

**RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA**

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E ÁCIDO TENUAZÔNICO EM GRÃOS  
DE SORGO CULTIVADOS EM DIFERENTES ÉPOCAS DE SEMEADURA  
E ESTUDO POLIFÁSICO DE CEPAS DE *Phoma* spp. ISOLADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Microbiologia do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para a obtenção do título de Doutor em  
Ciências.

São Paulo  
2017

**RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA**

**DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E ÁCIDO TENUAZÔNICO EM GRÃOS  
DE SORGO CULTIVADOS EM DIFERENTES ÉPOCAS DE SEMEADURA  
E ESTUDO POLIFÁSICO DE CEPAS DE *Phoma* spp. ISOLADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cardoso de Oliveira, Rodrigo  
DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS E ÁCIDO TENUAZÔNICO EM  
GRÃOS DE SORGO CULTIVADOS EM DIFERENTES ÉPOCAS DE  
SEMEADURA E ESTUDO POLIFÁSICO DE CEPAS DE *Phoma*  
*spp.* ISOLADAS / Rodrigo Cardoso de Oliveira;  
orientador Benedito Corrêa. -- São Paulo, 2017.  
106 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Sorgo. 2. Micotoxinas. 3. *Phoma*. 4. *Epicoccum*  
*sorghinum*. 5. Ácido tenuazônico. I. Corrêa, Benedito  
, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Rodrigo Cardoso de Oliveira.

Titulo da Tese: Distribuição de fungos e ácido tenuazônico em grãos de sorgo cultivados em diferentes épocas de semeadura e estudo polifásico de cepas de *Phoma* spp. isoladas.

Orientador(a): Prof. Dr. Benedito Corrêa.

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a)

**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

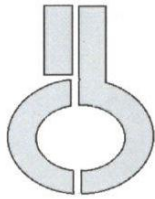
**Examinador(a):** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Examinador(a):** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Examinador(a)** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Examinador(a)** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....

**Presidente:** Assinatura.....  
Nome.....  
Instituição.....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone: (55) (011) 3091 7733- e-mail: cep@icb.usp.br

---

Decl. CEP SH.031/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Protocolo de Isenção CEP-ICB nº 531/12, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Distribuição de fungos e micotoxinas e estudo polifásico de cepas de Phoma spp. isoladas de grãos de sorgo em diferentes épocas de semeadura*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 24 de setembro de 2014.

Prof. Dr. PAOLO M.A.ZAONOTTO  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES  
Vice- Coordenador da Comissão de  
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

*Dedico esta tese ao mais importante alicerce da vida, minha amada família. Sou grato pelo apoio incondicional em todos os momentos e, acima de tudo, pelo amor, este sentimento que sempre nos cercou. Sem vocês esta etapa não seria possível de ser atingida. Este título é de todos nós.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por mais uma etapa vencida. Obrigado pelo cuidado, pela direção nos momentos difíceis e por sempre estar ao meu lado.

Ao Professor Dr. Benedito Corrêa. Para mim foi um privilégio tê-lo como orientador e amigo durante esses cinco anos. Levarei seus ensinamentos, principalmente a generosidade ao próximo e a forma simples de ver a vida, durante a minha caminhada. Sou imensamente grato pelas oportunidades e pelo apoio durante este período. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr. Sergio Paulo Diniz pela amizade, confiança e por me inserir no mundo científico. Muito obrigado.

À Professora Dra. Sarah Santos Gonçalves. Um dos melhores presentes que esta etapa me proporcionou. Sou grato por você dividir seus conhecimentos e expressar sua amizade de maneira tão sincera. Você é um exemplo para mim.

Aos alunos de iniciação científica, Priscilla Bianchi, Claudiana Dias Cavalcante da Silva e Michel Dantas, pela contribuição neste trabalho e pela oportunidade de auxiliá-los na conclusão de seus estudos.

Ao Dr. Rogério Soares de Freitas pelo auxílio na implementação deste estudo, bem como nas coletas das amostras.

Ao grupo do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade de Santa Maria pelo apoio imprescindível nas análises químicas e por transmitir os conhecimentos relacionados ao tema.

À Dra. Debora Rodrigues por me receber em seu laboratório e por colaborar de maneira valiosa na realização deste trabalho.

Aos amigos Hang Nguyen e Enrico Nardez pela amizade e apoio durante o período de trabalho no exterior. As enriquecedoras diferenças culturais serão lembradas com muito carinho e respeito.

À Dra. Clemência Chaves Lopez. Agradeço pela oportunidade de trabalharmos juntos e acima de tudo pela amizade verdadeira que construímos. Sou grato por tê-la em minha vida.

À Tatiana Alves dos Reis pelo apoio na execução desse trabalho. Muito obrigado pelo convívio e amizade durante estes anos.

À Patrícia Zorzete pela oportunidade de trabalharmos juntos e por sempre estar disposta a ajudar em todos os momentos.

Aos queridos amigos: Natalia Yunes, Lorena Carnielli, Ednei Assunção, Luciana Gimenez, Danielle Diniz Atayde, Tainah Drumond de Oliveira e Leandro Buffoni pela amizade sincera que ultrapassa o ambiente de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fungos Dimórficos e Patogênicos, representados pelo Prof. Dr. Carlos P. Taborda.

Aos Professores Dr. Welington L. de Araújo e Dra. Kelly Ishida pelos conselhos e pela oportunidade de trabalharmos em conjunto.

Aos amigos e funcionários Gisele, Jacinta e Shirley pela colaboração e carinho.

À minha amada Mãe, Estela Maris, pelo incentivo, amor e cuidado. Obrigado por sempre estar ao meu lado. Ao meu Pai Luiz, por sempre me apoiar e querer o melhor em minha vida. À minha querida Irmã Krisiele, por sempre estar presente mesmo com a distância. Amo vocês.

Aos meus pais postiços Airton e Eliane, pelo apoio e carinho em todos os momentos. Vocês são sensacionais.

Ao companheiro João por compartilhar a vida de uma maneira tão especial. Obrigado pelo apoio em todos os momentos.

Aos amados amigos que a vida me proporcionou: Cibelle Montor, Eduardo Oliveira, Poliana Bergamo, Moises Cordeiro, Neide e família, Caroline Bordon, Emerson, Maísa, Belisa, Brenda e Leuani.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, ao Instituto de Ciências Biomédicas e à Universidade de São Paulo, pelo suporte necessário para realização deste trabalho.



À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o período de estágio no exterior. Processo BEX 6869-15-7.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através do processo n° 2012/09570-1.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

**Arthur Schopenhauer**

## RESUMO

OLIVEIRA, R. C. **Distribuição de fungos e ácido tenuazônico em grãos de sorgo cultivados em diferentes épocas de semeadura e estudo polifásico de cepas de *Phoma* spp. isoladas.** 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A cultura de sorgo granífero apresentou significativo aumento de produtividade e área plantada no Brasil, assumindo um papel fundamental como alternativa energética na alimentação animal. Sabe-se que fatores abióticos são determinantes para ocorrência de fungos e micotoxinas nos cereais, especialmente no período de pré-colheita, quando os grãos permanecem expostos às variações destes. Neste contexto e somado a escassez de informações relacionadas aos aspectos micotoxicológicos desta cultura no Brasil, decidimos, através deste estudo: avaliar a distribuição da micobiota e a ocorrência de ácido tenuazônico em diferentes estádios de maturação de grãos de sorgo, cultivados em duas safras (verão e outono); empregar abordagem polifásica na identificação dos isolados de *Phoma* spp., bem como avaliar o potencial toxigênico destes; sequenciar o genoma de *Epicoccum sorghinum* (= *Phoma sorghina*) com a finalidade de identificar o gene responsável pela síntese de ácido tenuazônico (*TASI*); avaliar os efeitos de fatores abióticos, em condições de campo e laboratório, na ocorrência de *E. sorghinum* e ácido tenuazônico. Foi possível observar que *E. sorghinum* foi a espécie mais prevalente nas amostras de grãos de sorgo, com destaque para a maior frequência nas amostras oriundas da safra outono. O ácido tenuazônico foi detectado na totalidade das amostras avaliadas, com maiores níveis nos grãos cultivados na safra verão (média = 587,8 µg/kg). Através do estudo polifásico, foi possível verificar considerável heterogeneidade morfológica e variabilidade genética nas cepas de *E. sorghinum*, apresentando-se como complexo de espécies filogenéticas. O sequenciamento completo do genoma foi realizado com êxito e a presença do gene *TASI* foi confirmada. Avaliando os fatores abióticos ocorridos no campo, bem como acessando a ecofisiologia de *E. sorghinum*, foi possível verificar que condições quentes e úmidas (26 °C; > 0,95 Aa) são favoráveis ao desenvolvimento da espécie e a produção da toxina. Os dados gerados através deste estudo alertam para presença de compostos tóxicos em grãos de sorgo cultivados no país, bem como contribuem com informações aplicáveis para o manejo desta cultura.

**Palavras-chave:** Micotoxinas. Sorgo granífero. *Phoma*. *Epicoccum sorghinum*. Ácido tenuazônico. Abordagem polifásica.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, R. C. **Distribution of fungi and tenuazonic acid in sorghum grains cultivated in different growing seasons and polyphasic study of *Phoma* spp. isolates.** 2017. 106 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In the last two decades, Brazilian sorghum has a significant increase of productivity and area, especially because it can be used as an alternative energy source in the animal feed industry. It is known that abiotic factors are determinant for the occurrence of fungi and mycotoxins in cereals, especially in the pre-harvest period, when the grains are exposed to different weather conditions. In this context, and in addition to the scarcity of information related to the mycotoxicological aspects of sorghum crop in Brazil, the aim of this study was: evaluate the mycobiota and the occurrence of tenuazonic acid in different sorghum grain maturity stages cultivated in summer and autumn season; use a polyphasic approach in the identification of *Phoma* spp. isolates, as well as to assess the toxigenic potential of them; sequencing the genome of *Epicoccum sorghinum* (= *Phoma sorghina*) with the purpose of identifying the gene responsible for the tenuazonic acid production (*TASI*); evaluate the effects of abiotic factors under field and laboratory conditions on the occurrence of *E. sorghinum* and tenuazonic acid. *E. sorghinum* was the most prevalent species in sorghum grain samples, with the highest frequency in the samples from the autumn crop. Tenuazonic acid was detected in all the samples, with higher levels in the grain grown in the summer season (mean = 587.8 µg/kg). Through the polyphasic study, it was possible to verify considerable genetic variability in the strains of *E. sorghinum*, presenting as a complex of phylogenetic species. The whole genome sequencing was successfully completed and the *TASI* gene was identified. Evaluating the abiotic factors occurring in the field, as well as accessing the ecophysiology of *E. sorghinum*, it was possible to verify that hot and humid conditions (26 °C, >0.95 Aa) were favorable for the development of the species and the production of the toxin. The data generated by this study alert to the presence of toxic compounds in sorghum grains cultivated in Brazil, as well as contributing with crop management informations.

**Keywords:** Mycotoxins. Sorghum grain. *Phoma*. *Epicoccum sorghinum*. Tenuazonic acid. Polyphasic approach.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa representativo da produção e distribuição de sorgo granífero no Brasil.....	25
<b>Figura 2</b> - Localização da área experimental instalada no município de Votuporanga, estado de São Paulo.....	33
<b>Figura 3</b> - Área experimental destinada à semeadura de sorgo granífero. A) desenvolvimento da cultura durante a safra de verão. B) desenvolvimento da cultura durante a safra de outono.....	36
<b>Figura 4</b> - Panículas de sorgo contendo grãos em diferentes estádios de maturação (A) grão leitoso;(B) grão pastoso; (C) grão farináceo I e (D) grão farináceo II.....	37
<b>Figura 5</b> - Técnica de semeadura direta utilizada para o isolamento da micobiota associada às amostras de grãos de sorgo.....	38
<b>Figura 6</b> - Árvore mais parcimoniosa obtida a partir da análise combinada da região ITS e do gene da $\beta$ -tubulina. Sequências de <i>E. pimprinum</i> e <i>E. sorghinum</i> foram adicionadas como <i>outgroup</i> e cepa referência, respectivamente. Perfil de produção de AT ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por cepas representantes de cada grupo filogenético.....	55
<b>Figura 7</b> - Características macromorfológicas de cepas de <i>E. sorghinum</i> cultivadas em meio de cultivo MEA (A) e OA (B).....	57
<b>Figura 8</b> - Micromorfologia de cepas de <i>Epicoccum sorghinum</i> . A) Picnídios globosos e subglobosos, com superfície glabra, na coloração de marrom pálido (P40 e P33 - aumento 20 X) e melanizado (P 128 - aumento 40 X); B) Clamidósporos intercalados e terminais, uni e multicelulares, globosos e botrioide-alternarioide, marrom pálido (P 40 e P33 - aumento 40 e melanizado (P128 - aumento 40 X).....	59
<b>Figura 9</b> - Efeito da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) na produção de enzimas extracelulares e pigmentos de <i>E. sorghinum</i> . A) fosfatase alcalina; B) fosfatase ácida; C) naftol-AS-BI-fosfohidrolase; D) $\alpha$ -glucosidase; E) N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase.....	70
<b>Figura A.1</b> - Estádios de desenvolvimento do sorgo.....	87
<b>Figura A.2</b> - Crescimento da produção nacional de sorgo granífero (milhões de toneladas) entre as safras de 1976 a 2012.....	87
<b>Figura A.3</b> - Estrutura química do ácido tenuazônico.....	88
<b>Figura A.4</b> - Estrutura dos domínios que compõem o gene <i>TASI</i> .....	88
<b>Figura A.5</b> - Épocas climaticamente aptas para a semeadura de sorgo granífero no Brasil....	89
<b>Figura A.6</b> - Ficha de caracterização macromorfológica de cepas de <i>E. sorghinum</i> .....	90
<b>Figura A.7</b> - Ficha de caracterização micromorfológica de cepas de <i>E. sorghinum</i> .....	91
<b>Figura A.8</b> - Espectro (MS/MS) do padrão de ácido tenuazônico em modo de ionização electrospray negativa com suas estruturas de fragmentação.....	92
<b>Figura A.9</b> - Confirmação, através da ferramenta <i>BLAST</i> , da presença do gene <i>TASI</i> no genoma de <i>E. sorghinum</i> .....	93
<b>Figura A.10</b> - Gráfico da eficiência entre o gene alvo e controle endógeno.....	94

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro B.1</b> - Calendário de plantio e colheita de sorgo granífero nos estados brasileiros produtores.....	95
<b>Quadro B.2</b> - <i>Primers</i> do gene alvo ( <i>TASI</i> ) e do controle interno ( $\beta$ - <i>tubulina</i> ) utilizados no estudo de expressão gênica e seus respectivos valores de Tm (°C), porcentagem de GC e concentração utilizada na reação (nM).....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Porcentagem de contaminação fúngica de 200 amostras de grãos de sorgo em diferentes estádios de maturação e oriundos de duas épocas de semeadura.....	52
<b>Tabela 2</b> - Porcentagem de contaminação, valores médios e níveis de AT encontrados em 200 amostras de grãos de sorgo (100 amostras oriundas de cada safra avaliada) durante quatro estádios de maturação (GL: grão leitoso; GP: grão pastoso; GFI: grão farináceo I; GFII: grão farináceo II).....	61
<b>Tabela 3</b> - Perfis de produção de AT ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), em grãos de arroz e sorgo, por cepas de <i>E. sorghinum</i> pertencentes aos quatro grupos filogenéticos.....	62
<b>Tabela 4</b> - Média quinzenal dos dados climatológicos e média dos níveis de Aa dos grãos de sorgo em distintos estádios de maturação obtidos durante a safra verão.....	63
<b>Tabela 5</b> - Média quinzenal dos dados climatológicos e média dos níveis de Aa dos grãos de sorgo em distintos estádios de maturação obtidos durante a safra outono.....	64
<b>Tabela C.1</b> - Caracterização macromorfológica de 65 cepas de <i>Epicoccum sorghinum</i> isoladas de grãos de sorgo.....	96
<b>Tabela C.2</b> - Resultado da identificação molecular através do sequenciamento parcial da região ITS e dos genes da $\beta$ -tub e Actina de 104 cepas de <i>Phoma</i> spp.....	101

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Porcentagem de contaminação de fúngica durante o desenvolvimento de grãos de sorgo em duas épocas de semeadura (verão e outono).....	50
<b>Gráfico 2</b> - Perfil qualitativo e quantitativo de enzimas extracelulares produzidas por cepas de <i>E. sorghinum</i> . Enzimas: A) esterase (C4); B) Esterase lípase; C) Fosfatase ácida; D) naphthol-AS-BI fosfohidrolase; D) N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase.....	60
<b>Gráfico 3</b> - Frequência de <i>E. sorghinum</i> (%) durante o desenvolvimento de grãos de sorgo cultivados em duas épocas de semeadura (verão e outono).....	65
<b>Gráfico 4</b> - Ocorrência de AT ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) durante o desenvolvimento de grãos de sorgo cultivados em duas épocas de semeadura (verão e outono).....	65
<b>Gráfico 5</b> - Efeito da atividade de água (Aa) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) na taxa de crescimento radial (mm/dia) de <i>E. sorghinum</i> .....	67
<b>Gráfico 6</b> - Efeito da atividade de água (Aa) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) na expressão relativa do gene <i>TSA1</i> em <i>E. sorghinum</i> .....	68



## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

‰: por cento

°C: graus Celsius

<: menor

>: maior

®: marca registrada

µg/Kg: micrograma por quilograma

µL/L: microlitro por litro

Aa: atividade de água

AA: Ágar aveia

AT: Ácido tenuazônico

CBS: *Fungal Biodiversity Centre*

DL50: Dose letal mediana

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

MEA: Ágar extrato de malte

pb: pares de bases

PDA: Ágar batata dextrose

t: tonelada

*TAS1: Tenuazonic acid synthetase 1*

UV: ultravioleta

v/v: volume para volume

YES: Extrato de Levedura – Sacarose

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Sorgo</b>	<b>21</b>
<i>2.1.1</i>	<i>Nomenclatura e perspectiva histórica</i>	<i>21</i>
<i>2.1.2</i>	<i>Características gerais da cultura</i>	<i>22</i>
<i>2.1.3</i>	<i>Produção e utilização da cultura</i>	<i>23</i>
<b>2.2</b>	<b>Fungos e micotoxinas</b>	<b>25</b>
<i>2.2.1</i>	<i>Generalidades do gênero <i>Phoma</i></i>	<i>28</i>
<i>2.2.2</i>	<i><i>Epicoccum sorghinum</i></i>	<i>29</i>
<i>2.2.3</i>	<i>Ácido tenuazônico</i>	<i>30</i>
<b>2.3</b>	<b>Influência de fatores ambientais na ocorrência de fungos e micotoxinas</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Implantação do experimento e amostragem</b>	<b>35</b>
<i>4.1.1</i>	<i>Área experimental</i>	<i>35</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Semeadura</i>	<i>35</i>
<i>4.1.3</i>	<i>Amostragens</i>	<i>36</i>
<b>4.2</b>	<b>Dados Climatológicos</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Isolamento, contagem e identificação da micobiota</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Estudo polifásico de cepas <i>Epicoccum sorghinum</i></b>	<b>38</b>
<i>4.4.1</i>	<i>Caracterização morfológica</i>	<i>39</i>
<i>4.4.2</i>	<i>Caracterização molecular</i>	<i>39</i>
<i>4.4.3</i>	<i>Caracterização enzimática</i>	<i>41</i>
<b>4.5</b>	<b>Determinação de ácido tenuazônico (AT)</b>	<b>42</b>
<i>4.5.1</i>	<i>Preparação da solução padrão AT</i>	<i>42</i>
<i>4.5.2</i>	<i>Avaliação da metodologia analítica</i>	<i>42</i>
<i>4.5.3</i>	<i>Extração de AT das amostras</i>	<i>43</i>
<i>4.5.4</i>	<i>Detecção de AT em aparato LC/MS-MS</i>	<i>43</i>
<i>4.5.5</i>	<i>Habilidade toxigênica de cepas de <i>E. sorghinum</i></i>	<i>44</i>
<b>4.6</b>	<b>Sequenciamento do genoma de <i>E. sorghinum</i></b>	<b>44</b>
<i>4.6.1</i>	<i>Material biológico</i>	<i>44</i>

4.6.2 Extração de DNA e sequenciamento do genoma.....	45
4.6.3 Montagem do genoma .....	45
4.7 Estudo ecofisiológico de <i>E. sorghinum</i> .....	45
4.7.1 Meio de cultura e condições de cultivo .....	45
4.7.2 Crescimento micelial .....	46
4.7.3 Análise da expressão do gene <i>TSA1</i> .....	46
4.7.4 Produção de enzimas extracelulares .....	47
4.8 Análise Estatística.....	48
4.9 Delineamento experimental.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Micobiota.....	50
5.2 Estudo Polifásico das cepas de <i>E. sorghinum</i> .....	53
5.2.1 Caracterização molecular .....	53
5.2.2 Análise filogenética .....	53
5.2.3 Caracterização morfológica .....	56
5.2.4 Caracterização enzimática .....	59
5.3 Determinação de AT .....	60
5.3.1 Avaliação da metodologia analítica.....	60
5.3.2 Determinação de AT em 200 amostras de grãos de sorgo .....	60
5.3.3 Habilidade toxigênica de cepas de <i>E. sorghinum</i> .....	62
5.4 Influência das épocas de semeadura na ocorrência de <i>E. sorghinum</i> e AT .....	63
5.4.1 Avaliação dos dados climatológicos e Aa dos grãos .....	63
5.4.2 Avaliação da ocorrência de <i>E. sorghinum</i> e AT.....	64
5.5 Sequenciamento e montagem do genoma de <i>E. sorghinum</i> .....	66
5.6 Estudo ecofisiológico de <i>E. sorghinum</i> .....	67
5.6.1 Crescimento micelial .....	67
5.6.2 Expressão do gene <i>TAS1</i> .....	68
5.6.3 Produção de enzimas extracelulares .....	69
6 DISCUSSÃO .....	71
7 CONCLUSÕES .....	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A - FIGURAS.....	87
ANEXO B - QUADROS .....	95

<b>ANEXO C - TABELAS .....</b>	<b>96</b>
--------------------------------	-----------

## 1 INTRODUÇÃO

A produção nacional de sorgo granífero cresceu substancialmente nas últimas décadas, impulsionada, principalmente, pelo aumento na demanda por matérias-primas energéticas destinadas a produção de rações. Durante o desenvolvimento deste cereal no campo, os grãos, formados em uma estrutura denominada de panícula, permanecem expostos a diversos fatores bióticos e abióticos que podem interferir negativamente na obtenção de grãos com boa condição de consumo e mercado.

Dentre estes fatores, podemos destacar a importância dos fungos toxigênicos, que em condições favoráveis, podem produzir compostos tóxicos. Estes compostos são denominados de micotoxinas e, quando ingeridos com os alimentos, são capazes de causar alterações biológicas prejudiciais tanto no homem quanto nos animais (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A síntese destas micotoxinas, bem como a incidência de espécies fúngicas produtoras, sofre influência direta de fatores climatológicos, tais como temperatura e precipitação. Identificar as condições ambientais favoráveis à produção destes compostos no campo, bem como acessar os aspectos ecofisiológicos de espécies fúngicas toxigênicas são ferramentas essenciais na composição de uma estratégia eficaz no controle de micotoxinas.

Entre os escassos relatos micotoxicológicos referentes à cultura do sorgo no país, o gênero *Phoma* é observado como sendo um constituinte majoritário associado à micobiota destes grãos. Em contrapartida, pouco se conhece sobre a biologia deste gênero, principalmente no que tange os aspectos taxonômicos e toxicológicos das espécies presentes nos cereais cultivados no Brasil.

Frente a esta realidade, nosso trabalho teve como principal objetivo acessar a realidade micotoxicológica da cultura de sorgo granífero no período de pré-colheita, avaliando a influência de fatores abióticos na ocorrência de *E. sorghinum* (= *Phoma sorghina*) e ácido tenuazônico (AT). Além disso, buscamos compreender de maneira robusta as características fenotípicas, genéticas e metabólicas das cepas de *E. sorghinum* isoladas dos grãos de sorgo, gerando informações que contribuam para a obtenção de grãos com qualidade, possíveis indicações no manejo dessa cultura e na diminuição das contaminações por micotoxinas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Sorgo

#### 2.1.1 Nomenclatura e perspectiva histórica

O primeiro relato referente à classificação do sorgo foi realizado por Linneus no ano de 1753, o qual classificou a planta como pertencente ao gênero *Holcus* e sugeriu a presença de três espécies: *Holcus sorghum*, *H. saccharatus* e *H. bicolor*. Diversas classificações foram realizadas no decorrer do tempo e, atualmente o gênero *Sorghum* abrange 25 espécies agrupadas em 5 subgêneros: *Eu-sorghum*, *Chaetosorghum*, *Heterosorghum*, *Parasorghum* e *Stiposorghum* (GARBER, 1950).

