZHANG, H.; VAN DER LEE, T.; WAALWIJK, C.; CHEN, W.; XU, J.; XU, J.; ZHANG, Y.; FENG, J. Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–13, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176–183, 1994.