

ANDRÉ ANGELO MEDEIROS GOMES

**FREQUÊNCIA DE HERMAFRODITAS E DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE
ACASALAMENTO EM POPULAÇÕES DE *Fusarium verticillioides* ASSOCIADAS AO
MILHO EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS DO BRASIL**

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2013**

ANDRÉ ANGELO MEDEIROS GOMES

**FREQUÊNCIA DE HERMAFRODITAS E DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE
ACASALAMENTO EM POPULAÇÕES DE *Fusarium verticillioides* ASSOCIADAS AO
MILHO EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara

**RECIFE-PE
FEVEREIRO – 2013**

**FREQUÊNCIA DE HERMAFRODITAS E DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE
ACASALAMENTO EM POPULAÇÕES DE *Fusarium verticillioides* ASSOCIADAS AO
MILHO EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS DO BRASIL**

ANDRÉ ANGELO MEDEIROS GOMES

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 18/02/2013.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Alves de Oliveira

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff

Prof^a. Dr^a. Erica Valente Medeiros

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Nascimento Gomes Pereira e Laura Clarinda de Medeiros Gomes pelo apoio, carinho e compreensão.

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida, pelas conquistas, por estar sempre presente na minha vida.

Ao meu pai Nascimento Gomes Pereira e a minha mãe Laura Clarinda de Medeiros Gomes, pelo incentivo e apoio durante toda a minha jornada.

Aos meus avós (Inocência Gomes Pereira, Marino Barbosa Medeiros) *in memória*, Joana Gomes de Oliveira e Maria Clarinda Medeiros, pelo exemplo de vida que me deram.

Aos meus familiares, principalmente meus tios e primos, pelo carinho e amizade que sempre tiveram comigo, sempre me dando forças para prosseguir.

Ao meu orientador, Professor Cristiano, por todos os ensinamentos, pela paciência, amizade, incentivo, apoio, dedicação e interesse durante a realização dos trabalhos.

Aos meus colegas de laboratório por estarem sempre comigo me ajudando e me acompanhando nas horas mais difíceis e também nos momentos de descontração.

Aos colegas e amigos da UFRPE, pelos momentos de dedicação, alegrias e brincadeiras, que passamos juntos durante o curso.

Aos professores e funcionários da UFRPE – Fitopatologia, pelos ensinamentos e colaboração para minha formação acadêmica.

À UFRPE pela oportunidade de estudo, e a CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	VII
GENERAL ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO I - Introdução Geral.....	1
A Cultura do milho	2
Histórico sobre o a evolução no conhecimento de <i>F. verticillioides</i> associado ao milho ..	5
Compatibilidade sexual e sua importância no estudo de populações de <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i>	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO II - FREQUÊNCIA DE HERMAFRODITAS E DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE ACASALAMENTO EM POPULAÇÕES DE <i>Fusarium verticillioides</i> ASSOCIADAS AO MILHO EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS DO BRASIL.....	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
Introdução.....	21
Material e Métodos	24
Isolados Utilizados	24
Estudos de Fertilidade	25
Cálculo do tamanho efetivo da população	26
Resultados	27
Discussão.....	28
Referências	34
CAPÍTULO III – Conclusão Geral.....	37
Conclusão Geral	38

RESUMO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de milho (*Zea mays* L.) do mundo e a fusariose, causada por *Fusarium verticillioides*, seja em espigas ou no colmo, é um problema recorrente quando condições ambientes favorecem o surgimento de epidemias no campo ou em armazenamento. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar por meio de cruzamentos sexuais, isolados de *F. verticillioides* dos três principais climas zonais que se cultiva milho no Brasil. Através de cruzamentos de isolados do campo de *F. verticillioides*, com testadores de *G. moniliformis*; e determinar a taxa de fertilidade, frequência de hermafroditismo, e tamanho efetivo da população. Dos 300 isolados estudados, 231 tiveram cruzamento fértil. Os tipos de acasalamento *MAT-1* e *MAT-2* segregaram numa proporção 105:126. Entre os 231 isolados férteis, 96 se comportaram como hermafroditas e 135 como fêmeas estéreis. Na população total, do Brasil, levando em consideração o tipo de acasalamento, o tamanho efetivo da população $N_{e(mt)}$, foi de 99% da população total, e tomando por base a frequência de hermafrodita, o tamanho efetivo $N_{e(f)}$ foi de 83% da população total. Quando o número total de isolados é subdividido em três populações distintas, baseado nas condições de clima de local de coleta dos isolados, as frequências de hermafroditas foram; 33 hermafroditas dentre 80 isolados férteis do Clima Zonal Tropical Equatorial (ZTE), com 47 se comportando como fêmea estéril; 14 hermafroditas dentre 78 isolados férteis do Clima Zonal Temperado (ZT), com 64 se comportando como fêmea estéril; e 49 hermafroditas dentre 73 isolados do Clima Zonal Tropical Brasil Central (ZTBC), com apenas 24 se comportando como fêmea estéril. O tamanho efetivo das populações representadas por isolados dos climas ZTE, ZT e ZTBC, foram $N_{e(mt)} = 99, 100, 97$ e $N_{e(f)} = 83, 52, 96$ respectivamente, expresso em porcentagem do número total de indivíduos de cada população. A população brasileira de *F. verticillioides* analisada apresenta alto índice de fertilidade e tamanho efetivo, sugerindo a possibilidade de frequente reprodução sexuada no campo. Aparentemente, existe uma tendência de maior fertilidade da população em latitudes menores, representadas pelo clima tropical.

Palavras-chaves: *Gibberella moniliformis*, parâmetros de reprodução sexual, fertilidade feminina.

GENERAL ABSTRACT

Brazil is one of the biggest producers and consumers of maize (*Zea mays* L.) in the world and the fusariosis caused by *F. verticillioides*, on ears and or on stalk, is a recurrent problem when environmental conditions favor epidemics in the field or in storage. The present study aimed to characterize through crosses the *F. verticillioides* isolates from the three main climatic zones where maize is grown in Brazil. The fertility and effective population size were calculated from data generated by crossing field isolates with female fertile testers of *F. verticillioides*. For the entire population, 231 out of 300 isolates were cross-fertile with tester isolates. *MAT-1* and *MAT-2* idiomorphs of the fertile isolates segregated in a 105:126 rate. Female isolates (hermaphrodites) were 96 out of 231 fertile isolates, while 135 were male only isolates. The $N_{e(mt)}$ was 99% of the count for the Brazilian population when the mating type idiomorphs were used as predictors in the estimative of the population size. But when this calculation was made on the basis of the female fertile isolates the $N_{e(f)}$ was 83%. When the total population is divided into sub-populations representing climatic zones, the frequencies of female fertile isolates were 33 out of 80 fertile isolates from the Equatorial Tropical Zonal Climate (ETZC); 14 out of 78 fertile isolates from the Temperate Zonal Climate (TZC); and 49 out of 73 fertile isolates from the Tropical Central Brazil Zonal Climate (TCBZ). The effective population size expressed in percentage of the total number of individual in each population for the three populations represented by isolates from the ETZC, TZC and TCBZ were $N_{e(mt)} = 99, 100, 97$ and $N_{e(f)} = 83, 52, 96$ respectively. The Brazilian population of *F. verticillioides* shows high fertility and high effective population size, suggesting the possibility of frequent sexual reproduction in the field. Apparently there is a tendency of higher fertility in populations established at low latitudes, represented by the tropical climate.

Keywords: *Gibberella moniliformis*, parameters of sexual reproduction, female fertility.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

FREQUÊNCIA DE HERMAFRODITAS E DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE ACASALAMENTO EM POPULAÇÕES DE *Fusarium verticillioides* ASSOCIADAS AO MILHO EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS DO BRASIL

INTRODUÇÃO GERAL

1. A Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta monocotiledônea, pertencente à Divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, Subclasse Commelinidae, Ordem Poales, Família Poaceae, Subfamília Panicoideae, Tribo Andropogonea, Gênero *Zea* (FANCELLI, 1983).

Mundialmente é cultivado entre as latitudes 58° Norte e 40° Sul, distribuído nas mais diversas altitudes, encontrando-se desde localidades situadas abaixo do nível do mar até regiões com mais de 2.500 m de altitude (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004). Em regiões cuja precipitação varia de 300 a 5.000 mm anuais, pode-se observar o cultivo do milho, sendo que a quantidade de água consumida por uma lavoura de milho durante o seu ciclo de vida está em torno de 600 mm (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). Em relação à temperatura, a condição ótima varia com os diferentes estádios de crescimento e desenvolvimento da planta, sendo que os limites extremos tolerados compreendem entre 10°C e 30°C. Já em relação ao fotoperíodo, o milho é considerado uma planta de dias curtos, embora algumas cultivares tenham pouca ou nenhuma sensibilidade às variações do fotoperíodo (CRUZ et al., 2010).

O ciclo de vida da cultura varia entre 100 e 180 dias, em função da caracterização dos genótipos (superprecoce, precoce e tardio) e pode apresentar variações de acordo com as condições climáticas, especialmente a temperatura (REZENDE et al., 2004). Durante o desenvolvimento da cultura, a mensuração do ciclo em dias tem demonstrado inconsistência, isso se deve ao fato de que o tempo de duração de subperíodos de desenvolvimento da planta está associada às variações das condições ambientais e não ao número de dias, pois as plantas apresentam uma temperatura mínima abaixo da qual interrompem as suas atividades fisiológicas; uma faixa satisfatória de temperatura para o seu desenvolvimento adequado; e uma temperatura máxima efetiva acima da qual a taxa respiratória supera a produção de fotoassimilados (BARBANO et al., 2001).