Dentre estes subgêneros, *Eu-sorghum* apresenta 4 espécies (*S. bicolor*, *S. propinquum*, *S. halepense* e *S. alnum*), sendo que *Sorghum bicolor* (L.) Moench destaca-se como principal espécie cultivada em todo o mundo (DE WET, 1978). Baseado em características morfológicas das inflorescências, a espécie *S. bicolor* é classificada em 5 raças: *bicolor*, *guinea*, *caudatum*, *durra* e *kafir* (HARLAN; DE WET, 1972). Com exceção de *bicolor*, o cultivo destas raças é praticamente restrito ao continente Africano.

No que se refere à história da domesticação do sorgo, duas vertentes se destacam no objetivo de elucidar o fato. De acordo com Murdock (1959), grupos da etnia Mandé, localizados próximo ao rio Nilo, foram os primeiros a domesticarem o cereal. Entretanto, achados arqueológicos datados cerca de 5000 anos atrás, evidenciam que a domesticação do sorgo ocorreu na região nordeste da África, a qual dispunha de grande variabilidade de plantas de sorgo selvagens (DOGGETT, 1965).

Após sua domesticação e estabelecimento no continente Africano, a cultura do sorgo foi disseminada para outras partes do mundo. Acredita-se que, as rotas comerciais terrestres e marítimas da antiguidade foram as responsáveis pela inserção do cereal no Oriente. Já a introdução na Europa deu-se através da Itália, provavelmente com sementes trazidas da Índia por volta de 70 anos DC (KONZEN; ALVARENGA, 2008).

A introdução do sorgo no continente americano é considerada um evento recente comparado à expansão do cereal na região Oriental. As primeiras introduções ocorreram no Caribe, trazidos por escravos africanos, e desta região o sorgo atingiu o Sudoeste dos Estados Unidos por volta do ano de 1857 (KONZEN; ALVARENGA, 2008). No Brasil, a introdução das primeiras sementes de sorgo ocorreu pelo Nordeste, região que vivenciou intenso tráfico

de escravos trazidos para trabalhar na atividade açucareira. Por este fato, a cultura é popularmente conhecida nessa região como milho d'Angola (LIRA, 1981).

Entretanto, o estabelecimento da cultura do sorgo no Brasil só ocorreu a partir de 1970, impulsionado pela participação do setor privado no agronegócio. Neste período, híbridos recém lançados na Argentina foram trazidos e cultivados em regiões do Estado do Rio Grande do Sul, o qual, naquele momento, se tornou o maior estado produtor de sorgo no país. Com o advento de híbridos lançados no exterior, a cultura apresentou significativa expansão nos estados centrais, onde, atualmente, é considerada a área produtora mais importante do país. (KONZEN; ALVARENGA, 2008).

Após a expansão inicial observada a partir de 1970, o sorgo alternou crescimento e declínio de produção e extensão da área plantada nas décadas seguintes. Segundo Olivetti e Camargo (1997), vários fatores contribuíram para estagnação da produção do cereal no país, destacando-se: baixo grau de conhecimento e informação por parte da área técnica; baixa utilização de insumos e outros investimentos na lavoura; falta de tratamento adequado à cultura por parte do produtor; dificuldade de transferência de conhecimento e das informações disponíveis, além de instabilidade na comercialização e na política de preços. Entretanto, nas duas últimas décadas, a cultura de sorgo parece ter encontrado seu papel no mercado agrícola e consolidou-se como alternativa ao milho no sistema de sucessão de culturas. Este estabelecimento só foi possível através da aplicação de políticas públicas governamentais, embasadas, principalmente, pelos programas de pesquisas desenvolvidos no país (LIRA, 1981).

### ***2.1.2 Características gerais da cultura***

O sorgo é uma gramínea de mecanismo fotossintético C4, de dias curtos, sendo, dentre os cereais cultivados, considerado uns dos mais versáteis do ponto de vista fotossintético, e apresentando como principal característica agrônômica, tolerância às altas temperaturas e ao estresse por deficiência hídrica (BERENGUER; FACI, 2001). A planta apresenta boa capacidade de adaptação em quase todos os tipos de solos, podendo proporcionar até duas safras por ano (OLIVETTI; CAMARGO, 1997).

De forma geral, o ciclo da cultura compreende as seguintes etapas de desenvolvimento: a) ED1 - Fase inicial de crescimento, período entre a semeadura até o aparecimento da panícula; b) ED2 - Período que compreende a iniciação da panícula até o florescimento; c)

ED3 - Período entre a floração e a maturação fisiológica dos grãos (MAGALHAES; DURAES; SCHAFFERT, 2000). Estas etapas estão visualmente demonstradas na Figura A.1.

Agromonomicamente, o sorgo é classificado em quatro grupos: sorgo granífero, forrageiro, vassoura e sacarino. (OLIVETTI; CAMARGO, 1997). O sorgo granífero apresenta a maior expressão econômica e é utilizado na alimentação humana e animal. O sorgo forrageiro caracteriza-se por apresentar plantas de porte alto apropriadas para confecção de silagem e pastejo. Já o sorgo vassoura, como o próprio nome já diz, produz panículas que são utilizadas na confecção de vassouras. O sorgo sacarino apresenta grande concentração de açúcares no colmo da planta, o que o torna uma excelente fonte de matéria prima na produção de etanol, xaropes e açúcar.

A cultura de sorgo granífero apresenta constante crescimento de produção e área plantada em todo mundo. Uma das grandes vantagens desta cultura é sua capacidade de se adaptar à seca e às altas temperaturas, podendo ser cultivada em regiões que apresentam condições de clima adverso, especialmente, com pouca precipitação. De acordo com Konzen e Alvarenga (2008), o sorgo apresenta dois mecanismos relacionados à seca que explicam seu sucesso: o escape e tolerância. O escape, pois o sorgo possui um sistema radicular profundo e ramificado o qual é eficiente na extração de água do solo. Já a tolerância está relacionada à capacidade extraordinária de recuperação da planta quando o estresse hídrico (murcha) é interrompido.

### ***2.1.3 Produção e utilização da cultura***

O sorgo é o quinto cereal de maior importância no mundo, precedido pelo trigo, arroz, milho e cevada (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017). É utilizado como principal fonte de alimento em grande parte dos países da África, Ásia e América Central, além de ser um importante componente da alimentação animal nos Estados Unidos, Austrália e América do Sul (BORÉM, 2005).

Por apresentar características versáteis, a utilização do sorgo é multivariada, desde a alimentação humana e animal, a qual merece destaque, até a produção de diversos subprodutos, tais como: xaropes, açúcar, álcool e biocombustível (OLIVETTI; CAMARGO, 1997). De acordo com CODEX (2012), 41,7% da produção mundial de sorgo granífero é destinada a alimentação humana e 43,9% utilizada na alimentação animal. Em países do Continente Africano e Asiático, o consumo de grãos de sorgo pode representar até 70% da



ingestão calórica diária, o que o torna um grão de fundamental importância na segurança alimentar. (DICKO et al., 2006). A produção nacional da cultura é destinada exclusivamente à alimentação animal, participando como alternativa energética na composição de rações balanceadas que atendem a expansão da produção de leite, confinamento de bovinos e suínos e avicultura no país (TSUNECHIRO; MARIANO; MARTINS, 2010).

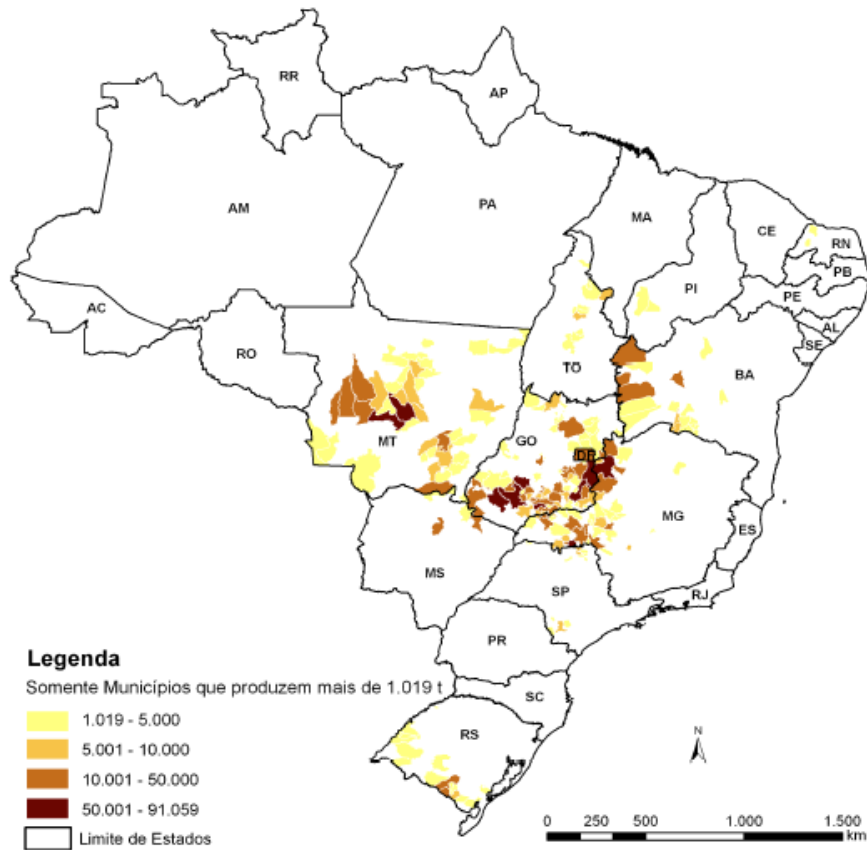
Aproximadamente 60,6% da área mundial de cultivo de sorgo está localizada no Continente Africano, enquanto 22,2% está ocupada por países asiáticos e 14,9% por países do Continente Americano (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2012). Entretanto, em relação à produtividade deste cereal, os países líderes de produção são: Estados Unidos ( $10,99 \times 10^6$  t), Nigéria ( $6,70 \times 10^6$  t), Sudão ( $6,28 \times 10^6$  t), México ( $6,27 \times 10^6$  t) e Índia ( $5,45 \times 10^6$  t). A baixa produtividade deste cereal em países em desenvolvimento se deve, principalmente, ao cultivo deste cereal em áreas marginais, baixo uso de fertilizantes e agrotóxicos, falta de políticas governamentais e condições climáticas adversas (CODEX, 2012).

Em relação ao histórico de produção mundial do sorgo, dados obtidos pelo USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2017) indicam que nas últimas 4 décadas a produção mundial de sorgo cresceu vertiginosamente, apresentando aumento de aproximadamente 40% até os dias atuais. O último levantamento realizado pela FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017) indica que a produção mundial deste cereal atingiu o valor de  $65,42 \times 10^6$  t na safra de 2014/2015.

No Brasil, a produção de sorgo granífero acompanhou a tendência mundial e cresceu substancialmente nas últimas décadas, ocupando a sexta posição no *ranking* nacional de produção de grãos, e o país, a nona colocação na produção mundial (USDA, 2017; FAOSTAT, 2017), com produção de  $2,01 \times 10^6$  t na safra 2014/2015 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015). A cultura expandiu-se, principalmente, na região Centro-Oeste do país, onde grande parcela da produção nacional é proveniente do Estado de Goiás (707 mil t), Minas Gerais (506 mil toneladas) e Mato Grosso ( $3,52 \times 10^5$  t) (Figura 1).

Esta considerável expansão da cultura no país foi observada tanto em número de municípios produtores quanto em termos de área plantada, tendo passado de  $854 \text{ km}^2$  em 1975 para  $8.511,46 \text{ km}^2$  em 2014 (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2015). Neste mesmo período, também foi observado um aumento expressivo na produção deste cereal. Enquanto em 1975 a produção nacional foi de cerca 200

mil toneladas, a partir de 2010, a produção anual do país ultrapassou 2,3 milhões de toneladas (Figura A.2).



Fonte: Conab/IBGE.

**Figura 1** – Mapa representativo da produção e distribuição de sorgo granífero no Brasil referente à safra 2014/2015.

## 2.2 Fungos e micotoxinas

A ocorrência de fungos associados aos grãos é considerada a principal desordem biótica na cultura de sorgo, principalmente se condições ambientais favoráveis prevaleçam entre os estádios de floração e maturação fisiológica dos grãos (BANDYOPADHYAY; CHANDRASHEKAR; HALL, 2000). De acordo com os autores citados, o principal termo utilizado para definir esta problemática é o “emboloramento dos grãos de sorgo”, que se define como a interação de diversas espécies fúngicas com a planta, de forma parasitária ou

saprofítica, e que são responsáveis pela deteriorização dos grãos durante os períodos de pré e pós-colheita.

Estima-se que as perdas anuais decorrentes da contaminação fúngica em grãos de sorgo produzidos nos Continente Asiático e Africano ultrapassem o valor de 130 milhões de dólares (BANDYOPADHYAY et al., 2002). Além dos danos econômicos, causado pela baixa na produtividade e na perda de valor de mercado, outro fator que gera alto prejuízo a esta cultura, são os fungos toxigênicos, que em condições propícias, podem produzir compostos tóxicos.

Estes compostos são denominados de micotoxinas e são sintetizados como metabólitos secundários por diversas espécies fúngicas filamentosas, podendo estar presentes nos alimentos, tanto no campo, no armazenamento ou após o processamento (MOSS, 1989). A ingestão destes compostos, por homens ou animais, pode causar diversos efeitos biológicos, tais como: carcinogenicidade, mutagenicidade e imunotoxicidade (BHATNAGAR; YU; EHRLICH, 2002).

De acordo com Almeida et al. (2005), os fungos que invadem os grãos podem ser classificados, conforme a necessidade de água para seu desenvolvimento, em dois grupos ecológicos: fungos de campo e de armazenamento. Neste contexto, já foram relatados mais de 40 gêneros fúngicos associados aos grãos de sorgo no mundo, destacando-se como os mais frequentes no campo os fungos *Epicoccum sorghinum*, *Claviceps sorghi*, *C. africana*, *Alternaria* spp, *Curvularia lunata*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*. Por outro lado, no armazenamento, os mais representativos são: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp.. (CODEX, 2012; FORBES; BANDYOPADHYAY; GARCIA, 1992). Vale ressaltar que esta classificação é atualmente questionável, muito pelo fato de que alguns gêneros podem coexistir em ambas as etapas da cadeia produtiva, como por exemplo, os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*.

Diversos estudos relatam a ocorrência natural de fungos e micotoxinas em grãos de sorgo em diversas regiões do mundo. Baseado nestes estudos, CODEX (2012), sugeriu que devido o isolamento de diversas espécies toxigênicas neste cereal, aproximadamente 30 micotoxinas podem contaminá-lo. Neste contexto, pesquisas sobre fungos e micotoxinas, especialmente em países de clima tropical, são de extrema importância, tendo em vista seu cultivo em condições ambientais favoráveis, especialmente temperatura e umidade, além de seu emprego como fonte alimentar.

Através de investigações realizadas em países do Continente Africano, foi possível observar certa similaridade quanto aos principais gêneros fúngicos isolados, sendo eles: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Alternaria* e *Curvularia* (AHMED et al., 2008;

MAKUN et al., 2009). Na Tailândia, Pitt et al. (1993) analisando a micobiota de produtos agrícolas, constataram em amostras de grãos de sorgo alta prevalência de *A. flavus*, *A. niger*, *Eurotium chevalieri*, *C. lunata*, *Alternaria alternata*, *F. verticillioides*, *Fusarium semitectum* e *Penicillium citrinum*, em ordem de importância.

Prom et al. (2015) pesquisando a distribuição da micobiota em amostras de sorgo coletadas em diferentes regiões do estado do Texas, nos Estados Unidos, observaram alta incidência do gênero *Alternaria* (66,8% das amostras), seguido por *Bipolaris* (12,8%), *Curvularia* (6,8%) e *Fusarium* (6,8%).

Estudo desenvolvido por González, Martínez e Resnik (1997) demonstrou que os principais gêneros fúngicos associados aos grãos de sorgo produzidos na Argentina são, em ordem decrescente de frequência, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Phoma*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

No Brasil, são escassos os estudos que relatam a presença de fungos e micotoxinas na cultura do sorgo granífero, destacando-se o estudo conduzido por Silva et al. (2000) os quais avaliaram a presença de fungos e micotoxinas em amostras de grãos de sorgo recém colhidos e armazenados no estado de São Paulo. Nesta investigação, os autores verificaram a predominância dos gêneros *Phoma* (57,1 % das amostras), *Aspergillus* (42,7%), *Fusarium* (25%) e *Rhizopus* (21,4%). Aflatoxina B<sub>1</sub> foi detectada em 12% das amostras (7-33 µg/kg) e Fumonisina B<sub>1</sub> em 74,2% das mesmas (0.11–0.15 µg/g). Posteriormente, Alves dos reis et al. (2010), analisando 50 amostras de grãos de sorgo em distintos estádios de maturação, verificaram que os fungos mais prevalentes foram: *Cladosporium* spp. (61,8%), seguido de *Helminthosporium* spp. (34%), *Fusarium* spp. (25,1%), leveduras (17,5%), *Epicoccum* spp. (11%), *Mucor* spp. (6,1%), *Alternaria* spp. (4,2%) e *Aspergillus* spp. (4%). Fumonisina B<sub>1</sub> foi detectada em 38% das amostras, em níveis que variaram de 50 a 368 ng/g.

Isolados pertencentes ao gênero *Phoma* são frequentemente relatados em associação à grãos recém-colhidos e armazenados no Brasil e no exterior (BANDYOPADHYAY, et al., 2002; GONZÁLEZ; MARTÍNEZ; RESNIK, 1997; SILVA, et al., 2000). Entretanto, pouquíssima atenção é despendida para compreender a biologia deste gênero, principalmente no que tange aos aspectos taxonômicos e possível produção de micotoxinas pelo mesmo. Neste sentido, vale ressaltar que estudos apontam a produção de compostos tóxicos por algumas espécies de *Phoma*, como exemplo, o AT, produzido pela espécie *Epicoccum sorghinum*. Este composto apresenta efeitos fitotóxicos, citotóxicos e propriedades tóxicas em mamíferos (LEBRUN et al., 1988; SHEPHARD et al., 1991; STEYN; RABIE, 1976).

### 2.2.1 Generalidades do gênero *Phoma*

O gênero *Phoma* pertence à classe dos *Coelomycetes* e notoriamente é conhecido por apresentar ampla diversidade ecológica e complexa taxonomia (AVESKAMP et al., 2010; GROVE, 1935). Em geral, grande parte das espécies é relatadas como saprófitas, muitas vezes associadas a restos vegetais, fitopatogênicas, causando mancha foliar e também como endofíticas (BOEREMA et al., 2004). Além disso, aproximadamente 10 espécies são conhecidos como patógenas a humanos e animais (DE HOOG et al., 2000).

*Phoma* foi inicialmente descrito em 1821, embora oficialmente reconhecido 60 anos após pela descrição de Saccardo (SUTTON, 1980). Tal descrição definiu o gênero como um agrupamento de espécies de reprodução assexuada que apresentavam picnídio unicelular, conídios hialinos, sendo isoladas, especificamente, em caules de plantas herbáceas. Através deste sistema, os isolados eram classificados levando em consideração, além das características micromorfológicas descritas, informações referentes à planta hospedeira e o sítio de infecção. Desta maneira, diversos isolados que apresentavam características distintas, tais como: infecção foliar, conídios septados e picnídios com setas, eram classificados como pertencentes aos gêneros *Phyllosticta*, *Ascochyta* e *Pyrenochaeta* (DE GRUYTER, 2012).

Os avanços no conhecimento deste complexo gênero se deu durante as últimas 6 décadas, quando o órgão *Plant Protection Service*, sediado na Holanda, e hoje conhecido como *CBS Fungal Diversity Centre*, intensificou os estudos taxonômicos para melhor compreender o gênero. Até meados do ano 1950, aproximadamente 3000 fungos, que produziam picnídios e apresentam conídios hialinos, foram relatados como pertencentes ao gênero *Phoma*. Entretanto, a partir da introdução de estudos que consideravam aspectos morfológicos e de conidiogênese como critérios taxonômicos, houve grande avanço na delimitação de gêneros e espécies associadas ao *Phoma*.

O próximo grande passo na taxonomia do gênero foi classificá-lo em 9 seções (*Phoma*, *Heterospora*, *Paraphoma*, *Peyronellaceae*, *Phyllostictoides*, *Sclerophomella*, *Plenodomus*, *Macrospora* e *Pilosa*). Boerema et al. (2004), compilando diversos estudos realizados pelo grupo, publicaram o *Phoma Identification Manual*. Este compêndio compreende a descrição de 223 táxons específicos e intraespecíficos, baseando-se em descrições de caracteres morfológicos, tais como: tamanho e forma de picnídios, clamidósporos e conídios, descrições macromorfológicas das colônias e características fisiológicas, como Teste de NaOH, produção de pigmentos e formação de cristais (BOEREMA et al., 2004). Embora de grande importância, este estudo foi baseado, quase exclusivamente, na descrição morfológica de

espécies obtidas no continente Europeu, o que não representa a diversidade taxonômica dos isolados presentes em diversas regiões do globo, como também apresenta características ambíguas entre algumas seções propostas (DE GRUYTER et al., 2009).

Atualmente, mediante o advento das ferramentas moleculares que permitiram avanços no entendimento filogenético do gênero, alguns autores propuseram reformulações na classificação do mesmo e, cerca de 70% das espécies descritas por Boerema et al. (2004), puderam ser acomodadas na recente família proposta (*Didymellaceae*). Além disso, o estudo das relações filogenéticas destas espécies, oriundas principalmente das seções *Macrospora*, *Peyronellaea*, *Phoma*, *Phyllostictoides* e *Sclerophomella*, resultou na reclassificação das mesmas em gêneros já existentes (*Didymella* e *Stagonosporopsis*) ou a transferência para *Boeremia*, *Epicoccum* e *Peyronellaea* (AVESKAMP et al., 2010).

Sendo assim, o antigo conceito de gênero *Phoma*, ou até mesmo o mais recente “complexo *Phoma*”, sofreram profundas mudanças e devem ser analisados, do ponto de vista taxonômico, de maneira mais ampla, onde 18 gêneros pertencentes à mesma família (incluindo *Phoma* e gêneros relacionados), representam, atualmente, esta complexa diversidade de espécies.

### 2.2.2 *Epicoccum sorghinum*

A espécie *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenb, Kesteren, atualmente reclassificada como pertencente ao gênero *Epicoccum* [*Epicoccum sorghinum* (Sacc.) Aveskamp, Gruyter, Verkley], é considerada uma espécie cosmopolita com ocorrência em mais de 80 gêneros de plantas, no solo e em ambiente aquático (BOEREMA et al., 2004). Considerada uma espécie fitopatogênica facultativa, está frequentemente associada a desordens em gramíneas, especificamente em regiões tropicais (BOEREMA et al., 2004).

No que se refere à taxonomia da espécie, durante a última década apenas dois estudos auxiliaram no esclarecimento do tema. Pažoutová (2009), investigando aspectos genéticos e morfológicos de isolados de *E. sorghinum* oriundos do Texas e da África do Sul, observou discreta variabilidade intraespecífica entre os isolados, contudo, devido à limitação de informações sobre a espécie, sugeriu que a mesma pode apresentar característica ubíqua e cosmopolita ou, então, a existência de subespécies. Em 2010, Aveskamp et al. (2010), empregando abordagem polifásica em 324 cepas de *Phoma* e gêneros relacionados, propuseram a recombinação da espécie *P. sorghina* no gênero *Epicoccum*. A distinção

morfológica e o agrupamento filogenético com *Epicoccum nigrum*, justificaram a nova combinação para espécie, denominada de *Epicoccum sorghinum*.

Em um levantamento bibliográfico, é possível observar a existência de poucos relatos referente à espécie. Fato este, explicado pela dificuldade na identificação do gênero, pouco conhecimento sobre a biologia da espécie, baixa incidência em culturas de maior impacto econômico, como o milho e soja, e a seu perfil facultativo no estabelecimento de doenças.

Entre estes relatos, *E. sorghinum* foi identificada como patógeno causador de manchas foliares em *Trifolium campestre*, planta popularmente conhecida como trevo-amarelo, na região da Turquia (SERT; SUMBUL, 2005). A planta daninha, conhecida pelo nome comum de uva-de-rato (*Phytolacca americana*), também foi reportada apresentando lesões foliares decorrentes da infecção de *E. sorghinum* e metabólitos tóxicos produzidos pela espécie (VENKATASUBBAIAH; DYKE; CHILTON, 1992). No Brasil, esta espécie é responsável pela ocorrência da queima-das-glumelas do arroz (*Oryza sativa* L.), doença que ataca os grãos, causando manchas de coloração marrom-avermelhada (SILVA-LOBO et al., 2011).

Dentre as desordens fitopatológicas associadas à espécie, a sua ocorrência em grãos de sorgo apresenta-se como a de maior importância, tendo em vista o aumento na produção da cultura no mundo, como também a possível contaminação dos grãos por micotoxinas.

O primeiro relato que despertou atenção da comunidade científica para ocorrência de *E. sorghinum* em grãos de sorgo foi descrito por Steyn e Rabie (1976), os quais associaram a ocorrência da desordem hemorrágica em humanos após o consumo de sorgo contaminado com fungo. Neste estudo, diversos efeitos tóxicos foram observados em animais tratados com grãos contaminados com *E. sorghinum*, tais como: hemorragia, perda de peso e morte. Em 1991, estudo realizado por Shephard et al. (1991) confirmou a produção de AT (ácido tenuazônico) por *E. sorghinum*. Através desta investigação os autores relataram que a espécie produziu maiores níveis de AT (810 µg/g) quando comparados com aqueles produzidos por *Alternaria alternata* (360 µg/g). Embora o potencial toxigênico de *E. sorghinum* tenha sido relatado, as principais espécies associadas à produção de AT em alimentos ainda pertencem ao gênero *Alternaria*.

### 2.2.3 Ácido tenuazônico

O AT é uma micotoxina derivada do ácido tetrâmico produzida por espécies do gênero *Alternaria* e pelas espécies *Magnaporthe oryzae* e *Epicoccum sorghinum* (MERONUCK et al., 1972; ROSETT et al., 1957; STEYN; RABIE, 1976). Rosset et al. (1957), foram os

primeiros investigadores a identificar a presença de AT em filtrados de *Alternaria tenuis* que, posteriormente, teve sua estrutura química elucidada por Stickings (1959) (Figura A.3).

Conhecida como a micotoxina mais tóxica dentre as produzidas pelo gênero *Alternaria*, a toxicidade do AT está relacionada com a inibição da síntese proteica em nível ribossomal, apresentando diversas atividades biológicas, incluindo efeitos citotóxicos, fitotóxicos, bactericidas e viricida (CARRASCO; VAZQUEZ, 1973; LEBRUN et al., 1988; SHIGEURA; GORDON, 1963).

Diversos estudos têm sido conduzidos com o intuito de elucidar aspectos relacionados à toxicidade e ao risco da exposição a esta micotoxina. Ratos tratados diariamente com AT (25 mg/kg – dose diária) durante 10 meses, desenvolveram displasia, em níveis moderados à severos, na mucosa do esôfago (YEKELER et al., 2001). Giambrone, Davis e Diener (1978) confirmaram os efeitos tóxicos da ingestão de AT por galinhas, através das observações de perda de peso e hemorragia na musculatura cardíaca e esquelética. De acordo com Bottalico e Logrieco (1998) já foram sugeridas DL<sub>50</sub> de AT para diversos animais, tais como: pintos (37,5 mg/kg de p.c.), cachorros (2,5 a 10 mg/kg) e ratos (168 mg/kg).

Nos últimos anos, com o aumento de relatos sobre a ocorrência de toxinas produzidas por *Alternaria* em alimentos, pareceres foram emitidos pelo CODEX (2012) e EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2011), os quais apontam a escassez de dados e a necessidade de estudos adicionais sobre a ocorrência e toxicidade de AT. Dentre as recomendações finais, sugere-se maior atenção à ocorrência natural de *E. sorghinum* em grãos de sorgo, tendo em vista seu frequente isolamento neste grão e sua associação com a síndrome hemorrágica, denominada de “Onyalai”.

No que se refere aos aspectos genéticos relacionados à biossíntese de AT, recentemente, em um estudo publicado por Yun et al. (2015), foi identificado, no genoma do fungo *Magnaporthe oryzae*, o gene responsável pela síntese desta toxina. Ao determinar as condições que induziam e inibiam a síntese deste composto, os autores identificaram o papel crucial da enzima *TeA sintase 1*, a qual utiliza-se de moléculas de isoleucina e acetoacetil-CoA para síntese de AT. A Figura A.4 demonstra a estrutura dos domínios presentes no gene *TAS1* (NRPS-PKS), o qual, segundo o autor, é um tipo de estrutura única para uma enzima de origem fúngica.



### 2.3 Influência de fatores ambientais na ocorrência de fungos e micotoxinas

Durante as últimas três décadas, diversos estudos têm demonstrado o impacto que os parâmetros abióticos, com destaque a temperatura e atividade de água (Aa), exercem sobre a fisiologia de fungos, especificamente, na germinação, no crescimento micelial e na produção de toxinas (MAGAN; MEDINA, 2016).

Dentre as centenas de espécies toxigênicas relatadas na literatura, as investigações sobre a influência destes efeitos na fisiologia de fungos aprofundaram-se em quatro principais gêneros, sendo eles: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Penicillium*. Como resultado, hoje, as condições ambientais consideradas ótimas para crescimento e produção das principais micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas e tricotecenos) são facilmente encontradas na literatura (MAGAN; MEDINA, 2016). Paralelamente a estes fatos, a descoberta e o emprego da técnica de sequenciamento de nova geração possibilitou a montagem de genomas completos de fungos toxigênicos, os quais, permitiram que *clusters* de genes relacionados à biossíntese de micotoxinas fossem descobertos e estudados de maneira minuciosa.

Apesar dos avanços obtidos, muitas espécies fúngicas carecem de estudos que investiguem os aspectos ecofisiológicos associados à produção de micotoxinas. Dentre eles, podemos destacar o gênero *Phoma*, embora com elevada frequência de isolamento em alimentos, pouco se conhece sobre sua biologia e sua interação com o ambiente.

Durante o período de pré-colheita, a ocorrência de micotoxinas nos grãos está diretamente relacionada às condições ambientais ocorridas, principalmente, entre período de floração e maturação fisiológica dos grãos. Sendo assim, avaliar a dinâmica de fatores ambientais, com destaque a temperatura, precipitação e umidade relativa do ar, em diferentes épocas de semeadura, pode conduzir a uma melhora expressiva em aspectos produtivos, como também na qualidade destes grãos.

Anahosur e Patil (1982), avaliando os efeitos de épocas de semeadura sobre a incidência de ergot (*Claviceps africana*) em grãos de sorgo produzidos na Índia, observaram que o plantio da cultura no mês de Agosto propiciou a ocorrência da doença, quando comparado ao mês de Julho. Posteriormente, Marley et al. (2005), realizando estudos na Nigéria, confirmaram a influência de épocas de semeadura na ocorrência de antracnose (*Colletotrichum graminicola*) em folhas e panículas de sorgo. Os autores observaram correlação positiva entre a alta umidade do ar ocorrida no mês de Julho com o aumento da severidade da doença. Montes-Belmont, Méndez-Ramírez e Flores-Moctezuma (2002),

investigando a relação entre a ocorrência de ergot, épocas de semeadura e variáveis climáticas entre os anos de 1998 e 2000, registraram elevada incidência e severidade da doença no plantio de sorgo no mês de Junho do ano de 2000. Neste período, constataram que temperaturas abaixo de 15 °C durante 3 semanas antes da floração aumentavam a incidência da patologia. Além disso, observaram que a temperatura média de 25 °C e a umidade relativa do ar de 96% eram os fatores climatológicos determinantes para o desenvolvimento da doença.

Neste contexto, a Embrapa, avaliou a expansão potencial da produção de sorgo granífero no Brasil e apontou, através de um mapeamento (Figura A.5), as épocas do ano com aptidão climática para plantio da cultura (EMBRAPA, 2015). De acordo com este estudo, levando em consideração os aspectos edafoclimatológicos de cada região, o período recomendado para a semeadura de sorgo granífero no país inicia-se no mês de setembro e se prolonga até o mês de junho. Embora exista um grande potencial para expansão da cultura do ponto de vista edafoclimático, é de grande importância avaliar a influência destes parâmetros na qualidade fitossanitária destes grãos, principalmente, na elucidação dos fatores de riscos que propiciem a formação de micotoxinas.

### 3 PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS

A crescente produção de sorgo granífero, embasada principalmente por sua utilização como matriz energética na composição de rações, tem contribuído para o estabelecimento da cultura no cenário nacional de produção de grãos. Sabe-se que fatores físicos, climatológicos e biológicos limitam a capacidade agrícola de diversas culturas, principalmente, quando possibilitam o desenvolvimento de fungos toxigênicos e a consequente produção de micotoxinas.

A contaminação dos grãos de sorgo por *Phoma* spp. tem sido observada em elevada frequência no país. No entanto, devido a escassez de estudos que investiguem esta interação, insipientes são as informações relacionadas à biologia deste fungo, especificamente no que tange ao aspecto taxonômico, como também, à sua habilidade de produção de metabólitos tóxicos.

Com base nas considerações apresentadas, o presente estudo teve como objetivos:

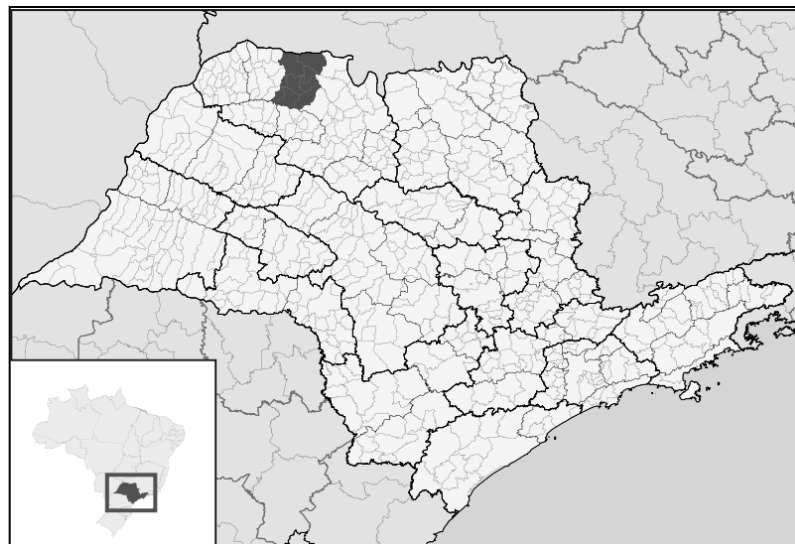
1. Identificar a micobiota e pesquisar a presença de ácido tenuazônico em diferentes estádios de maturação de grãos de sorgo cultivados em duas safras (verão e outono);
2. Verificar a habilidade toxigênica de cepas de *E. sorghinum* isoladas das amostras de grãos de sorgo;
3. Realizar estudo polifásico dos isolados de *Phoma* spp. abrangendo aspectos morfológicos, sequenciamento multilocus da região ITS do rDNA e fragmentos dos genes da  $\beta$ -tubulina e actina e a produção de enzimas extracelulares;
4. Realizar o sequenciamento completo do genoma de *E. sorghinum* e pesquisar a presença do gene *TASI* no mesmo.
5. Avaliar a resposta ecofisiológica (taxa de crescimento micelial, produção enzimática e expressão do gene *TSAI* de *E. sorghinum*) frente a diferentes condições de temperaturas (°C) e níveis de atividade de água (Aa).
6. Comparar os resultados obtidos com os dados de fatores climatológicos (umidade relativa do ar (%), índice pluviométrico (mm) e temperatura (°C) coletados durante as duas épocas de semeadura.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Implantação do experimento e amostragem

#### 4.1.1 Área experimental

O campo experimental foi instalado no município de Votuporanga/SP em uma área pertencente à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), nas coordenadas 20° 28' de latitude e 50° 04' de longitude (Figura 2). A área apresenta relevo suave e altitude de 410 a 490 m (PRADO; JORGE; MENK, 1999). Segundo a classificação de Koppen, o clima é considerado tropical com verão chuvoso e inverno seco. O déficit hídrico é mais acentuado nos meses de junho a setembro.



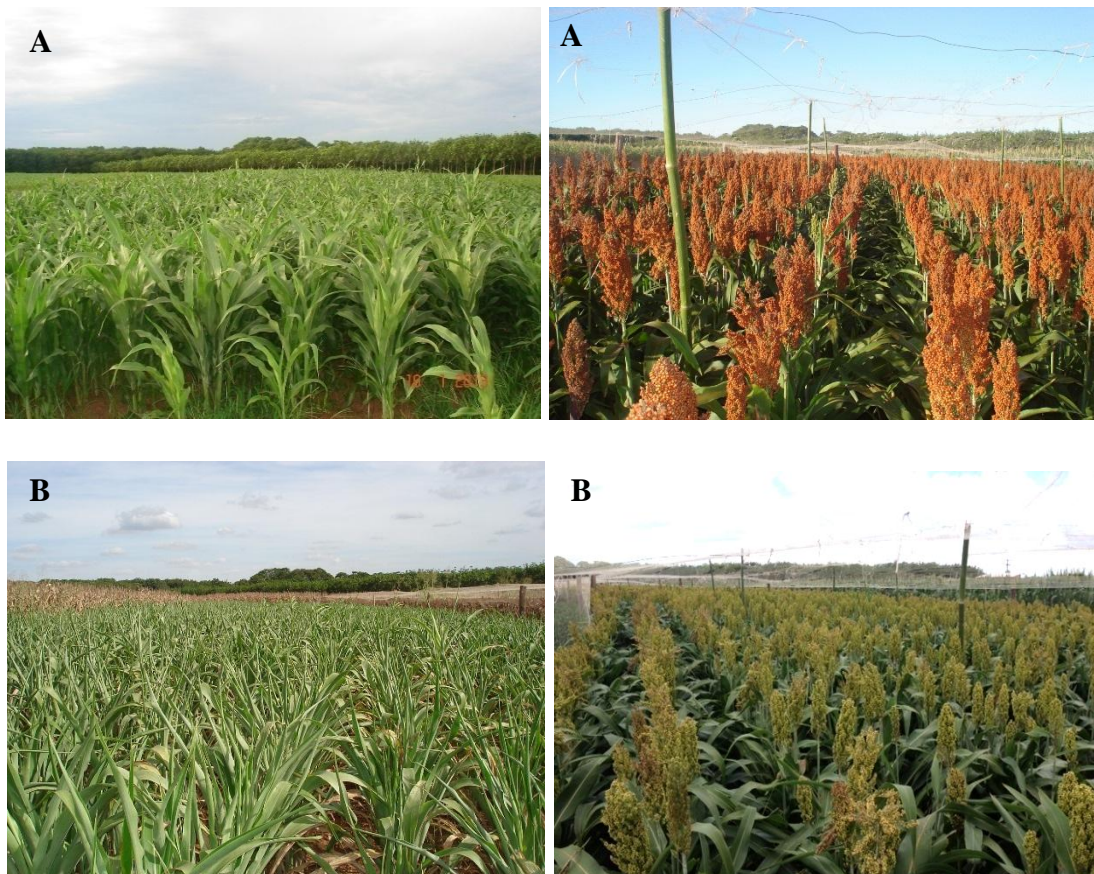
**Figura 2** - Localização da área experimental instalada no município de Votuporanga, estado de São Paulo.

A área experimental, destinada às duas épocas de semeadura, foi dividida em cinco partes contendo 20 linhas de sorgo, espaçadas de 0,5 m com 15 m de comprimento. A área útil da parcela foi delimitada nas 14 linhas centrais com 11 metros de comprimento e 7 metros de largura, totalizando 77 m<sup>2</sup>. Foram descontados dois metros das extremidades a fim de eliminar o efeito de bordadura.

#### 4.1.2 Semeadura

- a) **Época:** considerando a realidade de plantio do sorgo no Brasil, foram realizadas duas épocas de semeadura, sendo a primeira destinada a safra verão (novembro - 2012) e a segunda a safra outono (fevereiro - 2013) (Figura 3).

- b) **Adubação:** a adubação de semeadura foi estabelecida de acordo com análise de solo e necessidade da cultura. Também foi realizada adubação nitrogenada complementar em cobertura e adubação potássica.
- c) **Cultivar:** híbrido DKB 550, livre de tanino.
- d) **Tratamento de sementes:** Imidacloprido (190 g) + Tiodicarbe (560 g) para cada 100 kg de sementes com objetivo de evitar danos por *Spodopterafrugiperda* (lagarta-militar) e *Elasmopalpus lignosellus* (Lagarta-elasmo).
- e) **Espaçamento e densidade de plantio:** As linhas foram espaçadas em 0,5 m e foi utilizada densidade de semeadura para se obter 180 a 200 mil plantas ha<sup>-1</sup>.



**Figura 3** – Área experimental destinada à semeadura de sorgo granífero. A) desenvolvimento da cultura durante a safra de verão. B) desenvolvimento da cultura durante a safra de outono.

#### 4.1.3 Amostragens

Além de avaliar as possíveis interferências decorrentes das épocas de semeadura (verão e outono), as amostragens foram realizadas em quatro estádios de maturação dos grãos, assim distribuídas: primeira coleta (15 dias após a floração – estágio de grão leitoso); segunda

coleta (30 dias após a floração – estágio de grão pastoso); terceira coleta (45 dias após a floração – estágio de grão farináceo I) e quarta coleta (60 dias após a floração – estágio de grão farináceo II) (Figura 4). A data de florescimento foi estipulada quando 50% das plantas apresentaram as flores da panícula liberando pólen.

No total, foram obtidas 200 amostras de grãos de sorgo, 100 referentes à safra verão e 100 referentes à safra outono. Este total é o somatório de 25 amostras obtidas nos 4 estádios de maturação dos grãos. Para que a amostragem fosse representativa, a área experimental foi dividida em 5 parcelas. De cada parcela foi coletada 1 panícula, totalizando 5 panículas por amostra.



**Figura 4** - Panículas de sorgo contendo grãos em diferentes estádios de maturação (A) grão leitoso; (B) grão pastoso; (C) grão farináceo I e (D) grão farináceo II.

#### **4.2 Dados Climatológicos e determinação de atividade de água (Aa)**

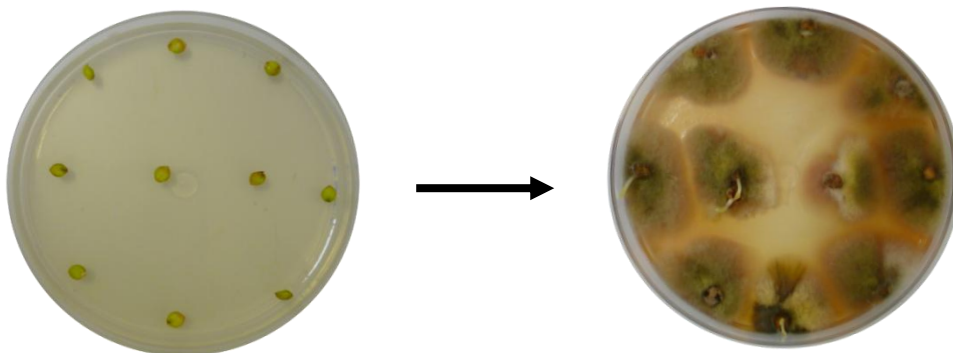
A estação meteorológica do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizada à aproximadamente 300 metros de distância da área experimental, foi utilizada para as coletas diárias dos dados de pluviosidade (mm), umidade relativa do ar (%) e temperaturas mínima e máxima (°C). A determinação dos níveis de Aa das amostras de grãos de sorgo foi realizada por meio do aparelho AQUALAB CX-2 (Decagon Devices Inc.).

#### **4.3 Isolamento, contagem e identificação da micobiota**

A técnica adotada para o isolamento da micobiota foi descrita por Berjark (1984) modificada, e denomina-se “semeadura direta” (Figura 5). Esta técnica consiste, inicialmente, na desinfecção superficial dos grãos em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 2 minutos e,

após, a lavagem por 3 vezes em água destilada esterilizada. Trinta grãos foram selecionados ao acaso e semeados diretamente em placas de Petri contendo PDA (Oxoid) + Cloranfenicol (100 mg/L) (MAKUN et al., 2009). Foram utilizadas 3 placas contendo 10 grãos para cada uma das amostras. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias e os resultados expressos em porcentagem do total de grãos infectados por fungos.

As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em PDA (Oxoid) e submetidas à identificação em nível de gênero de acordo com diversos compêndios (BOEREMA et al., 2004; LESLIE; SUMMERELL, 2006; PITT; HOCKING, 2009). Aqueles pertencentes ao gênero *Phoma* foram classificados até nível de espécie através de características morfológicas descritas no *Phoma Identification Manual* (BOEREMA et al., 2004). Para confirmar a identificação morfológica, 104 isolados de *Phoma* spp. foram molecularmente analisados através do sequenciamento parcial da região ITS, do gene da  $\beta$ -tubulina e da actina. A metodologia utilizada encontra-se descrita na seção 4.4.2.



**Figura 5** – Técnica de semeadura direta utilizada para o isolamento da micobiota associada às amostras de grãos de sorgo.

#### 4.4 Estudo polifásico dos isolados de *Epicoccum sorghinum*

Para esta etapa do projeto, um total de 53 isolados de *E. sorghinum* (= *Phoma sorghina*), identificados através de ferramenta molecular, foram estudadas através do emprego de abordagem polifásica com o objetivo de avaliar características morfológicas (macro e micromorfologia das colônias), filogenéticas (análise filogenética por *multilocus*) e fisiológicas (análise dos perfis de enzimas extracelulares). Com o intuito de embasar estas análises, a cepa referência de *E. sorghinum* (CBS 179.80) foi adquirida da coleção de culturas do CBS (*Fungal Biodiversity Centre*) e foi analisada conjuntamente com os isolados deste

estudo. Estes isolados foram depositadas no banco de fungos filamentosos do Laboratório de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas da Universidade de São Paulo (USP).

#### **4.4.1 Caracterização morfológica**

O estudo morfológico dos isolados de *E. sorghinum* foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita no *Phoma Identification Manual* (BOEREMA et al., 2004). As cepas foram cultivadas em meio de cultura ágar aveia (AA - Difco), com finalidade de estimular a esporulação e formação de picnídios e em ágar extrato de malte (MEA - Difco), a fim de observar a coloração e produção de pigmentos. Para o regime de incubação, os isolados foram mantidos à 22 °C por 7 dias no escuro e em mais 7 dias sob fotoperíodo alternado (13 horas claro/11 horas escuro).

Após 7 dias de incubação, o diâmetro das colônias foi verificado e após 14 dias os caracteres macro/micromorfológicos, tais como: tamanho e forma de picnídios, clamidósporos e conídios, bem como, a coloração do anverso e reverso, textura, borda e produção de exsudato (BOEREMA et al., 2004). Estes dados foram obtidas com o auxílio de fichas de caracterização morfológica, que se encontram demonstradas no Anexo A (Figura A6 e A7).

#### **4.4.2 Caracterização molecular**

A identificação molecular dos isolados seguiu a metodologia adotada pelo grupo referência em estudos do complexo *Phoma* (CBS) sendo confirmada através do sequenciamento parcial da região ITS do rDNA (*primers forward* e *reverse*: V9G e ITS4), dos fragmentos dos genes da  $\beta$ -tubulina (*primers forward* e *reverse*: BT2Fw e BT4Rd) e actina (*primers forward* e *reverse*: ACT512F e ACT783R) (AVESKAMP et al., 2010). Para tal, seguiu-se as seguintes etapas:

1) Extração de DNA: Para a obtenção da biomassa fúngica, os isolados foram cultivados em meio ágar YES e mantidos em estufa a 25 °C durante cinco dias. Para extração do DNA foi utilizado o kit comercial PrepMan Ultra (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, EUA). Para tal, o micélio foi coletado e transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 300  $\mu$ L de PrepMan Ultra e mantidos a 100 °C por 15 minutos. Após 7 minutos de centrifugação a 14000 rpm o sobrenadante foi recolhido e transferido para um segundo tubo e mantido a -20 °C até a utilização. A quantificação e a verificação do grau de pureza do DNA foram realizadas em NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific Waltham, MA, EUA).



2) Amplificação dos fragmentos: Neste caso, os fragmentos variaram de 250 à 600 pb e foram amplificados em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmp*<sup>®</sup> 9700, utilizando-se dos iniciadores conforme descrito por Aveskamp et al. (2010). A PCR foi realizada com 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega, San Luis Obispo, CA, EUA), 6,5 µL de água Milli-Q e 2 µL de DNA (40 ng/µL) e 2 µL (20 pmol) de cada iniciador, totalizando 25 µL de volume final. A ciclagem constituiu-se das seguintes etapas: denaturação inicial à 94 °C por 1 minuto, seguido por 35 ciclos de denaturação à 94 °C por 30 segundos, anelamento à 48 °C por 45 segundos (ITS), 52 °C por 30 segundos ( $\beta$ -tubulina), 55 °C por 50 segundos (actina) e extensão à 72 °C por 30 segundos e um ciclo adicional de 72 °C por 7 minutos (extensão final). Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,2%) com TBE 0,5x e corados com *safe DNA* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA). O marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb DNA *ladder* (*Invitrogen*). A presença das bandas foi visualizada pela exposição dos géis à luz UV.

3) Purificação do fragmento: Os fragmentos gerados foram purificados utilizando o kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para tal, ao produto de PCR foram adicionados 100 µL do *Binding Buffer* e todo conteúdo transferido para coluna que acompanha o kit. Após centrifugação a 13000 rpm por 1 minuto, a fase inferior do microtubo foi descartada e adicionou-se 700 µL de *Wash Buffer*. O conjunto foi centrifugado por duas vezes a 13000 rpm por 3 minutos para remoção total do tampão de lavagem. Para eluição, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionando 20 µL de *Elution Buffer* e centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto.

4) Reação de sequenciamento e identificação: As reações de sequenciamento (Sanger) foram realizadas pelo Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, localizado na Universidade de São Paulo. Após esta etapa, as sequências foram editadas utilizando o software *Sequencher* 4.0 e posteriormente comparadas com as sequências depositadas no banco dados *GeneBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e *Mycobank* (<http://www.mycobank.org/>). As sequências de 6 cepas foram depositadas no *GeneBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) sob o número de acesso KT310090 - KT310095.