Em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, o milho, se constitui em um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Apresenta um papel importante na economia mundial, devido à sua multiplicidade de

aplicações, quer na alimentação humana quer na alimentação animal, assume relevante papel socioeconômico, além de constituir-se em indispensável matéria-prima para inúmeros complexos agroindustriais (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

Sua importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, como a produção de filmes e embalagens biodegradáveis. Cerca de 70% da produção mundial de milho é destinada à alimentação animal, podendo este percentual chegar a 85%, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES, 2006).

A grande importância do milho na alimentação humana e de animais está relacionada principalmente com suas propriedades nutricionais (alto teor de amido, proteínas, óleos e vitaminas), tornando-o componente básico da dieta de muitas populações. Está presente em mais de 500 produtos alimentícios e é constituinte principal na produção de inúmeras rações animais (FIGUEIRA et al., 2003). Além da aplicação alimentícia, a utilização de derivados do milho estendem-se às indústrias química, farmacêutica, de papel, têxtil, entre outras de aplicação ainda mais nobres (PAES, 2006).

A participação desta cultura no mercado mundial está aumentando devido à produção de etanol, principalmente em regiões onde o clima para o cultivo de cana-de-açúcar é desfavorável, como nos Estados Unidos da América (EUA) (TSUNECHIRO; PEREZ, 2007).

De acordo com United States Department of Agriculture (2013), os maiores produtores mundiais de milho são os EUA, China e Brasil, que, na safra de 2011/2012, produziram 314, 193 e 73 milhões de toneladas, respectivamente, de uma produção mundial total de 882 milhões de toneladas. Assim, esses três países juntos representam 66% da produção mundial de milho.

O mercado mundial de milho é abastecido basicamente pelos EUA, Brasil, Ucrânia e Argentina, que juntos lideraram as exportações do produto em 2012. Segundo Duarte et al. (2006), a principal vantagem destes países é uma logística favorável, que pode ser decorrente da excelente estrutura de transporte, no caso dos EUA, e a proximidade dos portos na Argentina. O Brasil eventualmente participa deste mercado, porém, a instabilidade cambial e a deficiência da estrutura de transporte até aos portos têm prejudicado o país na busca de uma presença mais constante no comércio internacional de milho.

No Brasil, o milho é cultivado em praticamente todo o território nacional, com 13,8 milhões de hectares cultivadas com a cultura na safra 2010/2011, sendo o estado do Paraná o maior produtor, 13,5 milhões de toneladas na safra 2010/2011, seguido pelos estados do Mato

Grosso, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012).

A produção de milho no Brasil tem-se caracterizado pela divisão em duas épocas de semeadura. A semeadura de verão, ou primeira safra, é realizada na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto na região Sul até os meses de outubro a novembro no Sudeste e no Centro Oeste do país. A segunda safra, também chamada de safrinha, é caracterizada pela semeadura entre os meses de janeiro e fevereiro, março e mais adiante em sistemas irrigados, com rendimentos semelhantes à primeira época, após a colheita da safra normal, visando o aproveitamento das chuvas remanescentes antes do período da seca, com predomínio na região Centro Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo. Essa modalidade de cultivo tem adquirido importância nos últimos anos em consequência das poucas alternativas econômicas viáveis para a safra de outono/inverno, constituindo-se em instrumento fundamental para o complemento no abastecimento do milho no país (SHIOGA; OLIVEIRA; GERAGE, 2004).

No Nordeste brasileiro, apesar da baixa produtividade, o milho está entre os produtos agrícolas mais importantes, isto se deve a sua participação na formação da renda agrícola, na ocupação de parcelas consideráveis da população rural e, principalmente, pela sua contribuição na alimentação animal (CARVALHO et al., 1999).

Apesar de o Brasil situar-se entre os maiores produtores e exportadores de milho no mundo, o rendimento médio, que foi aproximadamente 4000 kg por hectare na safra 2010/2011, é bem inferior ao rendimento médio de países como EUA e Argentina, onde superam 9000 kg por hectare Sul (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012). Segundo Fancelli (2000), o rendimento do milho pode ser influenciado pela densidade de plantio, disponibilidade hídrica, fertilidade do solo, potencial produtivo do híbrido, manejo de plantas daninhas, além de pragas e doenças. Nesse sentido, ressalta-se que as doenças da cultura, provocadas por fitopatógenos representam um potencial de perdas de produtividade que varia de 8 a 13% (OERKE, 2006).

Dente as doenças do milho, destacam-se as podridões de espigas, causadas por fungos, diminuindo a produção e causando danos nos grãos produzidos, denominados de grãos ardidos. São considerados grãos ardidos, aqueles atacados por patógenos e/ou que sofreram algum tipo de injúria que leva a alteração de cor, fermentação em toda área do germe ou em qualquer outra parte do endosperma (BRASIL, 1996). Porém, em termos fitopatológicos, apenas grãos infectados por fungos são considerados “ardidos”, os quais são caracterizados principalmente por sintomas de alteração da coloração (TRENTO; IRGANG; REIS, 2002),

estrias brancas no pericarpo e estruturas fúngicas como crescimento micelial sobre os grãos (DESJARDINS et al., 1998).

Os agentes causais de podridões de espiga, e conseqüentemente dos grãos ardidos mais comumente encontrados em milho são espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, e *Stenocarpella* (PINTO, 2001). Dentre as espécies do gênero *Fusarium*, as cinco principais contaminantes em grãos são: *F. equiseti* (Corda) Saccardo; *F. graminearum* Schwabe; *F. sporotrichioides* Sherbakoff; *F. poae* (Peck) Wollenweber; e *F. verticillioides* Sacc. Nirenberg (JIMÉNEZ et al., 2000).

Os grãos ardidos constituem-se num dos principais problemas de qualidade do milho, devido à possibilidade da presença de micotoxinas, tais como aflatoxinas (*Aspergillus flavus* Link e *A. parasiticus* Speare), fumonisinas (*F. verticillioides*), toxina T-2 (*F. sporotrichioides*), zearalenona (*F. graminearum* e *F. poae*), vomitoxinas (*F. moniliforme* Sheld.), entre outras (OLIVEIRA et al., 2009). As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, relevantes devido à bioatividade associada a efeitos tóxicos em humanos, animais e plantas (PLACINTA; D´MELLO; MACDONALD, 1999).

2. Histórico sobre a evolução no conhecimento de *Fusarium verticillioides* associado ao milho

O gênero *Fusarium*, classificado cientificamente no Domínio Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae é composto por mais de 1400 nomes de táxons dentre as categorias de espécies, subespécies, variedades e *formae speciales*, segundo dados do Index Fungorum (2013). Os fungos desse gênero apresentam uma ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes, ocorrendo, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas (BURGESS et al., 1994).

Muitas espécies pertencentes a este gênero são patógenos importantes de plantas e/ou produzem micotoxinas que apresentam graves perigos para a saúde humana e animal (AGRIOS, 2005).

O gênero pode ser definido como fungo de campo, devido a capacidade de produzir toxinas em estágio de pré-colheita. Capaz de interagir com diferentes espécies de plantas,

especula-se que grãos e fragmentos de plantas mortas serviriam como substrato para sua permanência no campo e, infectar uma cultura subsequente (BULLERMAN; TSAI, 1994).

Algumas espécies do gênero *Fusarium* são frequentemente associadas a espigas de milho (PINTO, 2001; TRENTO et al., 2002). Podendo causar doença em todos os estádios de desenvolvimento da planta, porém também podem infectar a planta sem causar sintomas. Espécies, como *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, causam podridões de espiga de milho, resultando na formação dos grãos ardidos (DESJARDINS et al., 1998).

Entre as espécies de *Fusarium* que causam doenças no milho, destaca-se *F. verticillioides* (sinônimo, *F. moniliforme*; teleomorfo, *Gibberella moniliformis* Wineland), agente causal da podridão rosada do milho. A espécie apresenta uma distribuição ampla, ocorrendo tanto nas zonas temperadas úmidas e sub-úmidas como nas tropicais e subtropicais, citando-se a América Central, Alemanha, Austrália, Canadá, EUA, Filipinas, Indonésia, Japão, Nova Zelândia Peru e Sul da China (BURGESS; SUMMERELL, 1992). *F. verticillioides* não é um patógeno exclusivo de milho, já foi relatado em mais de 31 espécies de plantas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2013).

A espécie pertence à seção *Liseola* que corresponde aproximadamente ao complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw (GFSC). O termo GFSC deve ser dado preferência nas citações, pois representa um agrupamento natural monofilético (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Este complexo de espécies é subdividido em pelo menos 12 espécies biológicas (“mating populations”), geneticamente distintas (*F. circinatum* Nirenberg e O'Donnell, *F. fujikuroi* Nirenberg, *F. konzum* Zeller, Summerell e Leslie, *F. mangiferae* Britz, Wingf. e Marasas, *F. nygamai* Burgess e Trimboli, *F. proliferatum*, *F. sacchari* (Butler e Hafiz Khan) Gams, *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas e Wingf., *F. subglutinans* (Wollenw. e Reinking) Nelson, Toussoun e Marasas, *F. thapsinum* Klittich, Leslie, Nelson e Marasas, *F. tupatiense* Lima, *F. verticillioides*) (LIMA et al., 2012). Que se agrupam em mesmo clado filogenético, quando comparado com outras espécies de *Fusarium* de acordo com Watanabe et al. (2011).