5) Análise filogenética: Para estudos preliminares, os alinhamentos foram analisados pelo método baseado em distâncias genéticas Neighbor-joining (NJ), a fim de obter árvores filogenéticas individuais para a região ITS,  $\beta$ -tubulina e actina (SAITOU; NEI, 1987). Este teste permitiu uma avaliação prévia dos dados que antecederam às análises mais custosas computacionalmente e foi realizado utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics*

*Analysis* (MEGA) versão 4.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004), modelo Kimura 2-parâmetros e bootstrap com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

A análise filogenética final foi realizada através do método de Máxima Parcimônia. Este método foi aplicado utilizando o programa PAUP, com busca heurística de 100 repetições e adição aleatória de taxa (*random sequence addition*) e com intercâmbio de ramos (*branch-swapping*) do tipo *tree bisection reconnection* (TBR).

As sequências da cepa referência de *E. sorghinum* (CBS 179.80), obtidas através da metodologia descrita na seção 4.4.2, e da cepa *E. pimprinum* (CBS 246.60 - *outgroup*), retiradas do *GenBank*, foram incluídas nos estudos filogenéticos. As sequências selecionadas são as mais próximas à espécie estudada, de maneira que possa permitir uma melhor inferência por compartilhar caracteres historicamente similares, facilitando assim, o alinhamento das sequências.

#### **4.4.3 Caracterização enzimática**

O sistema API ZYM<sup>®</sup> é constituído por uma galeria composta por vinte cúpulas especialmente adaptadas ao estudo das reações enzimáticas, onde dezenove delas contém substratos sintéticos distintos que possibilitam a detecção de enzimas extracelulares.

Para avaliar a atividade enzimática através deste sistema, 5 discos de micélio (5 mm de diâmetro), oriundos das bordas das colônias de 65 isolados de *E. sorghinum* previamente cultivados em meio sorgo por 7 dias, foram depositados em *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio líquido batata dextrose (Difco) e incubados à 25 °C (OLIVEIRA et al., 2013). Após o período de incubação, o meio líquido fermentado por cada isolado foi filtrado através de membrana de 0,22 µm (Millipore) e utilizados para análises dos perfis de produção enzimática.

Para tal, foram depositados 65 µL dos filtrados fúngicos em cada cúpula e as galerias foram armazenadas em caixas de incubação durante 4 horas à 30 °C no escuro. Após este período, uma gota dos reagentes ZYM A (25g de Tris-hidroximetil-aminometano + 11 mL de ácido clorídrico 37% + 10 g de laurilsulfato de Na + 100 mL de H<sub>2</sub>O) e ZYM B (0,12 g “Fast Blue BB” + 40 mL de metanol + 60 mL de dimetilsulfóxido) foram adicionados à cada cúpula. Em seguida, as galerias foram expostas aos raios de uma lâmpada fluorescente por 10 minutos, efetuando então a leitura das colorações apresentadas. Notas de 0 a 5 foram concedidas conforme a intensidade das cores, sendo que "0" corresponde a uma reação negativa e "5" corresponde a uma reação de intensidade máxima (nota 1= 5 nmol; 2= 10

nmol; 3= 20 nmol; 4= 30 nmol e 5  $\geq$  40 nmol de substrato hidrolizado) (BioMérieux S.A., França).

#### **4.5 Determinação de ácido tenuazônico (AT)**

Para determinar os níveis de AT presentes nas amostras de grãos de sorgo, a metodologia utilizada neste estudo foi baseada no trabalho de Lohrey et al. (2013) o qual caracteriza-se por curtas e simples etapas de extração e com a detecção realizada em aparato de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

##### ***4.5.1 Preparação da solução padrão de AT***

O padrão de ácido tenuazônico (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) utilizado neste estudo encontrava-se associado ao cobre (Cu). Para obtenção das soluções livres de cobre foi necessário aplicar as seguintes etapas:

- 1) A resina de troca catiônica Dowex 50WX8-200 (H<sup>+</sup> form) foi submersa em água milli-Q durante duas horas;
- 2) Após este procedimento, uma minicoluna (4 cm×1,5 cm) foi preenchida com a resina e lavada diversas vezes com metanol;
- 3) 5 mg do padrão comercial de AT foi dissolvido em 2 mL de metanol e esta solução foi adicionada à minicoluna. Foram, então, adicionados 15 mL de metanol à minicoluna e a solução padrão livre de Cu foi obtida;
- 4) A concentração da solução padrão foi determinada através de espectrofotômetro UV ( $\lambda = 277$  nm e absorbtividade molar de 12.980 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). O cálculo da concentração do padrão foi realizado utilizando a Lei de Beer-Lambert. Foram obtidas soluções de trabalho através de diluições do padrão em metanol e foram mantidas em -20 °C.

##### ***4.5.2 Avaliação da metodologia analítica***

O método para determinação de AT em amostras de grãos de sorgo foi avaliado de acordo com os seguintes parâmetros: recuperação, repetibilidade, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD).

1) Teste de recuperação e repetibilidade: A avaliação da recuperação do método, realizada em quintuplicata, foi conduzida através da adição de quantidades conhecidas de AT às amostras de grãos de sorgo que não apresentavam níveis detectáveis da toxina. Sendo assim, em 5 g de amostras de grãos de sorgo, previamente triturados, foram adicionados padrões de AT nas concentrações de 100 e 200 µg/kg. Após 24 horas, as amostras foram extraídas utilizando o método para determinação de AT descrito na secção 4.5.3. Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de recuperação para cada amostra e seus respectivos coeficientes de variação.

2) Curva de calibração e determinação dos valores de LD e LQ: Para construção da curva de calibração e verificação da linearidade, a solução padrão de AT foi diluída em metanol para obtenção de seis soluções, com concentrações que variaram de 20 a 1000 ng/mL. O valor de LD foi determinado com a diminuição das concentrações de AT até ao nível mínimo detectável e, quando este apresentava precisão e exatidão em níveis aceitáveis, foi então determinado o valor de e LQ (IUPAC, 1995).

#### ***4.5.3 Extração de AT das amostras***

Foram transferidos, para um tubo cônico tipo falcon, 5 g de amostra de grãos de sorgo previamente triturada, adicionadas a 15 mL da solução de extração composta por acetonitrila:água (1:1, v/v), acidificada por ácido fórmico (0,55%). Após agitação por 90 minutos, em agitador mecânico horizontal, as amostras permaneceram em repouso por 60 minutos a fim de sedimentar a matriz. Após este período, uma alíquota de 100 µL foi retirada do sobrenadante e diluída em 900 µL da mesma solução utilizada como fase móvel (metanol acidificado – pH 2). Para o início das análises, 20 µL do extrato foram injetados no equipamento (LC-MS/MS).

#### ***4.5.4 Detecção de AT em aparato LC-MS/MS***

Os extratos foram injetados em cromatógrafo líquido (modelo 1200, Agilent) composto por degasseificador, bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostaticado. Após a separação dos componentes em coluna de fase reversa C-18 (SB 5 cm x 4.6 mm, com partícula 1,8 µm Agilent) na temperatura de 40 °C, o AT foi detectado em espectrômetro de massas (modelo API5000, Applied Biosystems) equipado com ionização

por eletrospray (ESI) em modo “ionização negativa”. O composto apresenta massa de 196 Mz e padrão de fragmentação estável de 139 e 112 Mz (Figura A.8). Como fase móvel, foi utilizado o seguinte sistema binário: A (água) e B (metanol acidificado com ácido fórmico). O fluxo foi de 1,0 mL/min, em esquema de 98% A e 2% B por 1 minuto, seguido de 100% B por 3 minutos, e 98% A e 2% B por 7 minutos finais. O tempo de retenção para o ácido tenuazônico foi de 4,79 minutos.

A quantificação foi feita através de múltiplas reações de monitoramento, a qual avaliou transições do composto alvo (AT) e seus respectivos valores de potencial declustering (DP), energia de colisão (CE) e potencial de saída (CXP). As duas transições mais consistentes foram selecionadas para análises, sendo elas: 139 m/z - CE: - 26v e CXP: -19 (quantificação) e 112 m/z - CE: - 34v e CXP: -15v (confirmação).

#### **4.5.5 Habilidade toxigênica de cepas de *E. sorghinum***

Para avaliar a habilidade de produção de AT por cepas *E. sorghinum* isoladas das amostras de grãos de sorgo, 12 cepas foram cultivadas em de grãos de arroz e também em grãos de sorgo (grãos livres de AT). Para tal, tubos cônicos tipo falcon contendo 5 g de grãos e 15 mL de água destilada foram autoclavados. Após o resfriamento dos tubos, três discos de micélio (5 mm) de cada cepa foram inoculados e os tubos mantidos em 25 °C por 21 dias. As etapas de extração e determinação de AT seguiram as mesmas metodologias descritas nas seções 4.5.3 e 4.5.4.

O critério adotado para seleção das cepas levou em consideração a formação de 4 grupos gerados através da análise filogenética. Sendo assim, pelo menos uma cepa representante de cada grupo filogenético foi selecionada.

#### **4.6 Sequenciamento do genoma de *E. sorghinum***

Este estudo foi conduzido durante o período de um ano de estágio no exterior em parceria com a *University of Houston*, sediada em Houston, TX e com o *Los Alamos National Laboratory, Section of Bioenergy and Biome Science*, sediado em Los Alamos, NM, ambos nos Estados Unidos.

##### **4.6.1 Material biológico**

A cepa P48, produtora de AT e previamente identificada como pertencente à espécie *E. sorghinum* por caracteres morfológicos e moleculares, foi selecionada para o sequenciamento completo do genoma e, também, para o estudo ecofisiológico. A cepa foi cultivada em meio AA por 5 dias e mantida em glicerol à -80 °C até o momento do seu uso. Esta cepa se encontra armazenada na micoteca do laboratório de Fungos Toxigênicos e Micotoxinas, localizado no Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo.

#### **4.6.2 Extração de DNA e sequenciamento do genoma**

A metodologia utilizada para obtenção da biomassa fúngica foi anteriormente descrita na seção 4.4.2. Após essa etapa, o DNA genômico da cepa de *E. sorghinum* (P48) foi extraído utilizando o *kit Easy-DNA* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA obtidas foram verificadas em Nano Drop™ 2000c e em gel de agarose 1%. O DNA genômico foi enviado para a empresa Macrogen Inc. (Coreia do Sul) a fim de realizar o sequenciamento completo do genoma através da plataforma Illumina (Hiseq 2500).

#### **4.6.3 Montagem do genoma**

Os *reads* gerados através do sequenciamento na plataforma Illumina foram submetidos ao controle de qualidade usando o software FaQCs, o qual descartou *reads* ambíguos e aqueles contendo menos de 35 nucleotídeos. Os *reads* de boa qualidade foram utilizados na montagem do genoma, utilizando o software IDBA\_UD e VELVET.

### **4.7 Estudo ecofisiológico de *E. sorghinum***

Para avaliar a resposta de *E. sorghinum* frente a fatores ambientais a cepa P48 foi cultivada sob a interação de diferentes faixas de temperatura (18, 22, 26 e 30 °C) e níveis de Aa (0,90, 0,95 e 0,99). Estes valores embasaram-se nas médias de temperatura (°C) e Aa observadas durante as safras de verão e outono, sendo: 26 °C e faixa de Aa entre 0,90 a 0,96 (verão) e 22 °C e faixa de Aa entre 0,55 a 0,98 (outono). As respostas fisiológicas foram obtidas através da avaliação da taxa de crescimento micelial, produção de enzimas extracelulares e da expressão do gene responsável pela síntese de AT (*TSAI*).

#### **4.7.1 Meio de cultura e condições de cultivo**

Para o estudo ecofisiológico foi utilizado um meio de cultura a base de grãos de sorgo. Para tal, 4% de grãos de sorgo moídos e 2% de ágar foram adicionados à água milli-Q e posteriormente autoclavados. Para o estudo da produção de enzimas extracelulares, o meio sorgo foi utilizado na forma líquida, sem adição de ágar. Os tratamentos, que constituíram-se em meio sorgo contendo diferentes níveis de Aa, foram obtidos através da adição de glicerol ao meio de cultura. Os níveis de Aa foram confirmados através do equipamento Aqualab CX-2 (Decagon Devices, Pullman, EUA).

#### **4.7.2 Crescimento micelial**

Para a avaliação da taxa de crescimento radial (mm/dia), discos de micélio (5 mm de diâmetro), oriundos das bordas de colônias previamente cultivadas em meio sorgo por 7 dias, foram depositadas no centro de placas de Petri (9 cm) contendo os tratamentos descritos acima e incubadas durante 7 dias nas diferentes temperaturas avaliadas. O experimento foi conduzido em triplicata. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas diariamente por duas medições do raio das colônias. Os dados de crescimento radial (mm/dia) foram plotados contra o tempo (dias de incubação) e os coeficientes angulares das retas foram obtidos através do cálculo de regressão linear (VAQUERA; PATRIARCA; FERNANDEZ, 2014).

#### **4.7.3 Análise da expressão do gene *TSAI***

Para atingir o objetivo proposto para esta etapa do estudo, primeiramente, foi necessário realizar uma busca pelo recente publicado gene responsável pela síntese de AT (*TSAI*). Para tal, através da ferramenta *Blast* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), foram realizadas buscas por sequências do gene *TSAI* no genoma de *E. sorghinum* sequenciado neste estudo. Após a confirmação da presença do gene alvo, seguiu-se as etapas seguintes:

1) Extração de RNA e obtenção de cDNA: Para a extração do RNA, discos de micélio (5 mm de diâmetro), oriundos das bordas de colônias previamente cultivadas em meio sorgo por 7 dias, foram depositadas em placas de Petri (9 cm) contendo os tratamentos (meio de cultivo com diferentes níveis de Aa) cobertos por membranas de celofane estéreis, a fim de facilitar a remoção do micélio destinado à extração de RNA. Após 4 dias de incubação, o RNA total foi extraído utilizando o kit *RNeasy Plant Mini* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com o manual do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as

recomendações do fabricante. Para obtê-lo, as reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems, CA, EUA), nas seguintes condições de ciclagem: Hibridização por 10 minutos a 25 °C, Transcrição reversa por 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85 °C. As amostras foram mantidas a -20 °C até o momento de serem utilizadas.

2) Análise por Real-time PCR: Os perfis de transcrição do gene alvo (*TSAI*), responsável pela síntese de AT, e do controle endógeno (*TUB*), responsável pela expressão constitutiva da  $\beta$ -tubulina, foram analisados utilizando a técnica RT-PCR. Os iniciadores utilizados neste estudo foram desenhados através da ferramenta do NCBI (desenho de *primers* destinados a RT-PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e estão listados no Quadro B.2. Os iniciadores referente ao gene *TSAI*, foram desenhados a partir da sequência referente ao domínio KS, descrito como domínio indispensável para síntese da toxina. Já os iniciadores referente ao gene da  $\beta$ -tubulina, foram desenhados a partir de sequências previamente amplificadas pelos iniciadores BT2Fw e BT4Rd (AVESKAMP et al., 2010). As reações para RT-PCR foram preparadas em duplicata utilizando o master mix 2X Power SYBR Green PCR (Invitrogen, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As condições de termociclagem foram: 95 °C por 3 minutos, 45 ciclos à 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 40 segundos. As análises foram realizadas em equipamento *Step One Plus Real time PCR system* (Applied Biosystems) e a quantificação relativa foi baseada nos valores de  $\Delta\Delta Ct$ , metodologia adotada para esse estudo.

Como base para avaliar a expressão relativa do gene *TSAI*, foram obtidos os valores de Ct (ciclo em que a amostra ultrapassa o *threshold*) do gene alvo e do gene referência. De posse dos valores de Ct, o  $\Delta Ct$  de cada amostra foi calculado pela subtração do Ct do gene alvo e o Ct do gene referência. Em seguida o  $\Delta\Delta Ct$  foi obtido pela subtração do  $\Delta Ct$  da amostra calibradora (amostra que apresentou o maior nível de expressão) em relação aos  $\Delta Ct$  das demais amostras. Os valores de  $\Delta\Delta Ct$  foram transformados em  $\log_2$  para gerar os níveis de expressão relativa.

Para avaliar a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene referência foram construídas curvas padrão para cada gene avaliado, através de diluições seriadas do cDNA de uma mesma amostra. Após a obtenção dos coeficientes angular das retas, a compatibilidade das eficiências geradas para cada gene foi realizada. Para tal, os valores de Ct de cada ponto da curva foram utilizados para a obtenção dos valores  $\Delta Ct$ . Esses dados foram plotados em um gráfico para a verificação do *slope* da reta gerada, que deve estar entre -0,1 e 0,1.

#### **4.7.4 Produção de enzimas extracelulares**

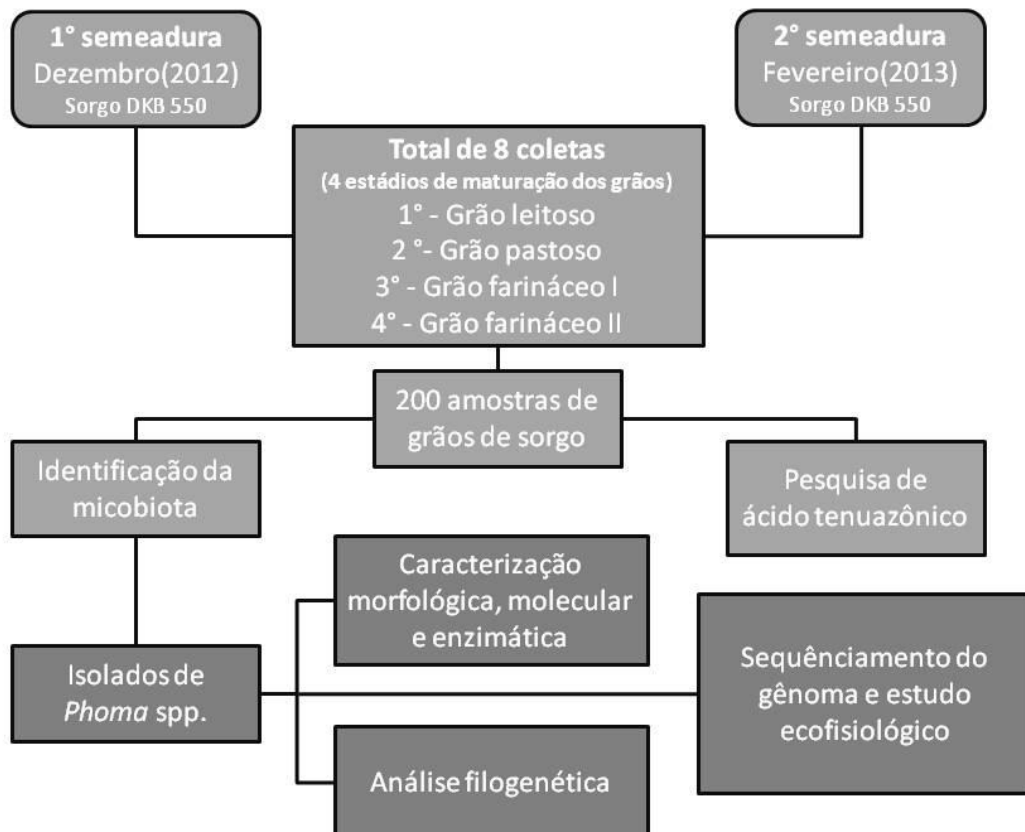


Para investigar a produção de enzimas extracelulares de *E. sorghinum* frente aos fatores abióticos avaliados, o sistema API-ZYM<sup>®</sup> foi utilizado. A cepa P48 foi previamente cultivada em meio ágar sorgo por 7 dias à 25 °C. Após este período, 5 discos de micélio foram retirados e depositados em *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio sorgo e então incubados à 25 °C por 10 dias (ZORZETE et al. 2016). Após este período, o meio líquido fermentado foi filtrado em membrana 0,22 µm (Millipore), e o filtrado fúngico foi utilizado para analisar os perfis de produção enzimática. O experimento foi realizado em duplicata. A avaliação dos resultados seguiu a metodologia descrita anteriormente no tópico 4.4.3.

#### **4.8 Análise Estatística**

Para as análises estatísticas foram utilizados os softwares SAS 9.1 e OriginPro 8.5. Os testes realizados foram: análise exploratória, correlação pelo coeficiente de Pearson e Two-way ANOVA (Tukey), atribuindo um nível de significância de 5%.

#### 4.9 Delineamento experimental

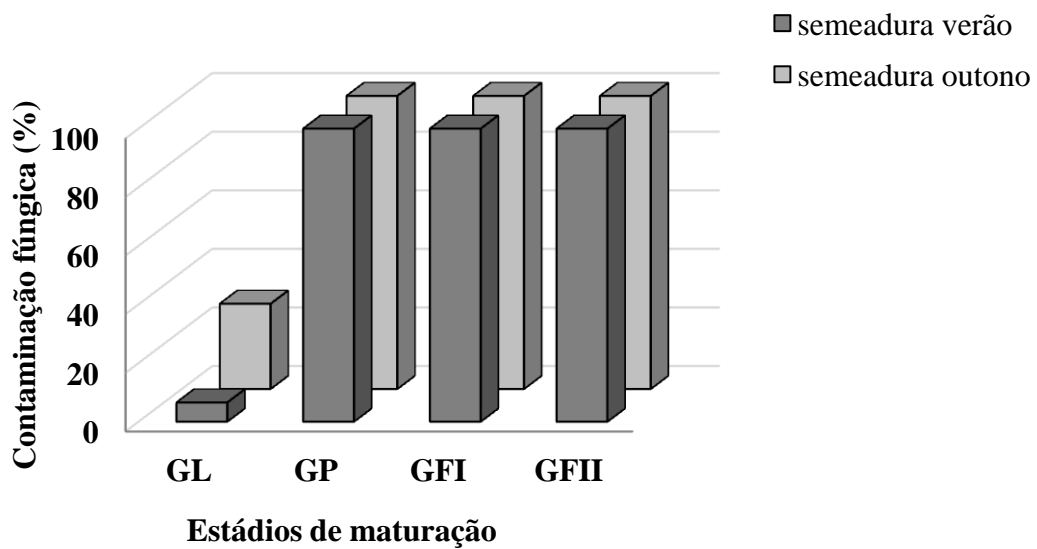


## 5 RESULTADOS

### 5.1 Micobiota

Através da técnica de isolamento empregada neste estudo, foi possível isolar e identificar 10 gêneros fúngicos associados aos grãos de sorgo oriundos de ambas as safras avaliadas (verão e outono). Em ordem decrescente de frequência, foram eles: *Phoma*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Epicoccum* e *Rhodotorula*. A distribuição destes fungos mostrou-se heterogênea durante a maturação dos grãos e entre as safras avaliadas (Tabela 1).

Foi possível observar que os grãos em estágio leitoso apresentaram as menores frequências de contaminação (6,5% de grãos contaminados oriundos da safra verão e 29% oriundos da safra outono). Já nos estádios seguintes (grão pastoso, farináceo I e II) os grãos apresentaram 100% de contaminação de ambas às safras avaliadas (Gráfico 1).



**Gráfico 1** - Porcentagem de contaminação de fúngica durante o desenvolvimento de grãos de sorgo em duas épocas de semeadura (verão e outono).

O gênero *Phoma* apresentou a maior frequência de isolamento, com média de 50,6% na safra verão e de 60% na safra outono, seguido pelo gênero *Curvularia*, com 9,9% na safra

verão e 5% na safra outono. O gênero *Fusarium* foi o terceiro mais isolado, com 5,9% (safra verão) e 2,9% (safra outono).

Em relação à distribuição dos gêneros fúngicos durante a maturação dos grãos, foi possível observar que os gêneros mais prevalentes nos grãos em estágio leitoso, oriundos da safra verão, foram: *Nigrospora* (2,3%); *Phoma* (1,7%) e *Curvularia* (1,2%). Em relação às amostras da safra outono, os gêneros mais frequentes foram: *Aspergillus* (14,4%); *Cladosporium* (4,1%) e *Phoma* (2,4%).

Nos grãos de sorgo em estágio pastoso, os fungos mais frequentes, oriundos da safra verão, foram: *Phoma* spp. (67,9%); *Fusarium* spp. (10,5%); *Nigrospora* spp. (7,5%) e da safra outono, *Phoma* (73,5%); *Nigrospora* spp. (7,9%) e *Cladosporium* spp. (6,9%).

Os gêneros mais isolados nos grãos em estágio farináceo I, oriundos da safra verão, foram: *Phoma* (58,9%); *Curvularia* (28,4%) e *Fusarium* (5,9%). Já nos grãos provenientes da safra outono, foram: *Phoma* (76,7%); *Curvularia* (10,1%) e *Nigrospora* (3,4%).

O último estágio de maturação avaliado (grão farináceo II), os gêneros mais prevalentes referentes à safra verão foram: *Phoma* (74%); *Drechslera* (8,5%) e *Fusarium* (7,4%). Já nos grãos provenientes da safra outono, foram: *Phoma* (87,4%); *Fusarium* (6,4%) e *Alternaria* (3,3%).