O'Donnell; Cigelnik e Nirenberg, (1998) reconheceram 46 espécies dentro do GFSC distribuídas em oito “mating populations” designadas de A, B, C, D, E, F, G e H. As “mating populations” A e D produzem elevado nível de fumonisinas, enquanto que as outras produzem pouco, ou não são produtoras. Espécies biológicas pertencentes às populações A, D e E são encontradas no milho, com predominância da população A (*F. verticillioides*) e D (*F. proliferatum*) (LESLIE et al., 1992).

Fusarium verticillioides possui microconidióforos sem ramificações formadas no micélio aéreo, com 1-3 alongamentos simples de fiálides. Apresenta duas formas de esporos,

os microconídios e os macroconídios. Os microconídios são unicelulares, clavados com base redonda ou truncada e os macroconídios são delgados e septados (3-7 septos), retos ou ligeiramente curvos, fusiformes com célula apical alongada frequentemente curvada e célula basal pediculada (célula pé) (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A temperatura ótima para crescimento de *F. verticillioides* situa-se entre 22,5 e 27,5°C, ficando a máxima entre 32 e 37°C e a mínima entre 2,5 e 5,0°C, porém deve-se ressaltar que existem variações marcantes entre os isolados, sendo que alguns não crescem abaixo de 6°C e acima de 30°C (BACON; NELSON, 1994). Apesar de crescerem em diferentes faixas de temperatura, necessitam de alta atividade de água e de teores de umidades acima de 18%. As condições ótimas para o desenvolvimento de *F. verticillioides* em milho são temperatura de 25°C e atividade de água (aw) de 0,98 (TORRES et al., 2003).

O ciclo de vida de *F. verticillioides* em milho se inicia com a sua permanência restos de cultura. Os micélios desenvolvidos podem infectar as sementes no solo, desencadeando infecção sistêmica, atingindo a espiga. Entretanto, a via de contaminação mais efetiva consiste na disseminação de macro e microconídios através do ar e gotículas de chuva, que possibilita entrada de conídios pelos tecidos ou estigmas florais, atingindo diretamente o grão (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Pode ocorrer também infecção sistêmica, que se inicia a partir de conídios ou micélio que são transportados no interior, ou sobre a superfície da semente. O fungo se desenvolve dentro da planta jovem, movendo-se das raízes para o caule, e finalmente, para a espiga e grãos (MUNKVOLD; HELMICH; SHOWERS, 1997).

Embora a colonização fúngica ocorra facilmente através de aberturas naturais ou regiões não celulolíticas, a estratégia de invasão nas plantas consiste na secreção de enzimas hidrolíticas com ênfase a quitinases, celulasas, pectinases e proteases (KNOGGE, 1996). A infecção ocorre também através de lesões na semente, provocadas por pássaros ou insetos (WICKLOW et al., 1988).

Os sintomas provocados por *F. verticillioides* em grãos de milho variam desde grãos descoloridos, estrias brancas no pericarpo até severa podridão. Além disso, também é possível observar sinais do patógeno como a ocorrência de um micélio róseo cotonoso sobre a espiga (DESJARDINS et. al., 1998).

Fusarium verticillioides causa doenças em todos os estádios de desenvolvimento da cultura do milho, infectando raízes, caule e grãos, e em muitos casos a sua presença é ignorada por não causar danos visíveis. A infecção assintomática existe na planta e cepas do

fungo transmitidas pela semente são capazes de se desenvolver sistemicamente afetando os grãos (BACON et al., 1992).

No final do ciclo da cultura, após a colheita do milho, o fungo pode sobreviver no período de entre safras, colonizando sementes armazenadas. A intensificação do cultivo de milho, com mais de uma safra por ano, principalmente quando são realizados cultivos sucessivos, permite a perpetuação e o acúmulo de inóculo do patógeno e assim aumentar grandemente a incidência e severidade da doença (OLIVEIRA et al., 2009).

Fusarium verticillioides produz várias toxinas que possuem potencial toxicidade para seres humanos e animais domesticados. As mais significativas dessas toxinas produzidas por *F. verticillioides* são as fumonisinas. Uma vez que estas toxinas podem ser detectadas em grãos de milho, sintomáticos e assintomáticos (NELSON et al., 1993; DESJARDINS et al., 1995).

As fumonisinas pertencem ao grupo de fusariotoxinas descoberto em 1988 (GELDERBLOM et al., 1998), e constituem metabólito de *F. verticillioides* de maior toxicidade envolvido em intoxicações de animais (MARASAS, 1995).

A ingestão de milho e derivados contaminados com fumonisinas é preocupante, devido à sua associação com doenças no homem e em animais. Pois estas podem causar leucoencefalomalácia em equinos (ELEM), edema pulmonar em suínos e redução no desenvolvimento e imunossupressão em aves. Em ratos, foi comprovada a ação hepatotóxica e hepatocarcinogênica (GELDERBLOM et al., 1991). Em seres humanos, estudos epidemiológicos indicam a provável associação com câncer esofágico e câncer hepático primário (UENO et al., 1997).

De acordo com Pinto; Vergas e Preis (2007), o controle da podridão de espiga em lavouras comerciais se dá principalmente através do uso de genótipos resistentes e de arquitetura desfavorável à infecção, como espigas que dobram para baixo após sua maturação. Mas também envolve a utilização de cultivares resistentes, de sementes livres dos patógenos, a destruição de restos culturais de milho infectados e a rotação de culturas (OLIVEIRA et al., 2009).

2.1. Compatibilidade sexual e sua importância no estudo de populações de *Fusarium verticillioides*

Membros do GFSC são geralmente heterotáticos, como por exemplo, *F. verticillioides*. Para que ocorra reprodução sexual é necessária a interação entre dois esporos morfológicamente indistinguíveis, mas fisiologicamente distintos, sendo a reprodução governada por dois alelos em um mesmo loco *MAT-1* e *MAT-2*. Para o sucesso de um cruzamento, um isolado deve possuir o alelo *MAT-1* e o outro isolado sexualmente compatível deve conter o alelo *MAT-2* (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Sendo assim, fungos heterotáticos só podem se reproduzir sexualmente, se isolados do tipo de acasalamento oposto estiverem presentes (KRONSTAD; STABEN, 1997).

Além do tipo de acasalamento, a natureza do sexo: masculino/ feminino/ hermafrodita, dos participantes no acasalamento, confere uma maior complexidade à interação de acasalamento. O progenitor a partir do qual se originou o gameta masculino é denominado o progenitor masculino, enquanto o micélio parental sobre o qual se desenvolve a estrutura reprodutiva feminina é denominado o progenitor feminino. O gameta masculino pode ser um esporo produzido assexuadamente, sexuadamente, ou um fragmento de micélio. A estrutura fêmea é geralmente muito mais elaborada, exigindo um alto grau de especialização celular e o desenvolvimento de uma estrutura altamente organizada. A estrutura reprodutiva feminina geralmente tem função limitada à reprodução sexual, enquanto o gameta masculino geralmente não é tão limitada. O hermafrodita autoestéril é capaz de produzir gametas masculinos e formar a estrutura reprodutiva feminina. Quando a estrutura feminina é fertilizada por um gameta masculino, em seguida, a estrutura amadurece produzindo ascósporos que são derivados a partir dos produtos da meiose de um núcleo diplóide (LESLIE; KLEIN, 1996).

Em teoria, as funções do sexo masculino ou do sexo feminino podem ser perdidas independentemente para gerar isolados que são apenas macho, fêmea, ou a geração de hermafroditas em equilíbrio, dependendo da história da população e da estabilidade ambiental (NAUTA; HOEKSTRA, 1992).

A diversidade genética é geralmente mais prevalente em populações que sofrem reprodução sexual, do que em populações que se reproduzem predominantemente de forma assexual (MILGROOM; PEEVER, 2003). Populações de patógenos que sofrem frequente recombinação apresentam uma maior chance de superar os genes de resistência do

hospedeiro, do que os patógenos estritamente assexuados, assim como maior capacidade de desenvolver resistência a fungicidas (MCDONALD; LINDE, 2002).

Comparar o tamanho de diferentes populações de fungos no campo pode ser difícil. Mas, o tamanho efetivo da população (N_e) pode fornecer uma estimativa do tamanho relativo de uma população, para uma população de acasalamento aleatório (CABALLERO, 1994).

Num contexto de genética de população, o tamanho efetivo da população é normalmente utilizado na avaliação de populações de campo, devido, muitas vezes, ao acasalamento ocorrer de forma aleatória, e nem todos os membros da população deixam o mesmo número de descendentes. As equações utilizadas para calcular o tamanho efetivo da população dependem das restrições colocadas sobre a população, devido a sua estratégia reprodutiva (CABALLERO, 1994). A frequência relativa dos alelos dos tipos de acasalamento e hermafroditas afeta a facilidade com que a população pode passar pelo ciclo sexual. Máximos de tamanhos efetivos nestes fungos ocorrem quando os alelos do tipo de acasalamento estão presentes numa razão de 1:1, e todos os isolados são autoestéreis hermafroditas (BRITZ et al., 1998).

Alguns estudos vêm sendo realizados, com objetivo de conhecer o potencial de reprodução sexual de diferentes populações de *F. verticillioides*. Parâmetros, como frequência do tipo de acasalamento e fertilidade feminina foram investigados em populações de *F. verticillioides* na Argentina (CHULZE et al., 2000; REYNOSO; TORRES; CHULZE, 2006), Costa Rica (DANIELSEN; MEYER; FUNCK, 1998), EUA (LESLIE; KLEIN, 1996), Filipinas (CUMAGUN, 2007), Itália (VENTURINI, 2011) e Tanzânia (MANSUETUS et al., 1997), gerando o tamanho efetivo da população e caracterizando a reprodução sexual dentro da população do campo.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar por meio de cruzamentos, isolados de *F. verticillioides* dos três principais climas zonais que se cultiva milho no Brasil, através de cruzamentos de isolados do campo de *F. verticillioides*, com testadores de *Gibberella moniliformis*; determinar a frequência de hermafroditismo; distribuição de tipos de acasalamento; e calcular o tamanho efetivo da população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier. 2005. 922p.

BACON, C. W.; BENNETT, R. M.; HINTON, D. M.; VOSS, K. A. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. **APS Press**, Minneapolis, v.76, p. 144-148, 1992.

BACON, C. W.; NELSON, P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.57, n.6, p. 514-521, 1994.

BARBANO, M.T.; DUARTE, A. P.; BRUNINI, O.; RECO, P. C.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; KANTHACK, R. A. D. Temperatura-base e acúmulo térmico no subperíodo semeadura-florescimento masculino em cultivares de milho no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v.9, n. 2, p. 261-268, 2001

BRASIL. **Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996**. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. Diário Oficial da União, Brasília, n. 72, p. 1- 3, 1996.

BRITZ, H.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A.; MARASAS, W. F. O.; LESLIE, J. F. Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2094–2095, 1998.

BULLERMAN, L. B.; TSAI, W. J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 541-546, 1994.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A. Mycogeography of *Fusarium*: survey of *Fusarium* species in subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland. **Mycological Research**, Australia, v. 96, p. 780-784, 1992.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S. GOTT, K.P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for *Fusarium* research**. Sydney: University of Sydney, 1994. 133p.

CABALLERO, A. Developments in the prediction of effective population size. **Heredity**, v. 73, p. 657–679, 1994.

CARVALHO, H. W. L. de; SANTOS, M. X. dos; LEAL, M. de L. da. S.; TABOSA, J. N.; CARDOSO, M. J.; CARVALHO, B. C. L. de.; LIRA, M. A.; MONTEIRO, A. A. T.; ALBUQUERQUE, M. M. de. **Melhoramento genético de milho no nordeste brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA- CPATSA, 1999. 95 p.

CHULZE, S. N.; RAMIREZ, M. L.; TORRES, A. T.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium* section Liseola from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 5312–5315, 2000.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F. de.; MATRANGOLO, W. J. R.; ALBUQUERQUE FILHO, M. R. de. **Sistema de produção: cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Versão eletrônica).

CUMAGUN, C. J. R. Female fertility and mating type distribution in a Philippine population of *Fusarium verticillioides*. **Journal of Applied Genetics**. v. 48, p. 123–126, 2007.

DANIELSEN, S.; MEYER, U. M.; FUNCK, J. D. Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Costa Rica. **Plant Pathology**. v. 47, p. 615–622, 1998.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; LU, M.; CLAFLIN, L. E. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 953-958, 1998.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; NELSEN, T. C.; LESLIE, J. F. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p 79-86, 1995.

DUARTE, J. O. de.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Economia da produção. IN: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 2. ed. Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/economia.htm> Acesso em: 20 de janeiro de 2012.

FANCELLI, A. L. Fisiologia da produção e aspectos básicos de manejo para alto rendimento. In: SANDINI, I.; FANCELLI, A. L. (Ed.). **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 103 - 116.

FANCELLI, A. L. Tecnologia da produção. In: FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. (Ed.). **Milho: produção, processamento e transformação industrial**. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p. 1-68.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360 p.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.

GELDERBLOM, W. C. A.; KRIEK, N. P. J.; MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1991.

GELDERBLOM, W. C.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F.; THIEL, P. G.; HOROK, R. M.; VLEGGAR, R. N. P. Fumonisins – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54. p. 1806-1811, 1998.

INDEX FUNGORUM, 2013. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/> Acesso em: 15 de jan. 2013

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal 2010**. Banco de dados. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012. Disponível em: <http://serieestatisticas.ibge.gov.br/lista_tema.aspx?op=0&no=1> Acesso em: 22 de janeiro de 2013

JIMÉNEZ, M, RODRIGUEZ, S. MATEO J.J., GIL J. V. MATEO, R. Characterization of *Gibberella fujikuroi* complex isolates by fumonisin B1 and B2 analysis and by RAPD and restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p. 546-555, 2000.

KNOGEE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1711-1722, 1996.

KRONSTAD, J. W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review of Genetics**, v. 31, p. 245-246, 1997.

LESLIE, J. F.; KLEIN, K. K. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. **Genetics**, v. 144, p. 557–567, 1996.

LESLIE, J. F.; PLATTNER, R. D.; DESJARDINS, A. E.; KLITTICH, C. J. R. Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). **APS Press**, Minneapolis, v. 82, p. 341–34, 1992.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 104, n. 6, p 1408-1419, 2012.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. 10 p. (Circular Técnica, 76).

MANSUETUS, A. S. B.; ODVODY G. N.; FREDERIKSEN, R. A.; LESLIE, J. F. Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* section Liseola) recovered from sorghum in Tanzania. **Mycological Research**. v. 101, p. 815–820, 1997.

MARASAS, W. F. O. Fumonins: their implications for human and animal health. **Natural Toxins**, n. 3, p. 193-198, 1995.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 349-379, 2002.

MILGROOM, M. G.; PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. **APS Press**, Minneapolis, v. 87, n. 6, p-608-617, 2003.

MUNKVOLD, G. P.; HELMICH, R. L.; SHOWERS, W. B. *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. **APS Press**, Minneapolis, v. 87, p 1071-1077, 1997.

MUNKVOLD, G.P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?. **APS Press**, Minneapolis, v. 81, p. 556-565, 1997.

NAUTA, M.J.; HOEKSTRA, R. F. Evolution of reproductive systems in filamentous ascomycetes. II. Evolution of hermaphroditism and other reproductive strategies. **Heredity**, v. 68, p. 537-546, 1992.

NELSON, P. E., DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 233-252, 1993.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIREMBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 465-493, 1998.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**. v.144, p. 31-43, 2006.

OLIVEIRA, I. R.; CARVALHO, H. W. L.; PACHECO, C. A. P.; MELO, K. E. O.; MENEZES, A. F.; SILVA, B. S. F.; FEITOSA, L. F.; RODRIGUES, C. S. **Ocorrência de podridão em espigas de milho em Sergipe**. Aracaju: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 9 p. (Circular Técnica, 55).

PAES, M. C. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006. 6 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 75)

PINTO, N. F. J. A.; VERGAS, E. A.; PREIS, R. A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 304-306, 2007.

PINTO, N. F. J. Incidência de grãos ardidos em cultivares de milho precoce. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, n. 4, p. 433-436. 2001

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MacDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal feed Science and Technology**, Amsterdam, v.78, p. 21-37, 1999.

REYNOSO, M. M.; TORRES, A. T.; CHULZE, S. N. Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize kernels in Argentina. **Plant Pathology Journal**. v. 5, p. 350–355, 2006.

REZENDE, R.; FREITAS, P. S. L.; MANTOVANI, E. C.; FRIZZONE, J. A. Função de produção da cultura do milho e do feijão para diferentes lâminas e uniformidade de aplicação de água. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 503-511, 2004.

SHIOGA, P. S.; OLIVEIRA, E. L.; GERAGE, A. C. Densidade de plantas e adubação nitrogenada em milho cultivado na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 3, p. 381-390, 2004.

TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SOLER, J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.185-193, 2003.

TRENTO, S. M.; IRGANG, H. H.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.

TSUNECHIRO, A.; PEREZ, L. H. Custo e rentabilidade da produção de milho safrinha em dois níveis tecnológicos. **Análises e Indicadores de Agronegócio**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 1-4, 2007.

UENO, Y.; IJIMA, K.; WANG, S.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S. Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.35, p.1143-1150, 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2013 Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/FungusHost.cfm>> Acesso em: 23 de fev. 2013

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>> Acesso em: 10 de jan. 2013

VENTURINI, G.; ASSANTE, G.; TOFFOLATTI, S. L.; VERCESI, V. Mating behavior of a Northern Italian population of *Fusarium verticillioides* associated with maize. **Journal of Applied Genetics**. v. 52, p. 367–370, 2011.

WATANABE, M.; YONEZAWA, T.; LEE, K.; KUMAGAI, S.; SUGITA-KONISHI, Y.; GOTO, K.; HARA-KUDO, Y. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 322, n. 11, 2011.