Os isolados pertencentes aos principais gêneros de importância toxicológica foram identificados, através de ferramentas moleculares, em nível de espécie, sendo eles: *Epicoccum sorghinum*, *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc e *Aspergillus* seção *Flavi*.

**Tabela 1** - Porcentagem de contaminação fúngica de 200 amostras de grãos de sorgo em diferentes estádios de maturação e oriundos da safra verão e outono.

Fungos	Épocas de semeadura	Contaminação fúngica (%)*				média
		Leitoso	Pastoso	Farináceo I	Farináceo II	
<i>Phoma</i> spp.	safra verão	1,7	67,9	58,9	74	50,6
	safra outono	2,4	73,5	76,7	87,4	60
<i>Curvularia</i> spp.	safra verão	1,2	3,8	28,4	6,3	9,9
	safra outono	0,4	6,7	10,1	2,9	5,0
<i>Fusarium</i> spp.	safra verão	0	10,5	5,9	7,4	5,9
	safra outono	0,5	2,1	2,5	6,4	2,9
<i>Nigrospora</i> spp.	safra verão	2,3	7,5	1,2	0	2,7
	safra outono	0	7,9	3,4	0	2,8
<i>Aspergillus</i> spp.	safra verão	0,1	0	0,3	2	0,6
	safra outono	14,4	0,4	0	0	3,7
<i>Alternaria</i> spp.	safra verão	0,1	1,8	1,4	0,2	0,9
	safra outono	0	1	6	3,3	2,6
<i>Cladosporium</i> spp.	safra verão	0,1	0	0	0	0,0
	safra outono	4,1	6,9	0	0	2,7
<i>Drechslera</i> spp.	safra verão	0	0	0,3	8,5	2,2
	safra outono	0	0,7	1,6	0	0,6
<i>Epicoccum</i> spp.	safra verão	0	7,1	3	0	2,5
	safra outono	0,1	0,6	0	0	0,2
<i>Rhodotorula</i> spp.	safra verão	0,3	0	0	0	0,1
	safra outono	3,1	0	0	0	0,8

\* média de 25 amostras para cada estágio de maturação dos grãos.

## 5.2 Estudo Polifásico dos isolados de *E. sorghinum*

A apresentação dos resultados seguirá o seguinte formato: 1) caracterização molecular de 104 isolados de *Phoma* spp.; 2) caracterização polifásica (análise filogenética, aspectos morfológicos e fisiológicos) de 53 isolados de *E. sorghinum*.

### 5.2.1 Caracterização molecular

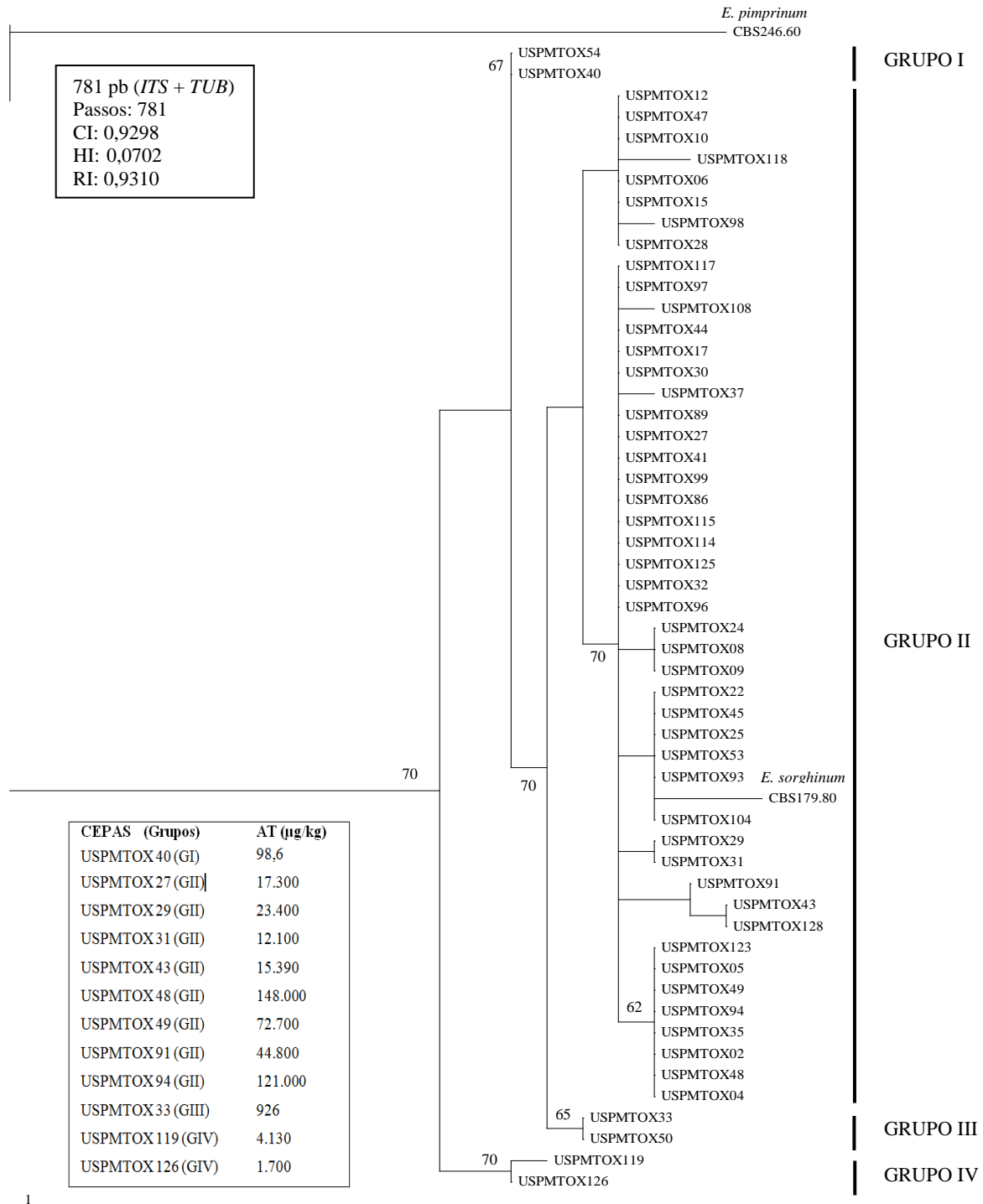
Dos 104 isolados, morfológicamente identificados como *Phoma* spp., 97 foram identificadas como pertencentes a espécie *Epicoccum sorghinum* (= *Phoma sorghina*) e 7 como sendo *Epicoccum nigrum* (Tabela C.2). Os resultados confirmaram que o uso do sequenciamento *multilocus* (ITS,  $\beta$ -TUB e ACT) para identificação de isolados de *Phoma* spp., bem como na discriminação da espécie *E. sorghinum*, se mostrou satisfatório (> 97% ITS e > 98%  $\beta$ -TUB e ACT) (Tabela C.2). Entretanto, foi possível observar que existe uma fragilidade quanto a acurácia das sequências da região ITS presentes no *GeneBank* do NCBI, os quais geraram identificações errôneas, principalmente para espécie *Coniothyrium fuckelii*.

### 5.2.2 Análise filogenética do sequenciamento *multilocus*

A análise filogenética das sequências nucleotídicas das cepas de *E. sorghinum* revelou a presença de diferentes espécies filogenéticas distribuídas em 4 principais grupos (Figura 6). As sequências de ITS e  $\beta$ -TUB apresentaram-se filogeneticamente informativas e foram selecionadas para a análise combinada, enquanto que as sequências de ACT foram menos informativas, logo foram excluídas.

O resultado do teste de incongruência mostrou que os fragmentos sequenciados para a região ITS e para fragmentos do gene da  $\beta$ -tubulina foram congruentes ( $p = 0,6667$ , valor de  $p$  deve ser superior a 0,05) e, portanto, poderiam ser utilizados na análise combinada. As sequências de ITS e  $\beta$ -TUB, quando combinadas, geraram uma matriz com 781 caracteres. A partir de uma busca heurística utilizando o conjunto de 781 caracteres de dados combinados, incluindo: 730 constantes, 37 caracteres variáveis parcimônia não informativo e 14 parcimônia informativo, foi obtida a árvore mais parcimoniosa, contendo 57 passos de comprimento, 0,9298 de CI (índice de consistência), 0,0702 de HI (índice de homoplasia) e 0,9310 de RI (índice de retenção).

A árvore considerada mais parcimoniosa a partir desta análise encontra-se ilustrada na Figura 6, onde é possível observar a presença de quatro principais grupos. O grupo I, com índice de *bootstrap* de 67%, agrupou duas cepas USPMTOX. O grupo II, constituído com a grande maioria das cepas avaliadas neste estudo, agrupou 47 cepas USPMTOX em diversos subgrupos e também a cepa referência *E. sorghinum* (CBS179.80). O grupo III e IV, com valores de *bootstrap* de 65 e 70%, respectivamente, foi composto de duas cepas USPMTOX cada.



**Figura 6** - Árvore mais parcimoniosa obtida a partir da análise combinada da região ITS e do fragmento do gene da  $\beta$ -tubulina. Sequências de *E. pimprinum* e *E. sorghinum* foram adicionadas como *outgroup* e cepa referência, respectivamente. Perfil de produção de AT ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por cepas representantes de cada grupo filogenético.



### 5.2.3 Caracterização morfológica

Utilizando os critérios macromorfológicos descritos, foi possível observar grande variabilidade fenotípica entre as 53 cepas de *Epicoccum sorghinum* estudadas. De modo geral, as características morfológicas observadas estão de acordo com as relatadas na literatura; embora algumas cepas apresentaram características adicionais e contribuíram para descrição fenotípica da espécie. Estes resultados estão detalhadamente descritos na Tabelas C.1

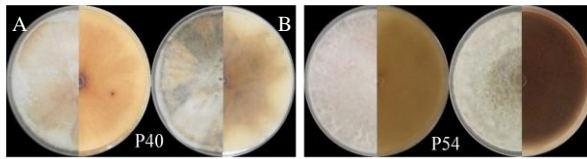
Em relação ao diâmetro das colônias, as cepas crescidas em MEA apresentaram crescimento rápido atingindo valores de 56 a 80 mm, com média de crescimento de 71,5 mm. Já as cepas crescidas em AA os valores obtidos foram de 40 a 75 mm, com média de 62,6 mm.

Em relação à borda das colônias, todas as cepas apresentaram-na de forma regular. Quanto à textura das colônias, foi possível observar micélio aéreo do tipo aveludado e cotonoso, com predomínio de colônias aveludadas quando crescidas em AA.

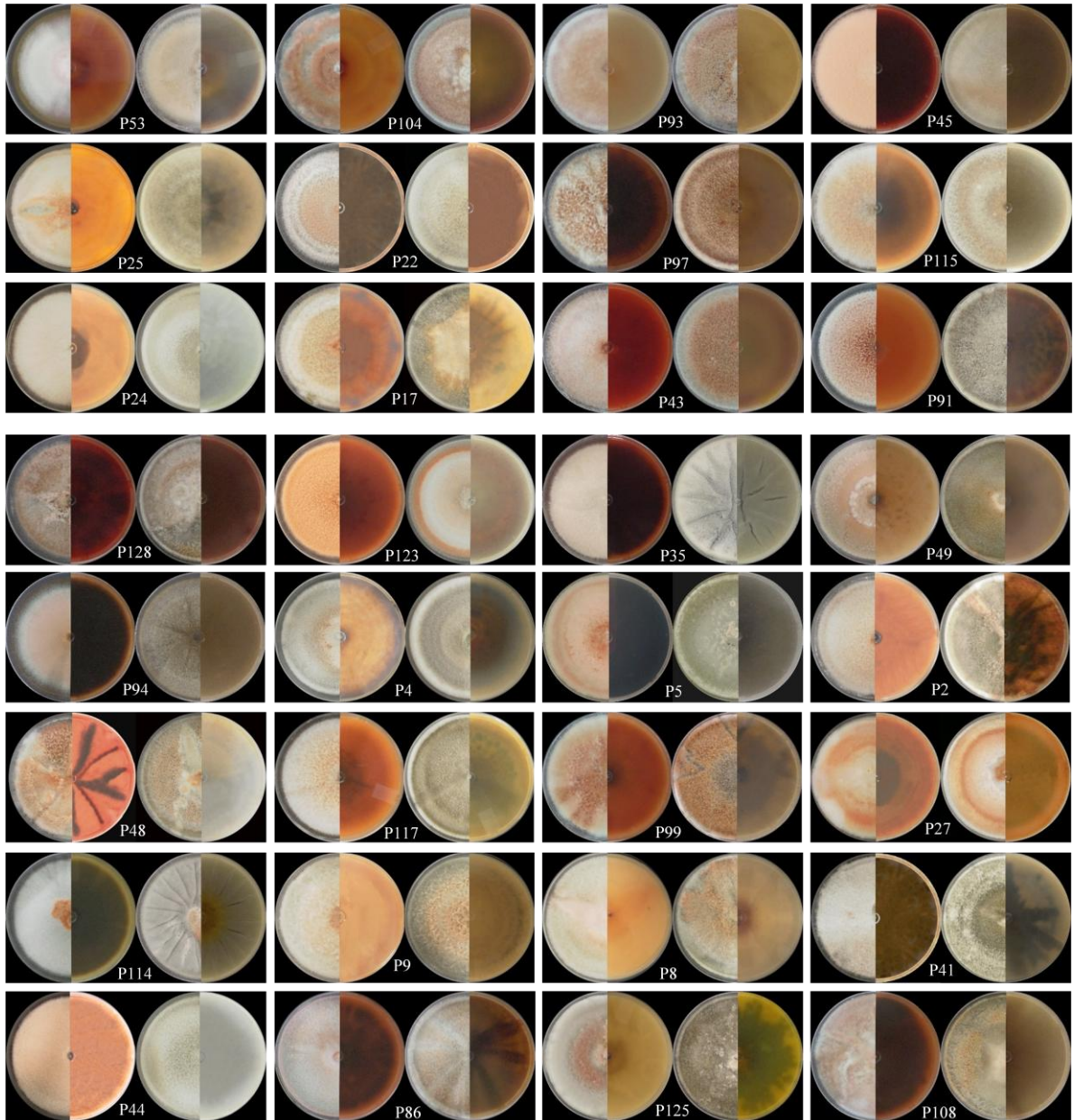
Em relação à coloração das colônias, houve grande variabilidade entre as cepas avaliadas, conforme ilustrado na Figura 7. De modo geral, o anverso das colônias, quando crescidas em AA, apresentou coloração cinza esverdeado ou mais raramente em tons de laranja e com algumas colônias contendo faixas em tom de laranja. Já em MEA, a coloração do anverso variou em tons de branco, vermelho, laranja ou mais raramente verde. A presença de pigmento difusível (reverso), como prevista, foi pouco notada em AA, porém, 33 cepas produziram pigmento quando crescidas em MEA. A coloração observada no reverso das placas variou em tons de marrom, vermelho e em alguns casos negro. A presença de exsudatos foi relatada em 40 isolados inoculados em AA e 22 isolados em MEA, apresentando variações na coloração entre vermelho, amarelo e incolor.

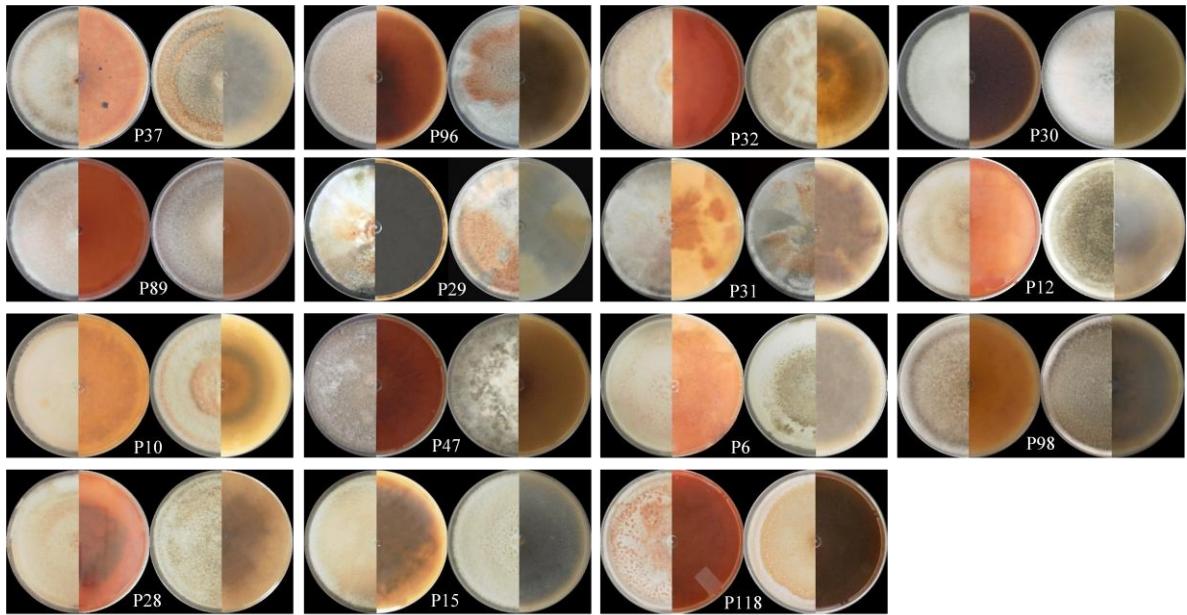
Avaliando as características macromorfológicas das cepas de acordo com a formação dos quatro grupos filogenéticos, não foi possível encontrar características homogêneas entres os grupos formados. Entretanto, vale ressaltar que as cepas pertencentes ao grupo I e II não produziram pigmentos em ambos os meios avaliados e o menor diâmetro das colônias foi observado na cepa USPMTOX 54 (4 cm), pertencente ao grupo I.

## GRUPO I

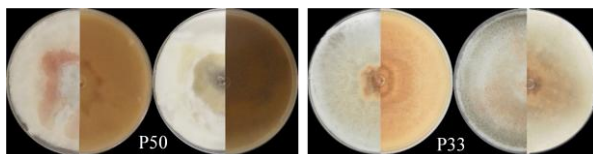


## GRUPO II

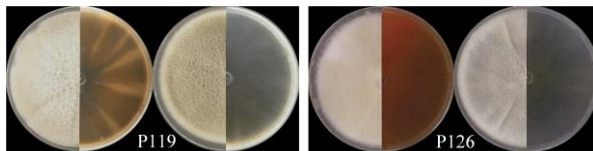




### GRUPO III



### GRUPO IV



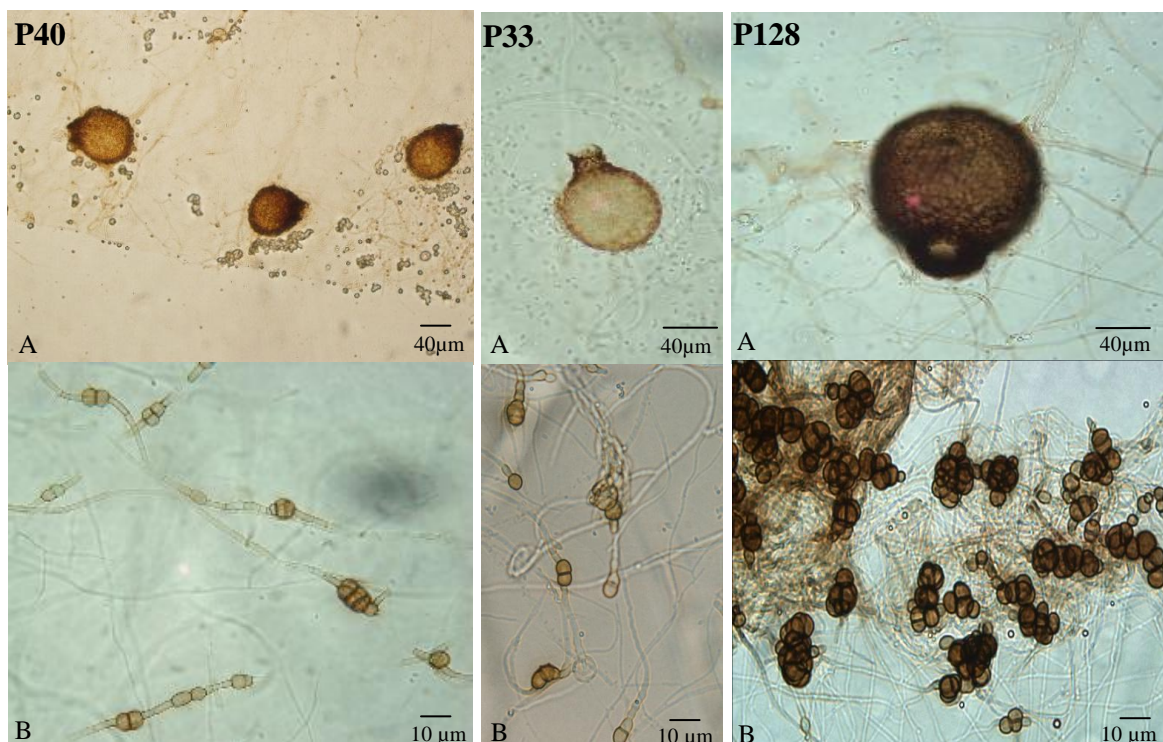
**Figura 7** – Características macromorfológicas de cepas de *E. sorghinum* cultivadas em meio de cultivo MEA (A) e AA (B).

Utilizando os critérios micromorfológicos descritos, foi possível verificar considerável variabilidade nas estruturas presentes nas cepas de *E. sorghinum*.

Os picnídios, quando presentes, apresentaram forma subglobosa, superfície glabra, com presença de ostíolo e diâmetro variando entre 62,5 – 162,5  $\mu\text{m}$  (comprimento) x 85 -163  $\mu\text{m}$  (altura). A coloração variou de marrom pálido a melanizado (Figura 8). Os conídios variaram em forma e diâmetro, apresentando formato elipsoidal e ovóide-elipsoidal, variando de 2,3 - 2,5  $\mu\text{m}$  (comprimento) x 5  $\mu\text{m}$  (altura) e de coloração hialina.

Em relação aos clamidósporos, foram altamente variáveis, apresentaram forma globosa, quando solitários e botrióide ou botrióide-alternarioide, quando em cadeia. O diâmetro variou entre 5 – 10  $\mu\text{m}$  (comprimento) x 6 – 72  $\mu\text{m}$  (altura). Apresentaram coloração variando de marrom pálido a melanizado e foram observados em posição intercalar e/ou terminal (Figura 8).

Não foi possível notar relação entre as variações micromorfológicas com a distribuição das cepas nos quatros grupos filogenéticos.

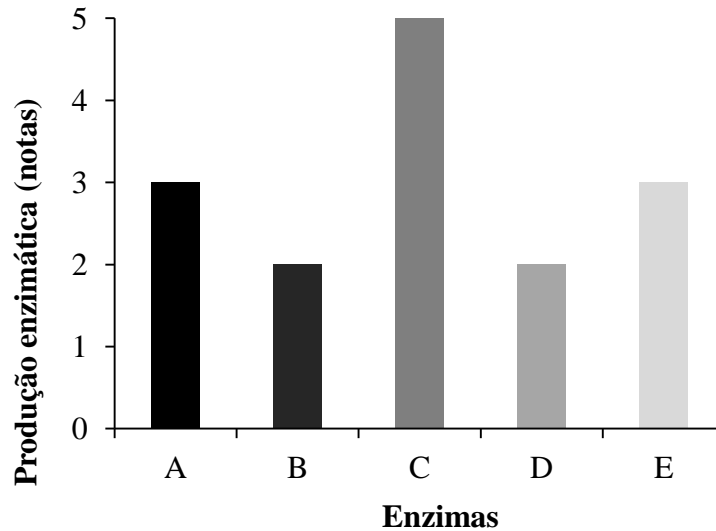


**Figura 8** - Micromorfologia de cepas de *Epicoccum sorghinum*. A) Picnídios globosos e subglobosos, com superfície glabra, na coloração de marrom pálido (P40 e P33 - aumento 20 X) e melanizado (P128 - aumento 40 X); B) Clamidósporos intercalados e terminais, uni e multicelulares, globosos e botrióide-alternarióide, marrom pálido (P40 e P33 - aumento 40 e melanizado (P128 - aumento 40 X).

#### 5.2.4 Caracterização enzimática

Os resultados dos perfis de enzimas extracelulares produzidos pelas 53 cepas de *Epicoccum sorghinum* foram altamente similares. Das 19 enzimas avaliadas, 5 foram produzidas por todas as cepas, sendo elas: esterase (C4), esterase lipase, fosfatase ácida, naphthol-AS-BI fosfohidrolase e N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase. Além de todas as cepas

apresentarem o mesmo perfil qualitativo, as enzimas foram produzidas nas mesmas concentrações (Gráfico 2).



**Gráfico 2** - Perfil qualitativo e quantitativo de enzimas extracelulares produzidas por cepas de *E. sorghinum*. Enzimas: A) esterase (C4); B) Esterase lípase; C) Fosfatase ácida; D) naphthol-AS-BI fosfohidrolase; E) N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase.

### 5.3 Determinação de AT

#### 5.3.1 Avaliação da metodologia analítica

Em relação à avaliação metodológica para detecção de AT, os resultados obtidos para curva de calibração demonstraram coeficiente de correlação de 0,99978. O coeficiente de correlação foi satisfatório, já que foi maior que 0,99. A recuperação do método foi testada em quintuplicata e apresentou média de recuperação de 91% para concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 98% para 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Os coeficientes de variação das recuperações foram de 6,24 e 7,76%, respectivamente. Os resultados dos limites de quantificação e detecção do método foram de 10 e 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente.

#### 5.3.2 Determinação de AT em 200 amostras de grãos de sorgo

A presença de AT foi detectada em amostras de grãos de sorgo durante os quatro estádios de maturação avaliados, bem como nas amostras oriundas de ambas as safras (Tabela

2). De forma geral, os níveis de contaminação variaram de 14,1 a 1647  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Os grãos desenvolvidos durante a safra verão apresentaram índices médios de contaminação maiores (587,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) comparados aos grãos da safra outono (440,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Tabela 2).

Avaliando a ocorrência de AT durante a maturação dos grãos, o estágio de grão leitoso apresentou menos amostras contaminadas (28% das amostras oriundas da safra verão e 36% da safra outono). Entretanto, nos estádios de GP, GFI e GFII as amostras apresentaram 100% de contaminação por AT e os níveis detectados aumentaram no decorrer do desenvolvimento dos grãos.

Grãos leitosos apresentaram níveis médios de contaminação por AT de 41,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (verão) e 35,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (outono). Já os grãos pastosos apresentaram níveis médios de 228,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (verão) e de 259  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (outono). Os grãos em estágio farináceo I, os níveis médios foram de 557,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (verão) e de 345,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (outono). Os grãos em maturidade fisiológica (GFII) apresentaram os maiores índices médios de contaminação por AT, 587,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (verão) e 440,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (outono).

**Tabela 2** – Porcentagem de contaminação, valores médios e níveis de AT encontrados em 200 amostras de grãos de sorgo (100 amostras oriundas de cada safra avaliada) durante quatro estádios de maturação.

Estádios*	Safras	Ácido tenuazônico (AT)		
		Amostras + (%)	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Níveis
GL	verão	(7/25) 28	35,3	14,1 - 290,4
	outono	(9/25) 36	41,3	13 - 313,8
GP	verão	(25/25) 100	228,6	40,8 - 487,1
	outono	(25/25) 100	250	20 - 1234,2
GFI	verão	(25/25) 100	557,7	249 - 1355,9
	outono	(25/25) 100	345,8	15,1 - 690,1
GFII	verão	(25/25) 100	587,8	165,4 - 1647,5
	outono	(25/25) 100	440,5	198,6 - 1154,9

\* GL: grão leitoso; GP: grão pastoso; GFI: grão farináceo I; GFII: grão farináceo II.

### 5.3.3 Habilidade toxigênica de cepas de *E. sorghinum*

Foi possível confirmar que cepas de *E. sorghinum* isoladas das amostras de grãos foram produtoras de AT (Tabela 3). A detecção de AT foi observada em ambos os grãos testados (arroz e sorgo) e por 100% das cepas avaliadas (n=12). Embora o AT tenha sido produzido em ambos os grãos, a maior média de produção de AT (35.583 µg/kg ) foi observada em grãos de arroz, em níveis que variaram de 98,6 a 148.000 µg/kg. A média de AT em grãos de sorgo foi de 25.003 µg/kg, em níveis que variaram de 19 a 143.730 µg/kg (Tabela 3).

Foi possível verificar considerável variabilidade nos perfis de produção de AT entre as cepas distribuídas nos quatro grupos filogenéticos (Figura 6). Os níveis mais baixos de AT foram produzidos por cepas representantes dos grupos I, III e IV. Já o grupo II, o qual abrange a maioria das cepas USPMTOX, apresentou os maiores níveis de produção de AT.

**Tabela 3** – Perfis de produção de AT (µg/kg) por cepas de *E. sorghinum* pertencentes aos quatro grupos filogenéticos cultivadas em grãos de arroz e sorgo.

Cepas - Grupos	AT (µg/kg)	
	arroz	sorgo
USPMTOX40 - G1	98,6	19
USPMTOX 27 - GII	17.300	18.344
USPMTOX 29 - GII	23.400	29.029
USPMTOX 31 - GII	12.100	13.629
USPMTOX 43 - GII	15.390	14.890
USPMTOX 48 - GII	148.000	65.829
USPMTOX 49 - GII	72.700	143.729
USPMTOX 91 - GII	44.800	41.729
USPMTOX 94 - GII	121.000	14.729
USPMTOX 33 - GIII	926	653
USPMTOX 119 - GIV	4.130	3.389
USPMTOX 126 - GIV	1.700	522
<b>média</b>	<b>38.462</b>	<b>28.874</b>

## 5.4 Influência das épocas de semeadura na ocorrência de *E. sorghinum* e AT

### 5.4.1 Avaliação dos dados climatológicos e Aa dos grãos

Durante o desenvolvimento dos grãos de sorgo, oriundos da safra verão e outono, foram obtidos dados climatológicos referentes à temperatura (°C), precipitação (mm) e umidade relativa do ar (%), bem como, o acompanhamento dos níveis de Aa dos grãos coletados. Estes dados estão representados nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** - Média quinzenal dos dados climatológicos e média dos níveis de Aa dos grãos de sorgo em distintos estádios de maturação obtidos durante a safra verão.

Estádio de maturação	Aa	Temperatura (°C)			Precipitação (mm) (%*)	Umidade relativa (%)		
		máxima	mínima	média		máxima	mínima	média
GL	0,96	36,7	17,2	26,7	1,11 - 31	95,5	20,9	60,6
GP	0,96	34,1	18,7	25,9	4,7 - 60	95,6	31,5	69,9
GF I	0,90	34,8	18,2	26,8	0,9 - 20	94	23,7	61,2
GF II	0,91	34,7	18,6	25,8	3,8 - 40	95,2	30,4	67,0
média	-	33,6	19,2	<b>26,3</b>	<b>2,6</b>	94,3	39,4	<b>64,6</b>

GL: grão leitoso; GP: grão pastoso; GF I: grão farináceo I; GF II: grão farináceo II

\* Porcentagem de dias chuvosos no período de 15 dias

**Tabela 5** - Média quinzenal dos dados climatológicos e média dos níveis de Aa dos grãos de sorgo em distintos estádios de maturação obtidos durante a safra outono.

Estádio de maturação	Aa	Temperatura (°C)			Precipitação (mm) (%*)	Umidade relativa (%)		
		máxima	mínima	média		máxima	mínima	média
GL	0,98	31,9	14,2	23,2	0,1 - 13	95,3	32,8	66,7
GP	0,96	32,5	14,2	22,3	3,8 - 33	95,3	32,9	69,2
GF I	0,78	30,8	15,0	22,8	2,6 - 20	95,1	35,3	67,8
GF II	0,55	31,8	14,0	21,6	2,7 - 20	95,7	31,8	68,7
média	-	31	14,2	<b>22,4</b>	<b>2,3</b>	94,5	33,9	<b>68,1</b>

GL: grão leitoso; GP: grão pastoso; GF I: grão farináceo I; GF II: grão farináceo II

\* Porcentagem de dias chuvosos no período de 15 dias

Costatou-se que os níveis de Aa dos grãos foram estatisticamente diferentes nos estádios GL ( $p = 0$ ), GFI ( $p = 0,000001707$ ) e GFII ( $p = 0,00000000004959$ ) entre as safra verão e



outono. Os níveis de Aa observados durante a safra verão permaneceram altos durante todo o período de desenvolvimento dos grãos, com níveis que variaram de 0,96 a 0,91. Por outro lado, decresceram no decorrer do desenvolvimento dos grãos durante a safra outono (0,98 a 0,55 Aa).

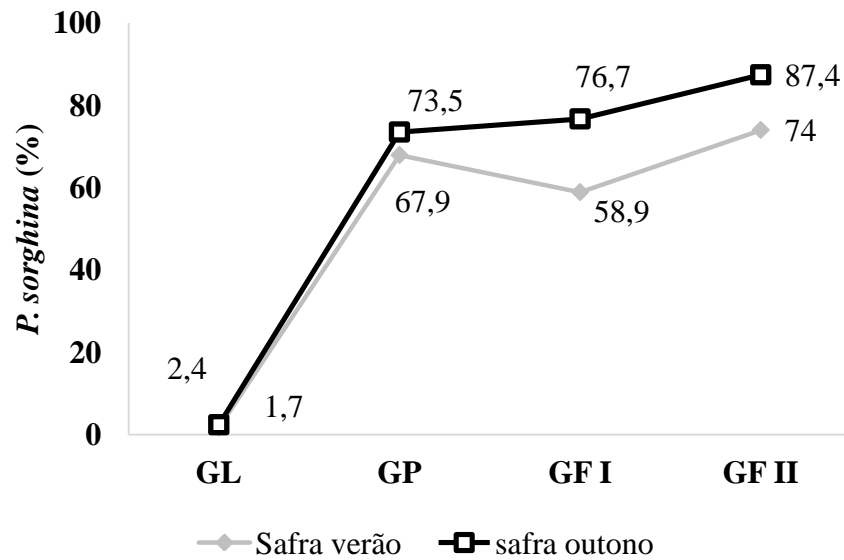
As maiores médias amostrais de Aa foram observadas no primeiro estágio de maturação dos grãos (GL), com valores de 0,96 (safra verão) e 0,98 (safra outono). Já nos estádios intermediários de maturação (grão pastoso e farináceo I) os valores médios decresceram e atingiram 0,90 (safra verão) e 0,78 (safra outono). As menores médias foram observadas no estágio grão farináceo II com 0,91 (verão) e 0,55 (outono). O decréscimo da disponibilidade de água no decorrer da maturação fisiológica dos grãos é um fenômeno natural, entretanto, vale destacar que, as menores porcentagens de dias chuvosos observadas durante a estação outono parecem estar relacionadas com o decréscimo da Aa dos grãos durante este período (Tabela 4 e 5).

Referente aos dados climatológicos foi possível observar que durante o período de cultivo do sorgo na safra verão, as médias de temperatura (26,3 °C) e precipitação (2,6 mm) foram maiores do que as registradas durante a safra outono (22,4 °C e 2,3 mm). Já a média de umidade relativa registrada na safra outono (68,1) foi superior a safra verão (64,6) (Tabela 4 e 5).

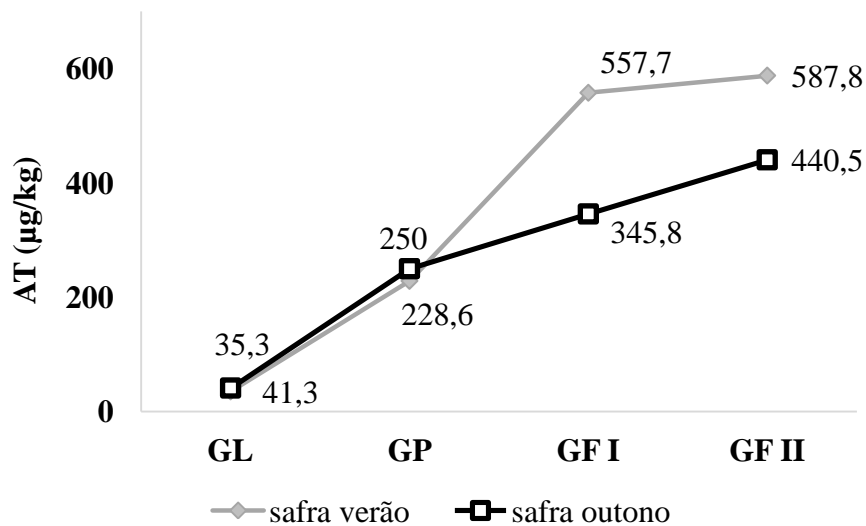
#### **5.4.2 Avaliação da ocorrência de *E. sorghinum* e AT**

A análise descritiva para a variável frequência de *Epicoccum sorghinum* e a ocorrência de AT nos grãos de sorgo está apresentada nos Gráficos 3 e 4. Foi possível observar elevada frequência de isolamento de *E. sorghinum* a partir do estágio de maturação GP em ambas as safras avaliadas (Gráfico 3). Entretanto, quando comparamos a frequência da espécie entre as safras, é possível observar maiores índices quando os grãos foram cultivados durante a safra outono. Apenas no estágio GFI foi possível observar diferença estatística da frequência de *E. sorghinum* entre as épocas de semeadura avaliadas ( $p = 0,00005224$ ).

Em contra partida, a contaminação de AT detectada nos grãos foi maior na safra verão quando comparada à safra outono (Gráfico 4). É interessante observar que os níveis de AT nos estádios iniciais de maturação dos grãos (GL e GP) foram semelhantes nas duas épocas de semeadura. Entretanto, a partir do estágio GFI, houve um aumento expressivo dos níveis AT nos grãos oriundos da safra verão.



**Gráfico 3** – Frequência de *E. sorghinum* (%) durante o desenvolvimento de grãos de sorgo cultivados em duas épocas de semeadura (verão e outono).



**Gráfico 4** - Ocorrência de AT (µg/kg) durante o desenvolvimento de grãos de sorgo cultivados em duas épocas de semeadura (verão e outono).

Para confirmar se houve correlação entre as variáveis investigadas, empregou-se a correlação de *Pearson* entre os dados climatológicos, os níveis de Aa, a frequência de *E. sorghinum* e a ocorrência de AT. Para classificação da correlação foi utilizado o critério

descrito por Dancey e Reidy (2006) onde os valores de  $r = 0,10$  até  $0,30$ , considera-se correlação fraca;  $r = 0,40$  até  $0,60$  correlação moderada e  $r = 0,70$  até  $1$ , correlação forte.

Desta maneira, foi possível constatar forte correlação positiva entre a frequência de *E. sorghinum* e a ocorrência de AT na safra verão ( $r = 0,79$ ) e na safra outono ( $r = 0,93$ ). A correlação entre os níveis de Aa e a frequência de isolamento da espécie foi moderada em ambas as safras ( $r = -0,51$ , verão e  $r = -0,66$ , outono). Além disso, foi observada correlação negativa entre a ocorrência de AT e os níveis de Aa (verão  $r = -0,92$ ; outono  $r = -0,88$ ). A correlação entre

Em relação aos dados climatológicos foi possível observar uma forte e moderada correlação positiva entre a frequência de *E. sorghinum* e os valores de umidade relativa máxima ( $r = 0,81$ , verão e  $r = 0,97$ , outono) e precipitação total ( $r = 0,63$ , verão e  $r = 0,89$ , outono). Já em relação à temperatura média, houve moderada correlação negativa no verão ( $r = -0,63$ ) e forte no outono ( $r = -0,77$ ).

Não foi possível observar correlação entre os dados climatológicos e a ocorrência de AT durante a safra de verão. Entretanto, durante a safra outono foi possível verificar forte correlação positiva com umidade média ( $r = 0,82$ ), correlação moderada com a precipitação total ( $r = 0,68$ ) e forte correlação negativa com a temperatura média ( $r = -0,80$ ).

Dentre os 3 fatores climatológico estudados, observa-se que tanto fungo quanto a toxina aparentam estar mais correlacionados com a umidade máxima. No entanto, do ponto de vista de significância estatística, não foram encontradas correlações significativas ( $p < 0,05$ ) entre as variáveis dependentes (*E. sorghinum*, AT e Aa) e as variáveis independentes (fatores climatológicos) avaliadas.

## 5.5 Sequenciamento e montagem do genoma de *E. sorghinum*

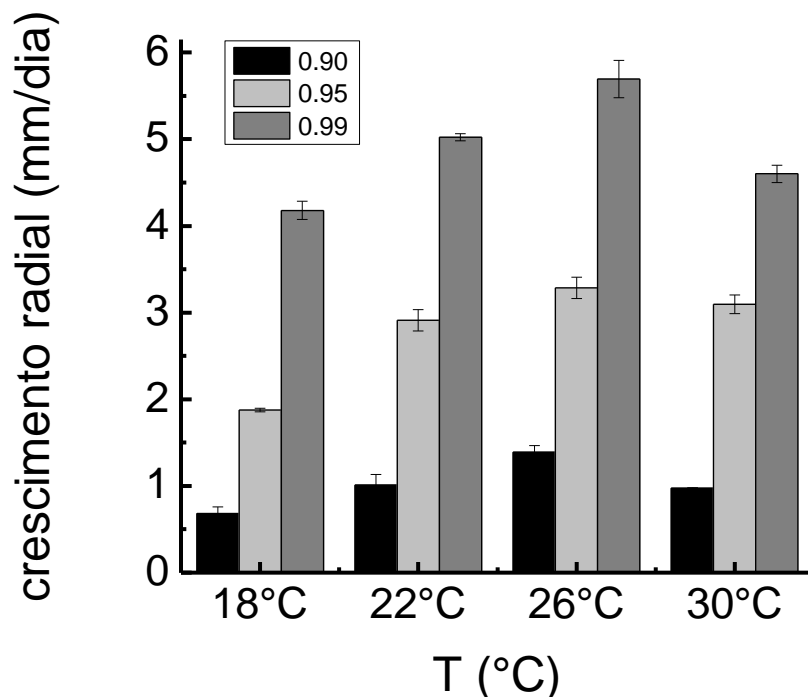
Foi gerado um total de 58.194.228 *short-reads*, com comprimento de 101 bp, totalizando 5.878 Mpb (cobertura de 176 x). A montagem do genoma consistiu-se de 391 contigs (>1 kb) com tamanho estimado de 33.4 Mbp e conteúdo de G + C de 52%.

O gene *TASI*, responsável pela síntese de AT, foi identificado no genoma de *E. sorghinum* e apresentou alta similaridade com aquele originalmente descrito no genoma do fungo *M. oryzae* (83%) e a mesma estrutura de organização dos domínios (C - condensação; A - adenilação; PCR - proteína carreadora de peptídeo; KS - Ketoacetil sintase) (Figura A.9).

## 5.6 Estudo ecofisiológico de *E. sorghinum*

### 5.6.1 Crescimento micelial

A cepa de *E. sorghinum*, exposta a interação de diferentes temperaturas e níveis de Aa, foi capaz de crescer em todas as condições testadas, em uma faixa de temperatura que variou de 18 a 30 °C e de 0,90 a 0,99 Aa (Gráfico 5). A condição ótima para o crescimento micelial foi observada nas condições de 26 °C e 0,99 Aa (5,70 mm/dia). A menor taxa de crescimento foi observada no mais baixo nível de Aa (0,90) e na temperatura de 18 °C (0,68 mm/dia). As taxas de crescimento micelial duplicaram e triplicaram de valor quando comparamos os resultados entre o menor nível de Aa (0,90) e de 0,95 e 0,99, respectivamente. Em relação à temperatura, as melhores performances no crescimento foram observadas na faixa intermediária (22 e 26 °C). Os resultados obtidos mostraram-se estatisticamente diferentes, tanto na análise individual dos fatores avaliados (Aa e temperaturas) quanto na interação destes ( $p < 0,01$ ).

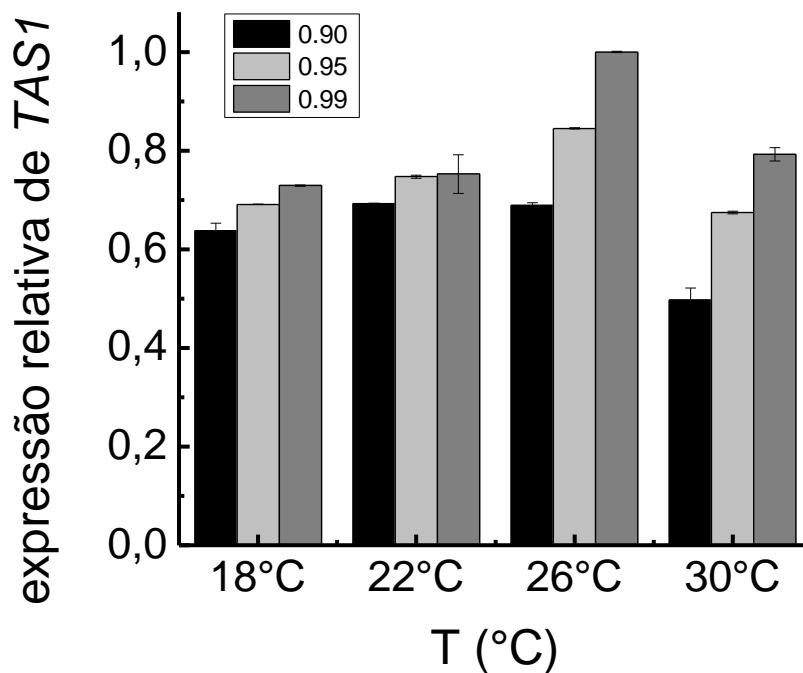


**Gráfico 5** – Efeito da atividade de água (Aa) e temperatura (°C) na taxa de crescimento radial de *E. sorghinum* (mm/dia).

### 5.6.2 Expressão do gene *TAS1*

Os resultados obtidos referente à validação do método empregado neste estudo mostraram-se satisfatórios. O gene alvo (*TAS1*), bem como o gene de referência (*TUB*), apresentaram eficiência dentro dos parâmetros estabelecidos (90 a 110%), apresentando *slopes* de -3,19 e -3,13, respectivamente (Figura A.10). As curvas de amplificação para ambos os genes se mostraram específicas, apresentando um pico único nas temperaturas de dissociação de 85,2 °C para  $\beta$ -tubulina e 80,3 °C para *TAS1*.

A cepa de *E. sorghinum* foi capaz de expressar o gene *TAS1* em todas as condições avaliadas, em faixas de temperaturas e Aa que variaram de 18 a 30 °C e de 0,90 a 0,99, respectivamente (Gráfico 6). Entretanto, o maior nível de expressão foi também observado na condição de 26 °C e 0,99 Aa. Os menores níveis de expressão relativa de *TAS1* foram observados no mais baixo nível de Aa (0,90) e em todas as temperaturas analisadas, com destaque para interação 0,90 Aa e 30 °C, a qual reduziu em aproximadamente 50% o nível de expressão de *TAS1*.



**Gráfico 6** – Efeito da atividade de água (Aa) e temperatura (°C) na expressão relativa do gene *TAS1* em *E. sorghinum*.

### 5.6.3 Produção de enzimas extracelulares

Foi possível observar diferentes perfis na produção de enzimas extracelulares da cepa de *E. sorghinum* quando cultivada sobre diferentes temperaturas (Figura 9). Um total de cinco enzimas foi produzido, sendo elas: fosfatase alcalina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase,  $\alpha$ -glucosidase e N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase. Estas enzimas foram produzidas conjuntamente, em nota 2 (10 nanomoles de substrato hidrolisado), apenas na temperatura de 22 e 26 °C (Figura 9). Quando a cepa foi cultivada na temperatura de 18 °C, duas enzimas deixaram de ser produzidas, sendo elas: fosfatase alcalina e N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase. Entretanto, nesta temperatura, foi possível observar aumento no nível de produção das enzimas fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase (nota 3 – 20 nanomoles de substrato hidrolisado). Já na condição de cultivo sob a temperatura de 30 °C, a produção das enzimas naftol-AS-BI-fosfohidrolase e  $\alpha$ -glucosidase foi inibida.

Além disso, foi possível observar que a cepa de *E. sorghinum* produziu pigmentos em resposta ao estresse térmico. A produção de pigmento, de coloração vermelha, foi intensificada quando a cepa foi cultivada na temperatura de 18 °C. Entretanto, houve diminuição e até inibição da produção deste pigmento, quando o cultivo da cepa foi realizado em temperaturas superiores, como 22, 26 e 30 °C (Figura 9).

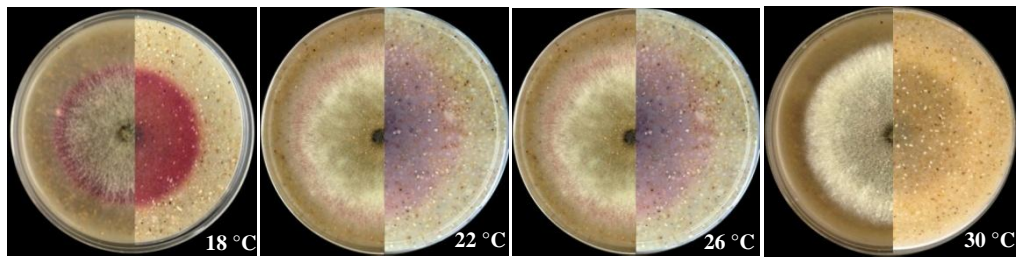
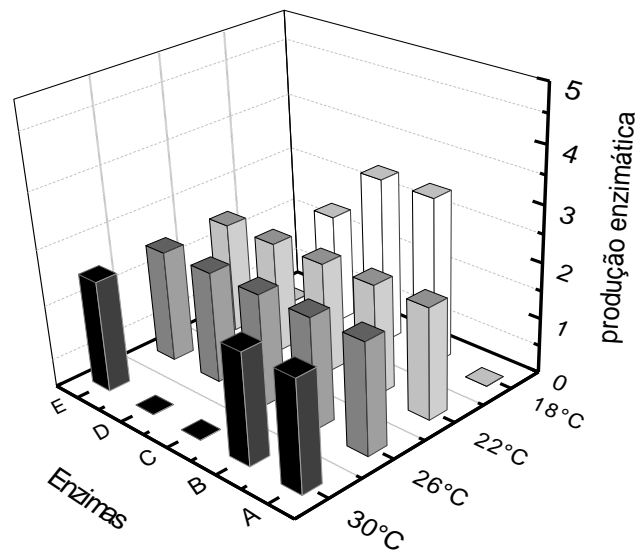


Figura 9 - Efeito da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) na produção de enzimas extracelulares e pigmentos de *E. sorghinum*. A) fosfatase alcalina; B) fosfatase ácida; C) naftol-AS-BI-fosfohidrolase; D)  $\alpha$ -glucosidase; E) N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase.