WICKLOW D. T.; HORN, B. W.; SHOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W.; CALDWELL, R. W. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. **Phytopathology**, v. 78, p. 68-74, 1988.

CAPÍTULO II

FREQUÊNCIA DE HERMAFRODITAS E DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE ACASALAMENTO EM POPULAÇÕES DE *Fusarium verticillioides* ASSOCIADAS AO MILHO EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS DO BRASIL

FREQUÊNCIA DE HERMAFRODITAS E DISTRIBUIÇÃO DE TIPOS DE ACASALAMENTO EM POPULAÇÕES DE *Fusarium verticillioides* ASSOCIADAS AO MILHO EM DIFERENTES ZONAS CLIMÁTICAS DO BRASIL

André Angelo Medeiros Gomes¹; Josiene Silva Veloso¹; Cristiano Souza Lima¹

¹ Departamento de Agronomia - Área de Fitossanidade (Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 53171-900 Recife-PE, Brasil.

Autor para correspondência

Cristiano Souza Lima Fone:+55 87 3764 5500

E-mail: cristiano@uag.ufrpe.br

Endereço Postal: Unidade Acadêmica de Garanhuns
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Av Bom Pastor, s/n – Boa Vista
55292-270 Garanhuns - PE
BRAZIL

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de milho (*Zea mays* L.) do mundo e a fusariose, causada por *Fusarium verticillioides*, seja em espigas ou no colmo, é um problema recorrente quando condições ambientes favorecem o surgimento de epidemias no campo ou em armazenamento. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar por meio de cruzamentos sexuais, isolados de *F. verticillioides* dos três principais climas zonais que se cultiva milho no Brasil. Através de cruzamentos de isolados do campo de *F. verticillioides*, com testadores de *Gibberella moniliformis*; e determinar a taxa de fertilidade, frequência de

hermafroditismo, e tamanho efetivo da população. Dos 300 isolados estudados, 231 tiveram cruzamento fértil. Os tipos de acasalamento *MAT-1* e *MAT-2* segregaram numa proporção 105:126. Entre os 231 isolados férteis, 96 se comportaram como hermafroditas e 135 como fêmeas estéreis. Na população total, do Brasil, levando em consideração o tipo de acasalamento, o tamanho efetivo da população $N_{e(mt)}$, foi de 99% da população total, e tomando por base a frequência de hermafrodita, o tamanho efetivo $N_{e(f)}$ foi de 83% da população total. Quando o número total de isolados é subdividido em três populações distintas, baseado nas condições de clima de local de coleta dos isolados, as frequências de hermafroditas foram; 33 hermafroditas dentre 80 isolados férteis do Clima Zonal Tropical Equatorial (ZTE), com 47 se comportando como fêmea estéril; 14 hermafroditas dentre 78 isolados férteis do Clima Zonal Temperado (ZT), com 64 se comportando como fêmea estéril; e 49 hermafroditas dentre 73 isolados do Clima Zonal Tropical Brasil Central (ZTBC), com apenas 24 se comportando como fêmea estéril. O tamanho efetivo das populações representadas por isolados dos climas ZTE, ZT e ZTBC, foram $N_{e(mt)} = 99, 100, 97$ e $N_{e(f)} = 83, 52, 96$ respectivamente, expresso em porcentagem do número total de indivíduos de cada população. A população brasileira de *F. verticillioides* analisada apresenta alto índice de fertilidade e tamanho efetivo, sugerindo a possibilidade de frequente reprodução sexuada no campo. Aparentemente, existe uma tendência de maior fertilidade da população em latitudes menores, representadas pelo clima tropical.

Palavras-chave: *Gibberella moniliformis*, parâmetros de reprodução sexual, hermafroditismo.

ABSTRACT

Brazil is one of the biggest producers and consumers of maize (*Zea mays* L.) in the world and the fusariosis caused by *Fusarium verticillioides*, on ears and or on stalk, is a recurrent

problem when environmental conditions favor epidemics in the field or in storage. The present study aimed to characterize through crosses the *F. verticillioides* isolates from the three main climatic zones where maize is grown in Brazil. The fertility and effective population size were calculated from data generated by crossing field isolates with female fertile testers of *F. verticillioides*. For the entire population, 231 out of 300 isolates were cross-fertile with tester isolates. *MAT-1* and *MAT-2* idiomorphs of the fertile isolates segregated in a 105:126 rate. Female isolates (hermaphrodites) were 96 out of 231 fertile isolates, while 135 were male only isolates. The $N_{e(mt)}$ was 99% of the count for the Brazilian population when the mating type idiomorphs were used as predictors in the estimative of the population size. But when this calculation was made on the basis of the female fertile isolates the $N_{e(f)}$ was 83%. When the total population is divided into sub-populations representing climatic zones, the frequencies of female fertile isolates were 33 out of 80 fertile isolates from the Equatorial Tropical Zonal Climate (ETZC); 14 out of 78 fertile isolates from the Temperate Zonal Climate (TZC); and 49 out of 73 fertile isolates from the Tropical Central Brazil Zonal Climate (TCBZ). The effective population size expressed in percentage of the total number of individual in each population for the three populations represented by isolates from the ETZC, TZC and TCBZ were $N_{e(mt)} = 99, 100, 97$ and $N_{e(f)} = 83, 52, 96$ respectively. The Brazilian population of *F. verticillioides* shows high fertility and high effective population size, suggesting the possibility of frequent sexual reproduction in the field. Apparently there is a tendency of higher fertility in populations established at low latitudes, represented by the tropical climate.

Keywords: *Gibberella moniliformis*, parameters of sexual reproduction, female fertility.

Abreviações

GFSC, Complexo de espécie *Gibberella fujikuroi*; ZTBC, Zonal Tropical Brasil Central; ZT, Zonal Temperado; ZTE, Zonal Tropical Equatorial.

Destaques

Parâmetros de reprodução sexual em *Fusarium verticillioides* no Brasil.

Alta taxa de fertilidade sexual de população de *Fusarium verticillioides* no Brasil.

Influência do Clima na fertilidade feminina de *Gibberella moniliformis*.

1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas utilizadas na alimentação humana e animal e seu cultivo ocupa uma área de mais de 150 milhões de hectares distribuídos pelo mundo (Food and Agriculture Organization, 2010). Sendo considerado um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo, devido ao seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo. Apresenta assim um papel importante na economia mundial, além de constituir-se em indispensável matéria-prima para inúmeros complexos agroindustriais (Fancelli e Dourado-Neto, 2004).

O Brasil se caracteriza como o terceiro maior produtor mundial de milho (United States Department of Agriculture, 2013). Sendo cultivado em diferentes sistemas de produção como o sistema de cultivo intensivo, com utilização de várias tecnologias ligadas à cultura, potencializando seu rendimento, como a utilização de cultivares de alto potencial genético, melhoria na qualidade das sementes, controle de doenças, correção da acidez e adubação do solo, dentre outras, característico das principais regiões produtoras do país, como as regiões Sul e Centro Oeste; e o sistema de produção voltado à agricultura familiar, que não dispõe de técnicas avançadas de produção, fazendo o cultivo de variedades crioulas por exemplo, característica de cultivo na região Nordeste do país.

A cultura pode ser afetada por diversas doenças, refletindo negativamente no rendimento da cultura (Oerke, 2006). Dentre estas, destaca-se a podridão rosada da espiga causada por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo, *Fusarium moniliforme* Sheldon; teleomorfo, *Gibberella moniliformis* Wineland; mating population A). A espécie apresenta uma distribuição ampla, ocorrendo tanto nas zonas temperadas úmidas e sub-úmidas como nas tropicais e subtropicais (Burgess e Summerell, 1992).

A espécie pertence ao complexo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw (GFSC). Que corresponde aproximadamente à seção *Liseola*. O GFSC contém pelo menos 12 espécies biológicas (“mating populations”) geneticamente distintas (*F. circinatum* Nirenberg e O'Donnell, *F. fujikuroi* Nirenberg, *F. konzum* Zeller, Summerell e Leslie, *F. mangiferae* Britz, Wingf. e Marasas, *F. nygamai* Burgess e Trimboli, *F. proliferatum*, *F. sacchari* (Butler e Hafiz Khan) Gams, *F. sterilihyphosum* Britz, Marasas e Wingf., *F. subglutinans* (Wollenw. e Reinking) Nelson, Toussoun e Marasas, *F. thapsinum* Klittich, Leslie, Nelson e Marasas, *F. tupiense* Lima, *F. verticillioides*) (LIMA et al., 2012).

Fusarium verticillioides produz várias toxinas que possuem potencial de toxicidade para seres humanos e animais domesticados. A mais significativa dessas toxinas são as fumonisinas. Uma vez que estas toxinas podem ser detectadas em grãos de milho, sintomáticos e assintomáticos (Desjardins et al. 1995; Nelson et al. 1993). A ingestão de milho e derivados contaminados com fumonisinas é preocupante, devido à sua associação com doenças no homem e em animais (Gelderblom et al. 1991; Ueno et al. 1997).