## 6 DISCUSSÃO

Ao observarmos o desenvolvimento da cultura de sorgo granífero no Brasil, nota-se que na última década os valores de área plantada, como também da produção deste cereal, quadruplicaram. Embora ainda seja considerada uma cultura marginal, o sorgo se estabeleceu no mercado nacional de grãos sendo considerado, pela agroindústria, a principal fonte alternativa na composição energética de rações. Sendo assim, acessar os aspectos micotoxicológicos relacionados a esta cultura é de fundamental importância para obter grãos com qualidade satisfatória ao consumo humano e animal.

Durante o desenvolvimento desta cultura no campo, os grãos, agrupados em uma estrutura denominada de panícula, permanecem naturalmente expostos a diversas condições ambientais, principalmente, no período entre a floração e a colheita (maturação fisiológica). De acordo com Bandyopadhyaya et al. (2000), caso condições de alta umidade ocorram durante este período o emboloramento dos grãos torna-se a principal desordem biótica que afeta a produção e o desenvolvimento desta cultura.

Mais de 40 gêneros fúngicos já foram relatados em associação a esta desordem. Muitos destes comportam-se como saprófitas e não causam danos diretos aos grãos, entretanto, diversos fungos toxigênicos são capazes de produzir micotoxinas, as quais podem comprometer substancialmente a qualidade dos grãos destinado à alimentação (BANDYOPADHYA et al., 2000).

Em nosso estudo, ao analisarmos a micobiota de 200 amostras de grãos de sorgo durante o desenvolvimento destes no campo e em duas safras diferentes (verão e outono), constatamos a presença de 10 gêneros fúngicos, destacando na ordem decrescente de frequência, os gêneros *Phoma*, *Curvularia* e *Fusarium*. Todos os fungos isolados neste estudo estão de acordo com aqueles já reportados em associação aos grãos de sorgo em diversas regiões do mundo, tais como: Brasil (REIS et al., 2010; SILVA et al., 2000); Argentina (GONZÁLEZ et al., 1997); Estados Unidos (PROM et al., 2015) e África Central (RATNADASS et al., 2003).

A distribuição destes gêneros durante o desenvolvimento dos grãos de sorgo mostrou-se heterogênea. A menor porcentagem de contaminação fúngica foi observada no estágio de grão leitoso e em ambas as safras. Este fato pode ser explicado pela composição química dos grãos em estágio inicial de desenvolvimento. Sabe-se que neste estágio há maior concentração de compostos fenólicos nos grãos e estes, possuem a capacidade de inibir o crescimento fúngico (RING; WANISKA; ROONEY, 1988). Embora em baixa frequência, *Aspergillus* seção *Flavi*, *Nigrospora* spp., *Epicoccum sorghinum*, e *Curvularia* spp., apresentaram-se



como os principais fungos contaminantes neste estágio inicial de maturação. O isolamento de *Aspergillus* seção *Flavi* nas amostras de grão leitoso oriundos da safra de outono pode estar relacionado aos altos índices de Aa e umidade relativa do ar encontrados, tendo em vista que Aa de 0,98 é considerada ótima para crescimento de *Aspergillus* pertencente à seção *Flavi* (ASTORECA et al., 2012). Embora *A. flavus* seja a principal espécie produtora de aflatoxinas, a reduzida frequência de isolamento observada neste estudo demonstra baixo risco de contaminação por esta micotoxina no período de pré-colheita.

A partir do estágio de grão leitoso, *E. sorghinum* apresentou-se como a principal espécie contaminante em ambas as safras avaliadas, exibindo frequência crescente de isolamento no decorrer do desenvolvimento dos grãos. De acordo com Magan e Medina (2016), o sucesso na competição de um determinado microrganismo pode estar relacionado com a tolerância deste a fatores ambientais, taxa de germinação, crescimento micelial, produção de enzimas extracelulares e metabólitos secundários. Neste contexto, Pazoutova (2009) afirma que *E. sorghinum* pode resistir, como um fungo de solo, a condições adversas, sendo capaz de manter o mesmo haplótipo entre uma safra e outra. Vale destacar que esta resistência a condições adversas pode estar associada à presença de clamidósporos pigmentados, estrutura microscópica, tipicamente encontrada em *E. sorghinum* e que de certa forma, proporcionam resistência a raios UV e podem contribuir no processo de colonização do fungo (LEE; PATRIARCA; MAGAN, 2015).

A elevada frequência de isolamento desta espécie também foi relatada por Silva et al. (2000), os quais, avaliando a microbiota de grãos de sorgo recém colhidos e armazenados no estado de São Paulo, relataram que *P. sorghina* foi o fungo mais isolado (57,1%). Em relação ao predomínio desta espécie nos estádios finais de maturação dos grãos, o estudo conduzido por Navi et al. (2005) apresentou comportamento semelhante ao observado em nossos achados. De acordo com os autores, *E. sorghinum* foi capaz de colonizar os grãos de sorgo em todos os estádios do seu desenvolvimento, da floração à maturação fisiológica e, interessantemente, requereu menor umidade para colonizá-los em estádios tardios (farináceo I e II). Em nosso estudo, as maiores frequências de isolamento de *E. sorghinum* também foram observadas em estágio de maturação fisiológica, tendo ocorrido em maior frequência nos grãos oriundos da safra de outono, período marcado por menor umidade, baixos níveis de Aa (0,55) e por apenas 20% de dias chuvosos (Tabela 5). Sendo assim, vale destacar que a capacidade de resistir a condições de stress hídrico parece ser um fator importante na predominância desta espécie, frente a outras presentes na microbiota dos grãos de sorgo.

Diante da elevada frequência de *E. sorghinum* encontrada nas amostras de grãos de sorgo coletadas em nosso estudo, decidimos investigar a presença de AT, citado na literatura como um dos metabólitos tóxicos produzidos pela espécie. Além disso, decidimos avaliar a influência de fatores abióticos na produção do metabólito, nas duas safras estudadas (verão e outono). Foi possível observar que condições quentes e úmidas foram favoráveis à produção de AT. Assim sendo, os maiores valores médios de AT nos grãos foram detectados na safra de verão (587,8 µg/kg), quando a temperatura média foi de 26,3 °C e os níveis de Aa permaneceram altos durante todo o período de maturação dos grãos (0,90 a 0,96). Esta combinação de fatores, temperatura elevada e maior porcentagem de dias chuvosos, parecem ser essenciais para estimular a produção de AT por *E. sorghinum*.

Visando correlacionar a presença de *E. sorghinum* com a ocorrência de AT observada em nosso estudo, avaliamos o potencial toxigênico de 12 cepas isoladas das amostras de grãos de sorgo. Os experimentos revelaram a presença de AT na totalidade das cepas analisadas, em níveis que variaram de 98,6 a 148.000 µg/kg. Vale destacar que este é o primeiro relato sobre a ocorrência de AT, produzido por *E. sorghinum*, em grãos de sorgo cultivados no Brasil.

A contaminação de alimentos por AT tem recebido considerável atenção da comunidade científica nos últimos anos. Em 2011, em um parecer emitido pela *European Food Safety Authority* (EFSA), relacionado ao risco da presença de toxinas produzidas por *Alternaria* spp. em alimentos e rações. Os autores relataram a necessidade de investigações quanto aos aspectos toxicológicos e a ocorrência da AT em alimentos, tendo em vista os relatados de efeitos tóxicos causados pela exposição da toxina a aves e ratos. Posteriormente, o *Codex Committee on Contaminants in Food*, em discussão sobre a presença de micotoxinas em sorgo, alertou para a ocorrência de *E. sorghinum* neste grão, recomendando investigações relacionadas à produção de toxinas pela espécie, principalmente, por sua associação com a desordem hemorrágica em humanos.

Comparando a quantidade de relatados relacionados à ocorrência de aflatoxinas, fumonisinas e tricotecenos em alimentos, as informações sobre contaminações por AT são incipientes. Entretanto, esta toxina já foi relatada em diversos substratos. Lohrey et al. (2013), avaliando 30 amostras de produtos a base de tomate e pimenta, detectaram AT em sua totalidade, em níveis que variaram de 3 a 2.330 µg/kg. Em 43 amostras de cerveja, Siegel et al. (2010), detectaram AT em 37 delas, com média de 11 µg/kg. Asam et al. (2013), confirmaram a presença de AT em erva-doce (860 a 1.500 µg/kg), goji berries (760 a 1.040 µg/kg), grãos de sorgo (105 a 670 µg/kg) e em alimento infantil a base de sorgo (130 a 1.200 µg/kg).

Embora a ocorrência desta toxina tenha sido relatada em alimentos e bebidas em diversos países, atualmente, nenhuma legislação em vigor no mundo apresenta limites máximos para o AT. EFSA (2011) sugeriu que o limiar toxicológico do AT seja de 1,5 µg/kg p.c./dia. Entretanto, de acordo com Asam e Rychlik (2013), este valor deve sofrer alterações com o advento de informações toxicológicas pois, o atual limiar sugerido foi embasado na exposição da toxina a adultos, excluindo-se crianças e também os animais. Do ponto de vista de controle das micotoxinas, a criação de leis que limitam a presença destes compostos tóxicos nos alimentos é uma ferramenta eficaz na segurança alimentar. Em nosso país, a portaria da ANVISA RDC nº 7, liberada em fevereiro de 2011, adicionou diversas micotoxinas e seus respectivos limites máximos toleráveis em alimentos e grãos. Entretanto, o controle de micotoxinas no sorgo ainda não está estabelecido em nossa legislação, diferentemente de outros países que já assumiram a importância desse grão, e estipularam limites de tolerância para fumonisinas, zearalenona e aflatoxina. Informações corretas e confiáveis sobre a contaminação fúngica e por micotoxinas no sorgo certamente servirão de subsídios para os órgãos governamentais brasileiros também incluírem limites de tolerância para este grão.

A contaminação de grãos por micotoxinas é considerado um problema de saúde pública em todo o mundo. Além de apresentar efeitos nocivos à saúde humana e animal, grandes perdas econômicas podem ser ocasionadas devido à condenação destes grãos pelos limites regulamentares existentes no mercado. Uma das principais ferramentas que auxiliam no controle destas micotoxinas é conhecer o agente de maneira robusta, empregando técnicas de identificação rápida e confiáveis que possam discriminar adequadamente as espécies toxigênicas.

Neste contexto, tendo em vista a grande dificuldade taxonômica relacionada ao gênero *Phoma*, pela ampla variabilidade nas características morfológicas e similaridade fenotípica com gêneros relacionados, pesquisadores do CBS sugerem o emprego do conceito polifásico na identificação das espécies do gênero (AVESKAMP et al. 2010). Sendo assim, decidimos empregar a identificação polifásica utilizando as características fenotípicas, genéticas, e metabólicas dos isolados de *E. sorghinum*. Este é o primeiro trabalho realizado no Brasil utilizando o estudo polifásico na identificação de *Epicoccum sorghinum* isolados de grãos de sorgo.

A partir do sequenciamento parcial da região ITS do rDNA de fragmentos dos genes da β-tubulina e actina, foi possível confirmar que os 65 isolados pertenciam à espécie *Epicoccum sorghinum*. Entretanto, quando as sequências de ITS desses isolados foram submetidas ao

alinhamento no banco de dados *GenBank* (NCBI), sequências de DNA da espécie *Coniothyrium fuckelii* apresentava-se com a maior similaridade (97%) a sequências de DNA dos isolados investigados. Este fato pode ser explicado pela escassez de dados referentes às sequências de ITS da espécie *E. sorghinum*, ou até mesmo inconsistência no banco de dados referente a *Coniothyrium fuckelii*. Acreditamos que o depósito das nossas sequências no referido banco de dados agora pode auxiliar na identificação acurada de *E. sorghinum*, uma vez que não há inconsistências quanto a sua verdadeira identidade.

Em estudos anteriores, Aveskamp et al. (2009) utilizando análise filogenética através de sequências da região ITS, fragmentos dos genes da  $\beta$ -tubulina e da actina, com a finalidade de compreender a taxonomia da seção *Peyronellaea*, observaram alta variabilidade intraespecífica de 13 cepas de *P. sorghina*. Nossos resultados vem ao encontro dos achados desses autores e revelaram, através de análise filogenética, a presença de quatro espécies filogeneticamente distintas. Pazoutova (2009), avaliando isolados de *E. sorghinum* oriundos do Texas (EUA) e da África, confirmou considerável variabilidade intraespecífica utilizando sequências da região ITS. A autora concluiu que, devido à limitação de informações genéticas, os isolados pertencem a mesma espécie em questão e comportam-se de forma ubíqua e cosmopolita. Outra possibilidade sugerida pela autora é a possível existência de subespécies ainda não identificadas. Com o advento da biologia molecular e com o uso das ferramentas de bioinformática mais aprimoradas, podemos observar que esse evento ocorre em vários gêneros de fungos, a exemplo de *Fusarium* e *Aspergillus*.

Embora a presença de espécies filogenéticas tenha sido confirmada em nosso estudo, nenhum marcador morfológico se mostrou único entre elas, sinalizando não ser possível utilizar apenas características fenotípicas para discriminação deste complexo de espécies dada tamanha heterogeneidade morfológica entre os isolados. De maneira geral, os valores do diâmetro das colônias apresentaram-se dentro da faixa descrita na literatura, entre 5 a 7 cm em AA e entre 5 a 8 em MEA, exceto para cepa USPMTOX 54, a qual apresentou diâmetro de 4 cm em AA. A textura, bem como a coloração do micélio e a produção de pigmento, mostraram-se compatíveis com as características descritas para a espécie. Apenas a presença de exsudatos incolores ainda não havia sido relatada, com 23 das 65 cepas produzindo-os. Em relação às estruturas micromorfológicas, nossos achados estão de acordo com as características observadas para espécie, descritas no compêndio de Boerema et al. (2004).

Através da avaliação dos perfis de enzimas extracelulares produzidos pelas cepas de *E. sorghinum* foi possível verificar que as mesmas apresentaram padrões, qualitativamente e quantitativamente, iguais. Sendo assim, não foram eficientes para definir as espécies

filogenéticas encontradas. Entretanto, do ponto de vista fitopatológico, estas enzimas participam ativamente no processo de colonização e infecção das células do hospedeiro, degradando substâncias presentes nas camadas externas ou afetando diretamente o protoplasto (PASCHOLATI, 1995). Das 19 enzimas avaliadas, 5 foram produzidas por todas as cepas de *E. sorghinum*, sendo elas: esterase (C4), esterase lipase, fosfatase ácida, naphthol-AS-BI fosfohidrolase e N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase.

Esterase e esterase lipase são enzimas importantes na quebra das ligações ésteres, que ligam os monômeros de ácidos graxos formadores da cutina. De acordo com Pascholati (1995), a produção de cutinases por fungos fitopatogênicos pode estar relacionada com a penetração da superfície intacta da planta, o que se constitui, um fator chave na patogenicidade. Já as enzimas fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase degradam compostos fósforo-orgânicos, como aqueles que podem estar presentes na camada lipídica da membrana plasmática das células vegetais (PERES et al., 2000). De acordo com Sahai e Manocha (1993), a enzima N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase é conhecida por apresentar atividade quitinolítica. Assim sendo, a quitina, constituinte importante da parede celular fúngica, pode ser degradada através desta enzima, sendo possível sugerir que *E. sorghinum* pode apresentar habilidade antagônica frente a outros gêneros fúngicos.

A habilidade em produzir AT foi também um critério utilizado para avaliar as espécies filogenéticas encontradas. Representantes dos 4 grupos filogeneticamente distintos foram selecionados para o estudo (n=12). Todas as cepas de *E. sorghinum* produziram AT, entretanto, foi possível observar considerável variabilidade nos níveis produzidos pelas mesmas. Comparativamente, as cepas reunidas no grupo I e III produziram baixos níveis de AT (< 900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Já aquelas presentes no grupo IV, apresentaram níveis médios de produção (< 4.100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e aquelas que compõem o principal grupo (II), produziram altos níveis de AT (< 148.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Sendo assim, a avaliação do perfil de produção de AT das cepas de *E. sorghinum* se mostrou útil ao definir perfis distintos de produção de AT, os quais se relacionam claramente com as espécies filogenéticas encontradas.

Em estudos conduzidos por Fávoro et al. (2011) e Kilpatrick e Chilvers (1981) os autores observaram elevada variabilidade morfológica e genética em isolados de *E. nigrum* e *Epicoccum purpurascens*. De acordo com os autores, a presença de cepas heterocarióticas ocorridas devido à anastomose entre tubos germinativos, pode ser responsável pela elevada diversidade observada no gênero e também pode estar relacionada à resistência em condições adversas. Sendo assim, a avaliação aprofundada desta hipótese para a espécie *E. sorghinum* poderá explicar a grande variabilidade encontrada neste estudo.

Sabe-se que entre os fatores abióticos que influenciam o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas, a atividade de água (Aa) e a temperatura merecem destaque (HURST, 2001). De acordo com Almeida et al. (2005) além destes importantes fatores, a precipitação pluvial influencia diretamente no nível de contaminação fúngica, bem como na potencialidade toxigênica destas cepas. Neste sentido, estudos conduzidos durante as últimas duas décadas têm gerado valiosas informações relacionadas aos efeitos de fatores abióticos (pH, temperatura e Aa) na germinação, no crescimento e na produção de toxinas por fungos (MAGAN; MEDINA, 2016). Entretanto, escassos são os relatos que definem as melhores condições abióticas para o desenvolvimento de *E. sorghinum* e inexistentes aqueles que abordam os aspectos metabólicos.

Em nosso estudo, observamos que a espécie *E. sorghinum* foi capaz de colonizar, infectar, produzir toxina ou ao menos se manter viável nos grãos de sorgo em uma ampla faixa de Aa e temperatura. Os níveis de Aa variaram de 0,55 a 0,98 e as temperaturas mínima e máxima registradas foram de 14 e 36,7 °C, respectivamente. Desta maneira, a fim de estabelecer as condições ótimas para o desenvolvimento de *E. sorghinum*, realizamos um estudo ecofisiológico, no qual avaliou a taxa de crescimento micelial, expressão do gene *TSAI* e produção de enzimas extracelulares, utilizando condições em laboratório semelhantes às aquelas encontradas durante as duas safras (verão e outono).

Em concordância com os resultados obtidos no campo, *E. sorghinum* apresentou melhor desempenho fisiológico em condições quentes e úmidas. A condição ótima para o crescimento e expressão do gene *TSAI* foi observada na temperatura de 26 °C e Aa de 0,99, condições semelhantes às aquelas ocorridas durante a safra verão, a qual apresentou temperatura média de 26 °C e altos níveis de Aa (0,90 a 0,96). Tais condições assemelham-se às consideradas ideais para o crescimento dos principais fungos toxigênicos que variam entre 25 e 30 °C, embora algumas espécies do gênero *Aspergillus* se desenvolvam mais rapidamente em temperaturas acima dos 30 °C. No único relato encontrado na literatura, Schémaeza et al. (2013) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas (22, 28, 32, 36 e 40 °C) no crescimento de *E. sorghinum*. Segundo os autores, a maior taxa de crescimento ocorreu a 28 °C sendo que a partir de 36 °C não houve crescimento fúngico.

Os resultados dos estudos ecofisiológicos da espécie *E. sorghinum* na presente investigação, assemelham-se aos obtidos com *Alternaria alternata*, principal fungo produtor de AT. Lee et al. (2015), revisando estudos sobre a fisiologia do gênero *Alternaria*, relataram que as condições ideais para a produção da toxina são 0,98 de Aa e temperatura na faixa de 25 a 30 °C. Estudo realizado por Prendes et al. (2017), avaliando o efeito da temperatura e

Aa no crescimento e produção de toxinas de *A. alternata*, revelou que os maiores níveis de AT foram obtidos a 25 °C e Aa de 0,99. Por sua vez, Oviedo et al. (2009), utilizando cepas de *A. alternata* cultivadas em meio a base de soja, verificaram os maiores níveis da toxina em temperatura de 25 e 30 °C. Sendo assim, a similaridade dos fatores abióticos (temperatura e umidade) para a produção da toxina, para ambos os fungos, pode contribuir para o melhor controle desta toxina no substrato.

Através do emprego da técnica de sequenciamento de nova geração (Illumina HiSeq) neste estudo, foi possível apresentar o genoma (*de novo*) do fungo *E. sorghinum* com tamanho de 33.4 Mbp. Este valor encontra-se próximo àqueles encontrados para fungos correlatos, tais como: *Phoma herbarum* (39.2 Mpb) e *Ascochyta rabiei* (34.6 Mpb) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2017).

Concluindo, este foi o primeiro estudo brasileiro a detectar a presença de ácido tenuazônico em grãos de sorgo e também relacionar a presença do fungo *E. sorghinum* como fator determinante para esta contaminação. Encontramos considerável variabilidade intraespecífica entre as cepas de *E. sorghinum* isoladas no Brasil, apresentando-se em um complexo de espécies filogenéticas. Através da investigação de fatores abióticos ocorridos no campo, bem como em condições de laboratório, demonstramos que o risco de contaminação dos grãos de sorgo por *E. sorghinum*, e consequente produção de AT, aumenta consideravelmente em condições que apresentam temperatura precipitação elevadas. Os achados da presente investigação alertam para a presença de compostos tóxicos em grãos de sorgo cultivados no país, bem como contribuem para melhorias no manejo dessa cultura, como a indicação do plantio em épocas que apresentem menor precipitação durante a maturação dos grão.

## 7 CONCLUSÕES

Através da realização deste estudo, conclui-se que:

- *Epicoccum sorghinum* foi a espécie mais isolada nas amostras de grãos de sorgo, com destaque a elevada e crescente frequência de isolamento a partir do estágio de grão pastoso, especialmente durante a safra de outono.
- A maior frequência de isolamento de *E. sorghinum* nos grãos oriundos da safra outono, parece estar relacionada com a capacidade desta espécie em tolerar condições de estresse hídrico, uma vez que esta espécie foi capaz de, ao menos, se manter viável em baixos níveis de Aa dos grãos.
- Com relação a habilidade toxigênica de *E. sorghinum*, constatou-se que todas as cepas avaliadas foram produtoras de AT, confirmando sua importância para a ocorrência de AT em grãos de sorgo.
- O ácido tenuazônico foi detectado em todos os estágios de maturação dos grãos, concordando com o comportamento crescente da frequência de *E. sorghinum* durante o desenvolvimento dos grãos.
- A maior ocorrência desta toxina foi observada em grãos oriundos da safra verão. Este fato está associado a maior umidade, altos níveis de Aa e a temperatura elevada ocorridos durante este período.
- A abordagem polifásica utilizada neste estudo foi essencial para confirmar a variabilidade intraespecífica das cepas de *E. sorghinum* isoladas no Brasil, sendo possível defini-las como pertencentes a um complexo de espécies filogenéticas.
- O genoma (*de novo*) da espécie *E. sorghinum* apresentou tamanho de 33.4 Mbp e presença do gene responsável pela biossíntese do ácido tenuazônico (*TASI*) foi confirmada.
- As condições ótimas de temperatura e Aa encontradas para o crescimento, expressão do gene *TASI* e produção de enzimas extracelulares de *E. sorghinum*, concordam nitidamente com aquelas ocorridas no campo durante a safra verão, evidenciando que condições climatológicas marcadas por temperaturas elevadas e alta umidade, apresentam-se mais favoráveis a ocorrência de AT.
- *Epicoccum sorghinum* apresenta-se naturalmente associado aos grãos de sorgo e deve ser considerado um agente importante na contaminação destes grãos por AT. O cultivo deste cereal durante períodos com menor precipitação e temperaturas amenas parece ser uma ferramenta eficaz e de baixo custo para o controle desta micotoxina. Além disso, pesquisas na



área de toxicologia se mostram necessárias, a fim de avaliar os riscos, principalmente aos animais confinados, que a exposição a esta toxina podem apresentar.