Membros do GFSC são geralmente heterotálicos, assim como *F. verticillioides*. Para que ocorra reprodução sexual é necessária a interação entre dois indivíduos morfológicamente indistinguíveis, mas fisiologicamente distintos e representando dois tipos de acasalamento compatíveis com a reprodução governada por dois alelos em um mesmo loco *MAT-1* e *MAT-2*. Para o sucesso de um cruzamento, um isolado deve conter o alelo *MAT-1* e o outro isolado o alelo *MAT-2* (Leslie e Summerell, 2006).

Além do tipo de acasalamento, a natureza do sexo: masculino/ feminino/ hermafrodita, dos participantes no acasalamento, confere uma maior complexidade à interação. O progenitor a partir do qual se originou o gameta masculino é denominado o progenitor masculino, enquanto o micélio parental sobre o qual se desenvolve a estrutura reprodutiva feminina é denominado o progenitor feminino. O gameta masculino pode ser um esporo produzido de forma assexual, sexual, ou um fragmento de micélio. A estrutura fêmea é geralmente muito mais elaborada, exigindo um alto grau de especialização celular e o desenvolvimento de uma estrutura altamente organizada. A estrutura reprodutiva feminina geralmente tem função limitada à reprodução sexual, enquanto o gameta masculino geralmente não é tão limitado. O hermafrodita, autoestéril, é capaz de produzir gametas masculinos e elaborar a estrutura reprodutiva feminina (Leslie e Klein, 1996).

A diversidade genética é geralmente mais prevalente em populações que sofrem reprodução sexual, do que em populações que se reproduzem predominantemente de forma assexual (Milgroom e Peever, 2003). Populações de patógenos que sofrem frequente recombinação apresentam uma maior chance de superar os genes de resistência do hospedeiro, do que os patógenos estritamente assexuados, assim como, maior capacidade de desenvolver resistência a fungicidas (McDonald e Linde, 2002).

Comparar o tamanho de diferentes populações de fungos no campo pode ser difícil, mas, o tamanho efetivo da população pode fornecer uma estimativa do tamanho relativo de uma população, para populações que o acasalamento ocorre de forma aleatória no campo (Caballero, 1994).

Num contexto de genética de população, o tamanho efetivo da população é normalmente utilizado na avaliação de populações de campo, devido, muitas vezes ao acasalamento ocorrer de forma aleatória, e nem todos os membros da população deixarem o mesmo número de descendentes. As equações utilizadas para calcular o tamanho efetivo da população dependem das restrições colocadas sobre a população, devida a sua estratégia

reprodutiva (Caballero, 1994). A frequência relativa dos alelos do tipo de acasalamento e hermafroditas, afeta a facilidade com que a população pode passar pelo ciclo sexual. Máximos de tamanhos efetivos nestes fungos ocorrem quando os alelos do tipo de acasalamento estão presentes numa razão de 1:1, e todos os isolados são hermafroditas autoestéreis (Britz et al. 1998).

Alguns estudos vêm sendo realizados com objetivo de conhecer o potencial de reprodução sexual de diferentes populações de *F. verticillioides*. Parâmetros, como frequência do tipo de acasalamento e fertilidade feminina foram investigados, em populações de *F. verticillioides* na Argentina (Chulze et al., 2000; Reynoso et al., 2006), Costa Rica (Danielsen et al., 1998), EUA (Leslie e Klein, 1996) Filipinas (Cumagun, 2007), Itália (Venturini, 2011) e Tanzânia (Mansuetus et al., 1997), gerando o tamanho efetivo da população e caracterizando a reprodução sexual dentro da população do campo.

O trabalho teve como objetivo caracterizar por meio de cruzamentos, isolados de *F. verticillioides* dos três principais climas zonais que se cultiva milho no Brasil, através de cruzamentos de isolados do campo de *F. verticillioides*, com testadores de *Gibberella moniliformis*; determinar a frequência de hermafroditismo; distribuição de tipos de acasalamento; e calcular o tamanho efetivo da população. A hipótese de trabalho é que os diferentes sistemas de cultivo ou zonas climáticas do Brasil podem influenciar na frequência de *mating types*, fertilidade e tamanho efetivo da população de *F. verticillioides* associado ao milho no Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados utilizados

Utilizou-se 300 isolados de *F. verticillioides*, isolados a partir de grãos de milho oriundos de várias regiões de cultivo de milho no Brasil. Os isolados foram recuperados da

Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos de Garanhuns (CCG), do Laboratório de Sistemática e Biologia de Fungos Fitopatogênicos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, PE. Cem isolados foram oriundos do clima Zonal Tropical Brasil Central (ZTBC), distribuídos entre os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul; cem isolados do clima Zonal Temperado (ZT), distribuídos entre os estados do Paraná e Santa Catarina; e cem do clima Zonal Tropical Equatorial (ZTE) distribuídos entre os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (Figura 1), representando três diferentes populações de *F. verticillioides*. Os isolados foram previamente identificados a nível específico, através de PCR com os *primers* VER1 e VER2 (Mulè, et al., 2004). De todos os isolados, foram preparadas subculturas monospóricas.

Como isolados testadores padrão, com tipo de acasalamento conhecido, para *G. moniliformis*, foram utilizados os isolados KSU 00149 (*MAT-1*) e KSU 00999 (*MAT-2*), cedidos pelo Department of Plant Pathology, Throckmorton Plant Sciences Center, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA e Fungal Genetics Stock Center do Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas, USA.

2.2. Estudos de Fertilidade

Os isolados de *F. verticillioides* oriundos dos três climas zonais foram submetidos a cruzamentos com isolados testadores KSU 00149 (*MAT-1*) e KSU 00999 (*MAT-2*). Os cruzamentos foram realizados de acordo com Leslie e Summerell (2006). Inicialmente, os isolados testadores com tipo de acasalamento conhecido, foram utilizados como parental feminino, e os isolados oriundos do campo, cujo tipo de acasalamento era desconhecido, foram utilizados como parental masculino no cruzamento. Cada isolado do campo foi cruzado com os dois isolados testadores.

Os isolados utilizados como parental feminino, foram cultivados em placa de Petri (60 x 15 mm) contendo meio de cultura cenoura ágar, e incubados a temperatura de 25° C no escuro, durante sete dias. Os isolados utilizados como parental masculino foram cultivados em tubos de ensaio contendo BDA + polivitamínico (vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C 600, vitamina E, pantotenato de cálcio, ácido fólico, nicotinamida, cobre e zinco), e foram incubados a 20° C, com fotoperíodo de 12h, durante sete dias.

Após o período de incubação, os conídios dos isolados do parental masculino foram suspensos em 2 mL de solução Tween 60 a 2,5% e a suspensão de conídios formada foi aplicada e espalhada na superfície da colônia do parental feminino, de forma suave utilizando alça de Drigalski. Os isolados, já fertilizados, foram incubados a 20° C com fotoperíodo de 12 h até a formação de peritécios e exsudação de um cirro de ascósporos, sendo avaliados até 28 dias após o cruzamento. Como controle positivo, foram realizados cruzamentos com isolados testadores cultivados em Cenoura Ágar servindo como parental feminino, que foram fertilizados com o testador que apresenta tipo de acasalamento oposto (fertilização cruzada). O controle negativo foi feito com H₂O destilada autoclavada, no lugar da suspensão de conídios (auto-cruzamento). O cruzamento foi considerado fértil, quando se observou cirro (massa de ascósporos) exsudando a partir de um peritécio maduro.

Uma vez que o tipo de acasalamento foi identificado, os papéis de macho e fêmea foram invertidos, e o isolado testador de tipo de acasalamento apropriado foi utilizado como parental masculino, e os isolados do campo como parental feminino.

Cada cruzamento considerado fértil foi repetido duas vezes, e os não férteis três vezes.

2.3. Cálculo do tamanho efetivo da população

As equações utilizadas para calcular o tamanho efetivo da população (N_e) foram propostas por Leslie e Klein (1996), com base na razão de tipo de acasalamento dentro da população [$N_{e(mi)}$], e na frequência relativa de isolados fêmea estéril e hermafrodita [$N_{e(f)}$].

O $[N_{e(mt)}]$ foi determinado pela equação $N_{e(mt)} = (4 N_{MAT-1} N_{MAT-2}) / (N_{MAT-1} + N_{MAT-2})$, onde N_{MAT-1} foi o número de isolados com o idiomorfo *MAT-1* e N_{MAT-2} foi o número de isolados que possuem o outro idiomorfo *MAT-2*. Esta equação, primeiramente, foi proposta por Wright (1931) para diplóides com dois sexos distintos, e é usada para diminuir o tamanho da população em fungos ascomicetos se ambos tipos de acasalamento não forem igualmente frequentes.

E o $[N_{e(f)}]$ foi calculado pela equação $N_{e(f)} = (4N^2N_h) / (N + N_h)^2$, onde N foi o número total de isolados e N_h foi o número de hermafroditas. Esta equação tem por base que, em populações no campo, muitos isolados são férteis como macho, mas não como fêmeas, devido a mutações e seleção contra hermafroditismo durante a propagação vegetativa. Em populações em que a reprodução sexual é importante, isolados fêmeas estéreis que se comportam apenas como machos são rapidamente perdidos por causa de sua desvantagem seletiva em relação aos hermafroditas que podem contribuir tanto com gametas masculinos como com gametas femininos para a próxima geração. Se a população se reproduz assexuadamente por grande parte do seu ciclo de vida, é provável a predominância de isolados com características de fêmea estéril. Quando uma população se reproduz sexualmente, a relativa falta de isolados com características de fêmea férteis limita o tamanho efetivo da população (Leslie e Summerell, 2006).

3. Resultados

Os isolados deste estudo foram cruzados com isolados testadores padrão. Dos 300 isolados estudados, 231 tiveram cruzamento fértil com um dos tipos de acasalamento testados, produzindo peritécio fértil com exsudação de cirro de ascósporos, entre duas a três semanas após o cruzamento. Os tipos de acasalamento *MAT-1* e *MAT-2* segregaram numa proporção 105:126 (Tabela 1).

Quando se subdivide o número total de isolados em três populações distintas, baseadas nas condições de clima de origem dos isolados, a proporção de segregação de *MAT-1* e *MAT-2* foi de 36:44 para isolados oriundos da ZTE, 39:39 para isolados oriundos da ZT, e 30:43 para isolados da ZTBC.

Entre os 231 isolados férteis, 96 se comportaram como hermafroditas e 135 como fêmeas estéreis. Já entre as populações, dentro do país, as frequências de hermafroditas foram; 33 hermafroditas dentre 80 isolados férteis da ZTE, com 47 se comportando como fêmea estéril; 14 hermafroditas dentre 78 isolados férteis da ZT, com 64 se comportando como fêmea estéril; e 49 hermafroditas dentre 73 isolados da ZTB, com apenas 24 se comportando como fêmea estéril (Tabela 1).

O tamanho efetivo da população foi calculada em função do tipo de acasalamento [$N_e(mt)$], e na frequência relativa de isolados fêmea estéril e hermafrodita [$N_e(f)$]. Na população do Brasil, levando em consideração o tipo de acasalamento, o $N_e(mt)$ foi de 99% (considerando-se a população total), e tomando por base a frequência de hermafrodita [$N_e(f)$] foi de 83% da população total.

O tamanho efetivo das populações representadas por isolados do Clima Zonal Tropical Equatorial, Clima Zonal Temperado, e Clima Zonal Tropical Brasil Central, foram [$N_e(mt)$] = 99, 100 e 97 respectivamente, expresso em porcentagem do número total de indivíduos de cada população, baseando-se no tipo de acasalamento. Quando o tamanho efetivo foi calculado em função da frequência de hermafroditas [$N_e(f)$], o tamanho foi de 83, 52 e 96, das respectivas populações, expresso em porcentagem do número total de indivíduos de cada população.

4. Discussão

Os cruzamentos realizados neste estudo mostraram que as populações de *F. verticillioides* analisadas do Brasil, apresentam uma alta taxa de fertilidade, pois 231 (77%)

dos isolados foram férteis. Resultado próximo ao observado por Cumagun (2007) nas Filipinas, ao cruzar isolados de *F. verticillioides* com isolados testadores padrão, que constatou 62,5% de fertilidade. Diferindo do resultado encontrado por Mohammadian et al. (2011), onde isolados de *F. verticillioides* de arroz no Iran não formaram peritécios em cruzamentos com isolados testadores.

Dos 231 isolados férteis, os tipos de acasalamento, *MAT-1* e *MAT-2*, segregaram na proporção 105:126, originando número de tamanho efetivo da população $[N_e(mt)] = 99\%$ da população total, em função do tipo de acasalamento. Valor próximo do máximo de tamanho efetivo da população, que ocorre quando os alelos do tipo de acasalamento estão presentes numa proporção de 1:1 (Britz et al. 1998). Fenômeno que ocorreu na população formada com isolados oriundos da ZT, cuja segregação do tipo de acasalamento foi na proporção de 39:39. Em teoria, o tipo de acasalamento segrega na proporção de 1: 1, devido esta característica ser controlada por um único loco mendeliano em ascomicetos heterotáticos (Leslie e Summerell, 2006).

Ambos os tipos de acasalamento, *MAT-1* e *MAT-2*, foram detectados nas populações de *F. verticillioides* estudadas no Brasil (Figura 1), sugerindo que a recombinação sexual pode ocorrer no campo, devido a presença dos dois tipos de acasalamento na mesma área (Leslie, 1995). Estudos conduzidos na Itália (Venturini, 2011), Filipinas (Cumagun, 2007), Argentina (Reynoso et al., 2006), Costa Rica (Danielsen et al., 1998) e nos EUA (Leslie e Klein, 1996), também detectaram a presença dos dois tipo de acasalamento, onde o $[N_e(mt)]$ também foi superior a 80%, mostrando um equilíbrio na frequência de tipo de acasalamento.

Quanto ao tamanho efetivo da população em função da frequência de isolados fêmeas estéreis e hermafroditas, a população amostrada do Brasil de *F. verticillioides*, apresentou $[N_e(f)] = 83\%$, cujo alto valor sugere que a reprodução sexual no campo é relativamente frequente, devido a alta frequência de isolados hermafroditas, pois esses, durante a reprodução sexual, apresentam vantagem seletiva em relação aos isolados fêmea estéril, por contribuírem

tanto com gametas masculinos como com femininos para a próxima geração (Leslie e Klein, 1996). A comparação entre o valor de $[N_e(f)]$ obtido nesse estudo, com valores obtidos por outros autores, aponta que a estrutura da população brasileira examinada de *F. verticillioides*, assemelha a população da Argentina, Costa Rica, Tanzânia e EUA, avaliadas por Reynoso et al. (2006), Danielsen et al. (1998), Mansuetus et al. (1997) e Leslie e Klein (1996) respectivamente, que apresentam grande diversidade genética. Segundo Milgroom e Peever (2003), a diversidade genética é geralmente mais prevalente em populações que sofrem reprodução sexual, do que em populações que se reproduzem predominantemente de forma assexual.

Quando calculado os valores de $[N_e(f)]$ entre as populações dentro do Brasil, subdivididas pelas diferenças climáticas, observa-se que a população referente a ZT difere das demais, por apresentar relativamente menor frequência de hermafroditas, originando assim baixo valor de $[N_e(f)] = 52\%$, mesmo apresentando alto valor de $[N_e(mt)] = 100\%$, assim como as populações das ZTE $[N_e(mt)] = 83\%$ e ZTBC $[N_e(mt)] = 96\%$. Estes resultados indicam que a mera ocorrência dos dois tipos de acasalamento opostos, com altos valores de $[N_e(mt)]$, não implica por si só em uma alta frequência de reprodução sexual, pois essa está também relacionada à frequência de indivíduos hermafroditas dentro da população, demonstrado também em estudos com isolados das Filipinas (Cumagun, 2007). Apesar do sistema de cultivo de milho serem semelhantes nas ZT e ZTBC, existe diferenças entre o tamanho efetivo $[N_e(f)]$ dessas populações, sugerindo que existe algum fator, que não seja o sistema de manejo da cultura hospedeira, influenciando para um baixo valor de $[N_e(f)]$ na ZT, valor esse que está diretamente ligado a frequência de hermafrodita e logo na facilidade que esta população passa pela fase sexual. Parâmetros climáticos, como temperatura ambiente e precipitação, diferentes entre a população ZT e as populações ZTE e ZTBC, podem estar influenciando na baixa frequência de hermafroditas em ZT. O clima ZT apresenta média anual de temperatura inferior, quando comparado com os climas ZTE e ZTBC, além de apresentar invernos frios,

com chuvas distribuídas durante o ano todo, diferindo de ZTE e ZTBC onde as maiores médias de precipitação ocorrem no verão, e apresentando invernos secos, ou com pouca chuvas. Estudos realizados em países com clima temperado, semelhantes a ZT, como Itália (Venturini, 2011) e Argentina (Chulze et al. 2000), em populações de *F. verticillioides* também apresentaram baixo $[N_e(f)]$, 55% e 36% respectivamente. Assim como, estudos realizados em países tropicais como Costa Rica (Danielsen et al. 1998) e Tanzânia (Mansuetus et al. 1997), clima semelhante a ZTE e ZTBC, as população de *F. verticillioides* apresentaram altos valores de $[N_e(f)]$ 98% e 88% respectivamente, semelhantes aos valores encontrados em ZTE e ZTBC.

O fato de isolados de *F. verticillioides* obtidos nos EUA produzirem cruzamentos férteis com isolados obtidos de diversas regiões do Brasil leva a crer que a disseminação dessa espécie pelo mundo ocorreu recentemente na história evolutiva. Isto pode ser explicado pelo fato de não ter sido detectado indícios de isolamento reprodutivo entre populações geograficamente muito distantes.

Este estudo mostra que a população brasileira de *F. verticillioides* analisada apresenta alto índice de fertilidade, e tamanho efetivo alto, indicando uma grande capacidade dessa população de promover recombinação genética. Essas características tornam essa população apta a realizar reprodução sexual no campo, o que pode promover maior variação genética dentro da população, podendo propiciar maiores índices de patogenicidade, agressividade, e maior capacidade de síntese de fumonisinas. Aparentemente, existe uma tendência da espécie de se reproduzir sexuadamente com maior frequência à medida que a população se localiza em latitudes menores, onde predomina o clima tropical. Estudos posteriores poderiam ser feitos, a fim de associar a fertilidade no campo com a síntese de fumonisinas, a fim de elucidar o potencial de produção dessa toxina por cada população.

Tabela 1

Tamanho efetivo da população, e parâmetros de reprodução sexual de *Fusarium verticillioides*.

População	Total de isolados estudados	Total de isolados férteis	Proporção tipo de acasalamento	$N_{fs} : N_h$	Tamanho efetivo da população	
					$[N_{e(mt)}]$	$[N_{e(\rho)}]$
ZTE ¹	100	80	36 : 44	47 : 33	99	83
ZT ²	100	78	39 : 39	64 : 14	100	52
ZTBC ³	100	73	30 : 43	24 : 49	97	96
Brasil ⁴	300	231	105 : 126	135 : 96	99	83

¹Clima Zonal Tropical Equatorial

²Clima Zonal Temperado

³Clima Zonal Tropical Brasil Central

N_{fs} - Número de isolados fêmeas estéreis

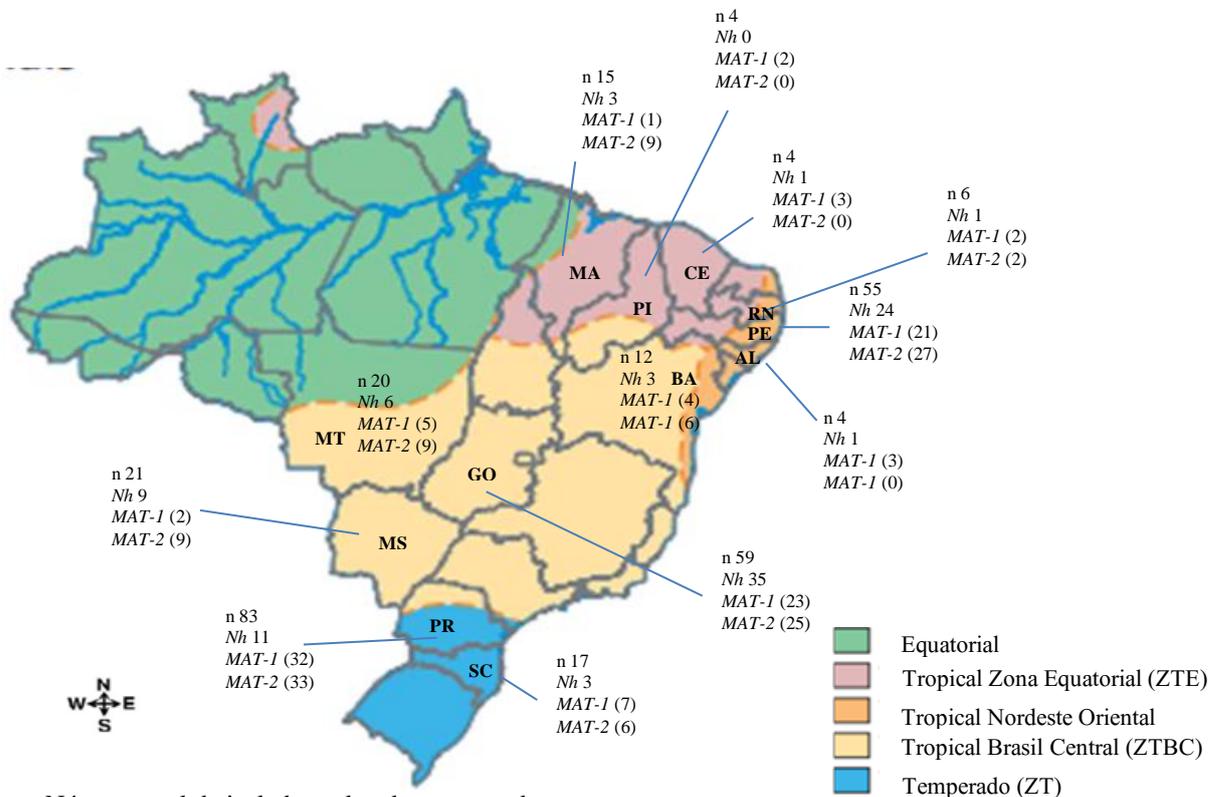
N_h - Número de isolados hermafroditas

$[N_{e(mt)}]$ - Tamanho efetivo da população, baseada no tipo de acasalamento, em porcentagem do número total de indivíduos da população;

$[N_{e(\rho)}]$ - Tamanho efetivo da população, baseada na frequência de isolados fêmeas estéreis e hermafroditas, em porcentagem do número total de indivíduos da população.

Figura 1

Distribuição de parâmetros de reprodução sexuada, dos isolado de *Fusarium verticillioides* no Brasil, em função geográfica.



n = Número total de isolados coletados por estado;
 Nh = Número de isolados hermafroditas;
 MAT-1 = Número de isolados com tipo de acasalamento MAT-1;
 MAT-2 = Número de isolados com tipo de acasalamento MAT-2.

Referências

- Britz, H., Wingfield, M.J., Coutinho, T.A., Marasas, W.F.O., Leslie, J.F., 1998. Female fertility and mating type distribution in a South African population of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2094–2095.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., 1992. Mycogeography of *Fusarium*: Survey of *Fusarium* species in subtropical and semi-arid grassland soils from Queensland. Mycol. Res. 96, 780-784.
- Caballero, A., 1994. Developments in the prediction of effective population size. Heredity 73, 657–679.
- Chulze, S.N., Ramirez, M.L., Torres, A.T., Leslie, J.F., 2000. Genetic variation in *Fusarium* section *Liseola* from no-till maize in Argentina. Appl. Environ. Microbiol. 66, 5312–5315.
- Cumagun, C.J.R., 2007. Female fertility and mating type distribution in a Philippine population of *Fusarium verticillioides*. J. Appl. Genet. 48, 123–126.
- Danielsen, S., Meyer, U.M., Funck, Jensen, D., 1998. Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Costa Rica. Plant. Pathol. 47, 615–622.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nelsen, T.C., Leslie, J.F., 1995. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. Appl. Environ. Microbiol. 61, 79-86.
- Fancelli, A.L., Dourado-Neto, D., 2004. Produção de milho, segunda ed. Agropecuária, Guaíba.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2010. ESS Yearbook. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-trade/en/> Acesso em: 10 de Janeiro de 2013
- Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. Carcinogenesis 12, 1247-1251.
- Leslie, J.F., 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. Can. J. Bot. 73, 282–291.

Leslie, J.F., Klein, K.K., 1996. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*. 144, 557–567.

Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. The *Fusarium* laboratory manual, primeira ed. Blackwell Publishing.

Lima, C.S., Pfenning, L.H., Costa, S.S., Abreu, L.M., 2012. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil. *Mycologia* 104, 1408-1419.

Mansuetus, A.S.B., Odvody G.N., Frederiksen, R.A., Leslie, J.F., 1997. Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* section Liseola) recovered from sorghum in Tanzania. *Mycol. Res.* 101, 815–820.

Mcdonald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 349-379.

Milgroom, M.G., Peever, T.L., 2003. Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Dis.* 87, 608-617.

Mohammadian, E., Javan-Nikkhah, M., Okhovvat, S. M., Ghazanfari, K., 2011. Study on genetic diversity of *Gibberella moniliformis* and *G. intermedia* from corn and rice, and determination of fertility status and of mating type alleles. *Aust. J. Crop. Sc.* 5, 1448-1454.

Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A., 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for the identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 110, 495-502.

Nelson, P.E., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 233-252.

Oerke, E.C., 2006. Crop losses to pests. *J. AGR. SCI.* 144, 31-43.

Reynoso, M.M., Torres, A.T., Chulze, S.N., 2006. Biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize kernels in Argentina. *Plant Pathol. J.* 5, 350–355.

Ueno, Y., Iijima, K., Wang, S., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T., Chen, C., Yu, S.Z., 1997. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer. A 3- year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem. Toxicol.* 35, 1143-1150.

United States Department of Agriculture. 2013 Disponível em: <
[http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=World+Corn+P
roduction%2c+Consumption%2c+and+Stocks++++&hidReportRetrievalID=459&hidReportRetrievalTemplateID=7](http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=World+Corn+Production%2c+Consumption%2c+and+Stocks++++&hidReportRetrievalID=459&hidReportRetrievalTemplateID=7)
> Acesso em: 20 de janeiro de 2013

Venturini, G., Assante, G., Toffolatti, S.L., Vercesi, V., 2011. Mating behavior of a Northern Italian population of *Fusarium verticillioides* associated with maize. *J. Appl. Genetics.* 52, 367–370.

Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics.* 16, 97-159.

CAPÍTULO III

Conclusão Geral

Conclusão Geral

Este estudo mostra que a população brasileira de *F. verticillioides* analisada apresenta alto índice de fertilidade, e tamanho efetivo alto, indicando uma grande capacidade dessa população de promover recombinação genética. Essas características tornam essa população apta a realizar reprodução sexual no campo, o que pode promover maior variação genética dentro da população, podendo propiciar maiores índices de patogenicidade, agressividade, e maior capacidade de síntese de fumonisinas. Aparentemente, existe uma tendência da espécie de se reproduzir sexuadamente com maior frequência à medida que a população se localiza em latitudes menores, onde predomina o clima tropical. Estudos posteriores poderiam ser feitos, a fim de associar a fertilidade no campo com a síntese de fumonisinas, a fim de elucidar o potencial de produção dessa toxina por cada população.