## REFERÊNCIAS \*

- AHMED, N. E. et al. Fungi associated with stored sorghum grains and their effects on grain quality. **Life Sciences International Journal**, v. 2, n. 3, p. 723–729, 2008.
- ALMEIDA, A. P. et al. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 1, p. 1–9, 2005.
- ALVES DOS REIS, T. et al. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 9, p. 1445–1451, 30 abr. 2010.
- ANAHOSUR, K. H.; PATIL, S. H. Effect of date of sowing on the incidence of Ergot of sorghum. **Indian Phytopathology**, v. 35, n. 3, p. 507–509, 1982.
- ASAM, S. et al. Development of analytical methods for the determination of tenuazonic acid analogues in food commodities. **Journal of Chromatography A**, v. 1289, p. 27–36, maio 2013.
- ASAM, S.; RYCHLIK, M. Potential health hazards due to the occurrence of the mycotoxin tenuazonic acid in infant food. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 3, p. 491–497, 2013.
- ASTORECA, A. et al. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 60–67, 1 maio 2012.
- AVESKAMP, M. M. et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. **Mycologia**, v. 101, n. 3, p. 363–382, 2009.
- AVESKAMP, M. M. et al. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Mycology**, v. 65, p. 1–60, 2010.
- BANDYOPADHYAY, R. et al. Sorghum Grain Mold: Through the 1990s into the New Millennium. In: **Sorghum and Millets Diseases**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2002. p. 171–183.
- BANDYOPADHYAY, R.; CHANDRASHEKAR, A.; HALL, A. J. **Technical and institutional options for sorghum grain mold management: proceedings of an international consultation**. Parancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2000.
- BERENGUER, M. ; FACI, J. . Sorghum (*Sorghum Bicolor* L. Moench) yield compensation processes under different plant densities and variable water supply. **European Journal of Agronomy**, v. 15, n. 1, p. 43–55, set. 2001.
- BERJARK, P. Report of the Seed Storage Committee-Working Group on the effects of storage fungi on seed viability. **Seed science and technology**, v. 12, p. 233–253, 1984.
- BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical immunology**, v. 81, p. 167–206, 2002.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOEREMA, G. H. et al. **Phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture.** Wallingford: CABI, 2004.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas.** 5. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005.

BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: SINHA, K. K.; BHATNAGAR, D. (Eds.). . **Mycotoxins in agriculture and food safety.** [s.l.] CRC, 1998. p. 520.

CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. Differences in eukaryotic ribosomes detected by the selective action of an antibiotic. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 319, n. 2, p. 209–215, ago. 1973.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION 2012. **CODEX.** Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf6/cf06\\_14e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf6/cf06_14e.pdf)>. Acesso em: 6 mar. 2017.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **CONAB.** Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_06\\_11\\_09\\_00\\_38\\_boletim\\_graos\\_junho\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_11_09_00_38_boletim_graos_junho_2015.pdf)>. Acesso em: 6 mar. 2017.

DA SILVA, J. B. et al. Mycoflora and Occurrence of Aflatoxin B 1 and Fumonisin B 1 during Storage of Brazilian Sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4352–4356, 2000.

DANCEY, C. P.; REIDY, J. Análise de correlação: o r de Pearson. In: **Estatística sem matemática para psicologia.** Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 178–226.

DE GRUYTER, J. et al. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. **Mycological Research**, v. 113, n. 4, p. 508–519, abr. 2009.

DE GRUYTER, J. **Revised taxonomy of *Phoma* and allied genera.** [s.l.] Wageningen University, Wageningen, Holanda, 2012.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of clinical fungi.** 2. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.

DE WET, J. M. J. Systematics and Evolution of Sorghum Sect. Sorghum (Gramineae). **American Journal of Botany**, v. 65, n. 4, p. 477, abr. 1978.

DICKO, M. H. et al. Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 384–395, 2006.

DOGGETT, H. Disruptive Selection in Crop Development. **Nature**, v. 206, n. 4981, p. 279–280, 17 abr. 1965.

EMBRAPA.EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Expansão Potencial da Produção de Sorgo Granífero no Brasil no Sistema de Rotação com Soja Considerando o Zoneamento de Risco Climático 2015/16.** Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140133/1/bol-125.pdf>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food.** Disponível

em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.2407>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

FÁVARO, L. C. et al. Polyphasic analysis of Intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e14828, 11 ago. 2011.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the Comparative Method. **The american naturalist**, v. 125, n. 1, p. 1–15, 1985.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

FORBES, G. A.; BANDYOPADHYAY, R.; GARCIA, G. A review of sorghum grain mold. In: **Sorghum and millets diseases: a second world review**. 1. ed. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1992. p. 265–272.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

GARBER, E. D. Cytotaxonomic studies in the genus *Sorghum*. **University of California Publications in Botany**, v. 23, p. 283–362, 1950.

GIAMBRONE, J. J.; DAVIS, N. D.; DIENER, U. L. Effect of tenuazonic acid on young chickens. **Poultry science**, v. 57, n. 6, p. 1554–1558, 1978.

GONZÁLEZ, H. H. L.; MARTÍNEZ, E. J.; RESNIK, S. L. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 35–41, 1997.

GROVE, W. B. **British stem- and leaf-fungi (Coelomycetes)**. 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1935.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. A Simplified Classification of Cultivated Sorghum. **Crop Science**, v. 12, n. 2, p. 172, 1972.

HURST, C. J. Introduction to environmental microbiology. In: HURST, C. J. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology, 2001. p. 1–5.

IUPAC. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 1699–1723, 1995.

KILPATRICK, J. A.; CHILVERS, G. A. Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 77, n. 3, p. 497–508, dez. 1981.

KONZEN, E. A.; ALVARENGA, R. C. **Fertilidade de solos: adubação orgânica**. CRUZ, J.C. (Ed.). Cultivo do milho. Sete Lagoas, 2008.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 150–63, jun. 2004.

LEBRUN, M. H. et al. Relationships between the structure and the phytotoxicity of the fungal toxin tenuazonic acid. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1, p. 77–84, 1988.

- LEE, H. B.; PATRIARCA, A.; MAGAN, N. *Alternaria* in Food: Ecophysiology, Mycotoxin Production and Toxicology. **Mycobiology**, v. 43, n. 2, p. 93–106, jun. 2015.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The fusarium laboratory manual**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.
- LIRA, M. **Considerações sobre o potencial do sorgo em Pernambuco**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-DID, 1981.
- LOHREY, L. et al. Large-Scale synthesis of isotopically labeled  $^{13}\text{C}_2$ -tenuazonic acid and development of a rapid HPLC-MS/MS method for the analysis of tenuazonic acid in tomato and pepper products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 114–120, 9 jan. 2013.
- MAGALHAES, P. C.; DURAES, F. O. M.; SCHAFFERT, R. E. **Fisiologia da planta de sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/484470>>. Acesso em: 3 mar. 2017.
- MAGAN, N.; MEDINA, A. Integrating gene expression, ecology and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species in relation to interacting environmental factors. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 5, p. 673–684, 2016.
- MAKUN, H. A. et al. Fungi and Some Mycotoxins Found in Mouldy Sorghum in Niger State, Nigeria. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 1, p. 5–17, 2009.
- MARLEY, P. S. et al. Sorghum Anthracnose and Sustainable Management Strategies in West and Central Africa. **Journal of Sustainable Agriculture**, v. 25, n. 1, p. 43–56, 2005.
- MERONUCK, R. A. et al. Tenuazonic Acid, a Toxin Produced by *Alternaria alternata*. **Applied Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 613–617, 1972.
- MONTES-BELMONT, R.; MÉNDEZ-RAMÍREZ, I.; FLORES-MOCTEZUMA, E. Relationship between sorghum ergot, sowing dates, and climatic variables in Morelos, Mexico. **Crop Protection**, v. 21, n. 10, p. 899–905, dez. 2002.
- MOSS, M. O. MYCOTOXINS. **Nutrition & Food Science**, v. 89, n. 5, p. 8–10, maio 1989.
- MURDOCK, G. P. **Africa : its peoples and their culture history**. [s.l.] McGraw-Hill, 1959.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Genome**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>>. Acesso em: 8 mar. 2017.
- NAVI, S. S. et al. Effects of wetness duration and grain development stages on sorghum grain mold infection. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 872–878, 2005.
- OLIVEIRA, R. C. et al. Enzymatic characterization of *Corynespora cassicola* isolates using the API-ZYM<sup>®</sup> system. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 3, p. 210–212, mar. 2013.
- OLIVETTI, M.; CAMARGO, A. ASPECTOS ECONÔMICOS E DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DO SORGO. **Inforações Econômicas**, v. 27, n. 1, p. 35–48, 1997.
- OVIEDO, M. S. et al. Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1186–1192, 2009.

- PASCHOLATI, S. F. Fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995. p. 365–392.
- PAŽOUTOVÁ, S. Genetic variation of *Phoma sorghina* isolates from southern Africa and Texas. **Folia Microbiologica**, v. 54, n. 3, p. 217–229, 2009.
- PERES, A. et al. Perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência Agropecuária**, v. 24, n. 1, p. 295–299, 2000.
- PITT, J. I. et al. **The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. nuts and oilseeds** *International Journal of Food Microbiology*, 1993.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3. ed. Boston, MA: Springer US, 2009.
- PRADO, H.; JORGE, J. A.; MENK, J. R. F. **Levantamento pedológico detalhado e caracterização físico-hídrico dos solos da Estação Experimental de Agronomia de Votuporanga (SP)**. 42. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1999.
- PRENDES, L. P. et al. Water activity and temperature effects on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Malbec wine grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 2, p. 481–492, fev. 2017.
- PROM, L. et al. Mycoflora Analysis of Hybrid Sorghum Grain Collected from Different Locations in South Texas. **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 10 jan. 2015.
- RATNADASS, A. et al. Sorghum head-bugs and grain molds in West and Central Africa: II. Relationships between weather, head-bug and mold damage on sorghum grains. **Crop Protection**, v. 22, n. 6, p. 853–858, jul. 2003.
- RING, A. S.; WANISKA, R. D.; ROONEY, L. W. Phenolic compounds in different sorghum tissues during maturation. **Biomass**, v. 17, n. 1, p. 39–49, 1988.
- ROSETT, T. et al. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 103. Metabolites of *Alternaria tenuis* auct; culture filtrate products. **The Biochemical journal**, v. 67, n. 3, p. 390–400, 1957.
- SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 317–338, 1993.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–25, jul. 1987.
- SCHÉMAEZA, B. et al. Effects of temperature and pH on mycelium growth of *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosch and Van Kesteren in vitro. **Pakistan journal of biological sciences : PJBS**, v. 16, n. 24, p. 2054–7, 15 dez. 2013.
- SERT, H. B.; SUMBUL, H. First report of leaf spot caused by *Phoma sorghina* on *Trifolium campestre* in Turkey. **Plant Pathology**, v. 54, n. 2, p. 249–249, abr. 2005.
- SHEPHARD, G. S. et al. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of

tenuazonic acid and related tetramic acids. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 566, n. 1, p. 195–205, 1991.

SHIGEURA, H. T.; GORDON, C. N. The biological activity of tenuazonic acid. **Biochemistry**, v. 2, n. 5, p. 1132–1137, 1963.

SIEGEL, D. et al. Quantification of the alternaria mycotoxin tenuazonic acid in beer. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 902–906, jun. 2010.

SILVA-LOBO, V. L. DA et al. Influência da adubação nitrogenada, época de plantio e aerosspos sobre a severidade da mancha de grãos em arroz de terras altas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 3, p. 110–115, set. 2011.

STEYN, P. S.; RABIE, C. J. Characterization of magnesium and calcium tenuazonate from *Phoma sorghina*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 12, p. 1977–1979, 1976.

STICKINGS, C. E. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 106. Metabolites of *Alternaria tenuis* auct.: the structure of tenuazonic acid. **The Biochemical journal**, v. 72, n. 2, p. 332–40, jun. 1959.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. **Commonwealth Mycol. Inst., Surrey, England**, p. 696, 1980.

TSUNECHIRO, A.; MARIANO, R. M.; MARTINS, V. A. Produção e preços de sorgo no Estado de São Paulo, 1991-2001. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 1, p. 15–24, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA Foreign Agricultural Service**. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>>. Acesso em: 6 mar. 2017.

VAQUERA, S.; PATRIARCA, A.; FERNANDEZ, V. Water activity and temperature effects on growth of *Alternaria arborescens* on tomato medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 136–139, 18 ago. 2014.

VENKATASUBBAIAH, P.; DYKE, C. G. VAN; CHILTON, W. S. Phytotoxic Metabolites of *Phoma sorghina*, a New Foliar Pathogen of Pokeweed. **Mycologia**, v. 84, n. 5, p. 715–723, 1992.

YEKELER, H. et al. Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 4, p. 492–497, 1 jul. 2001.

YUN, C.-S. et al. Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS–PKS hybrid enzyme. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–9, 2015.

## ANEXO A – FIGURAS

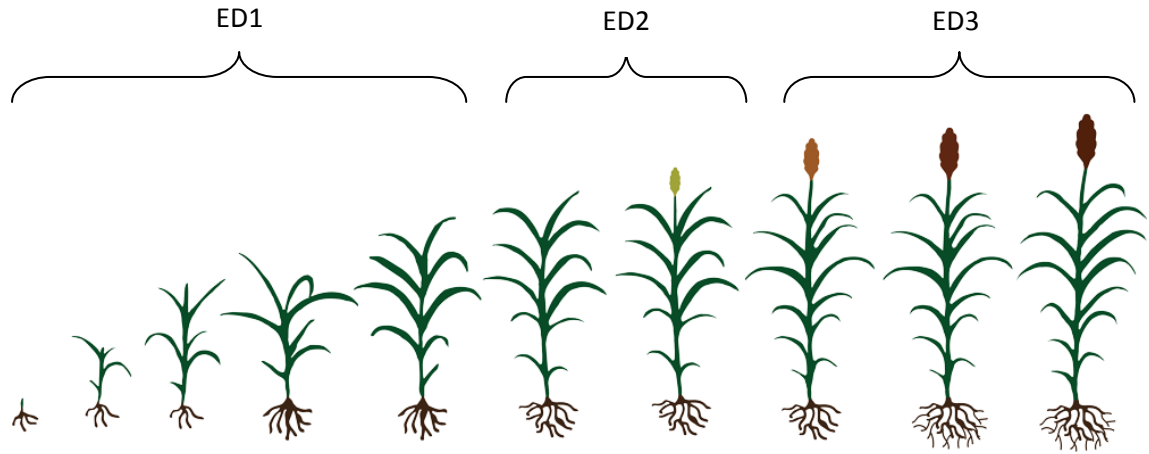


Figura A. 1: Estádios de desenvolvimento do sorgo.

Fonte: Adaptado de: Louisiana State University Research & Extension

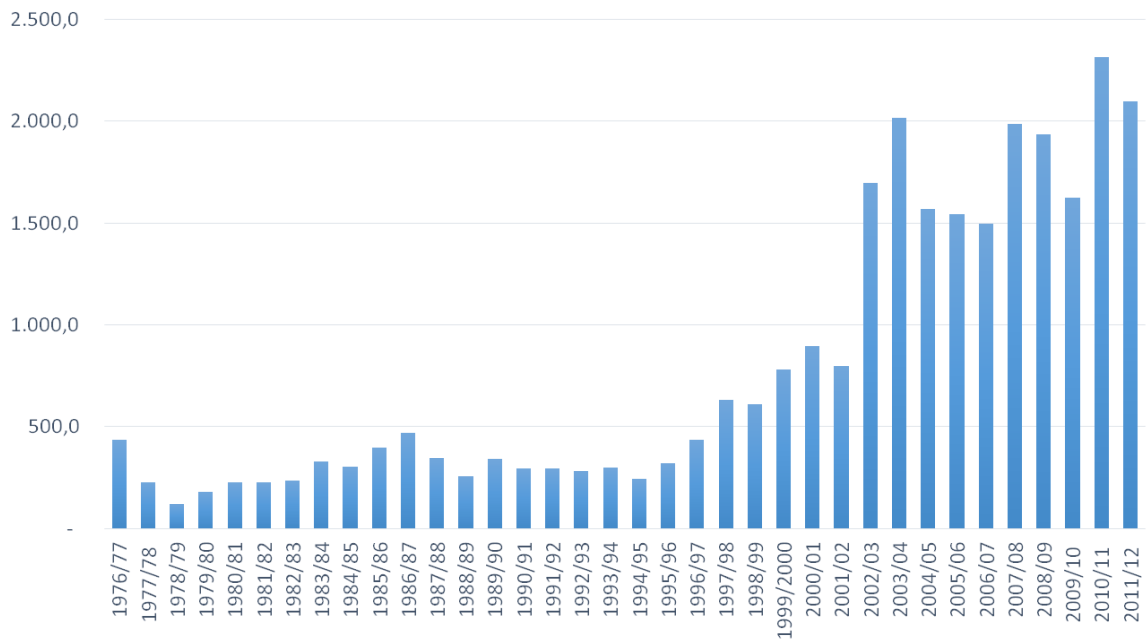


Figura A. 2: Crescimento da produção nacional de sorgo granífero (milhões de toneladas) entre as safras de 1976 a 2012.

Fonte: Grupo Pró-Sorgo



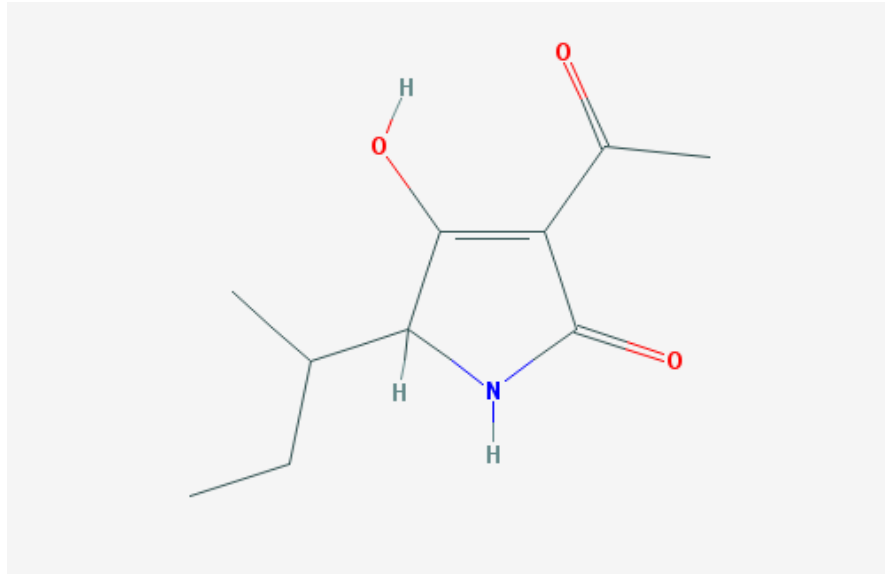


Figura A. 3: Estrutura química do ácido tenuazônico.  
Fonte: PubCHEM (2017).

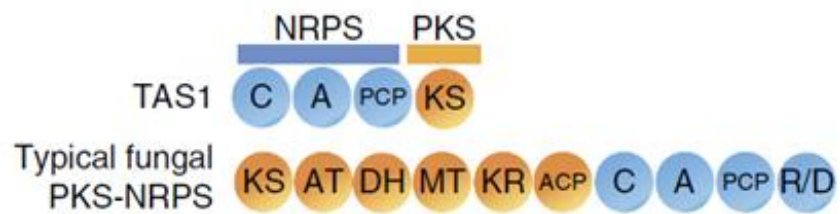


Figura A. 4: Estrutura dos domínios que compõem o gene *TAS1* (C: *condensation*; A: *adenylation*; PCP: *peptidyl carrier protein*; KS: *ketosynthase*).  
Fonte: Yun, et al. (2015).

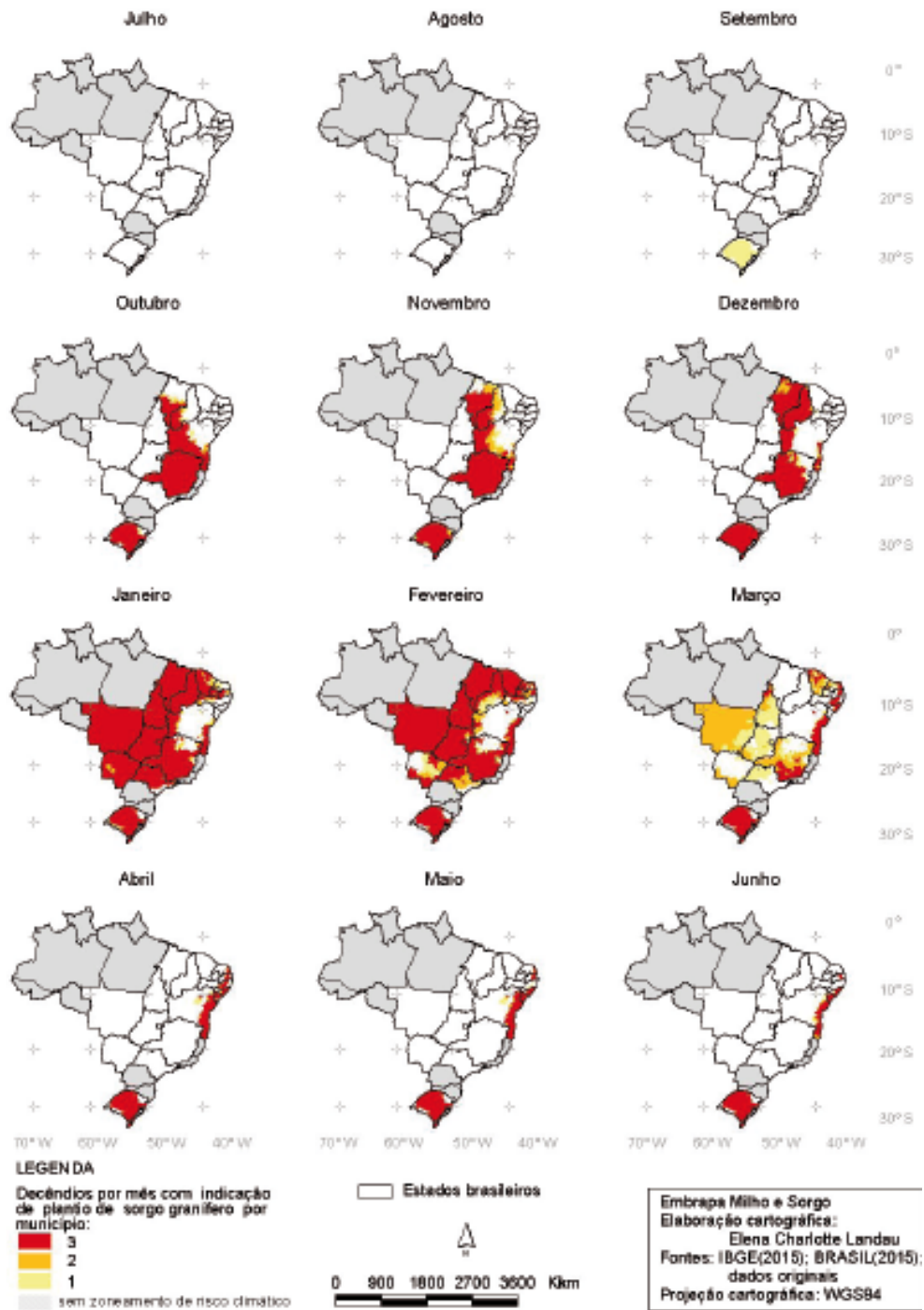


Figura A.5: Épocas climaticamente aptas para a semeadura de sorgo granífero no Brasil  
 Fonte: Embrapa (2015).

Incubação: \_\_/\_\_/\_\_

Leitura: \_\_/\_\_/\_\_ (7 dias)    Leitura: \_\_/\_\_/\_\_ (14 dias)

ISOLADO	MEIO DE CULTURA	DIÂMETRO	COR ANVERSO	COR REVERSO	TEXTURA	BORDA	PIGMENTO/COR/DIFUSÍVEL	EXUDATO/COR
	OA							
	OA							
	MEA							
	MEA							
	OA							
	OA							
	MEA							
	MEA							
	OA							
	OA							
	MEA							
	MEA							
	OA							
	OA							
	MEA							
	MEA							
	OA							
	OA							
	MEA							
	MEA							

Figura A.6: Ficha de caracterização macromorfológica de cepas de *Epicoccum sorghinum*.

solado: \_\_\_\_\_ Incubação: \_\_/\_\_/\_\_ Leitura: \_\_/\_\_/\_\_

**PICNÍDIO:**  
 Diâmetro: \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ Comprimento Cor: \_\_\_\_\_ Obs: multiplicar 2,5 pelo valor observado (objetiva 40 x)  
 Superfície: ( ) glabra ( ) pilosa ( ) cerdosa  
 Forma: ( ) globoso ( ) subgloboso ( ) ampuliforme ( ) irregular  
 Ostíolo: ( ) presente ( ) ausente - Colarinho: ( ) presente ( ) ausente  
 Obs: \_\_\_\_\_

**CONÍDIO:**  
 Diâmetro: \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ Comprimento Cor: ( ) hialino ( ) \_\_\_\_\_  
 Forma: ( ) elipsoidal ( ) ovóide-elipsoidal ( ) curvado  
 Septos: ( ) asspetado ( ) septado \_\_\_\_\_  
 Obs: \_\_\_\_\_

**CLAMIDÓSPORO:**  
 Diâmetro: \_\_\_\_\_ X \_\_\_\_\_ Comprimento  
 ( ) presente ( ) ausente ( ) unicelular ( ) multicelular ( ) solitário ( ) em cadeia  
 (curta e ou longas)  
 Forma: ( ) alternarióide ( ) globoso ( ) botrióide-alternarióide ( ) \_\_\_\_\_  
 Posição: ( ) intercalado ( ) terminal

Figura A.7: Ficha de caracterização micromorfológica de cepas de *Epicoccum sorghinum*.

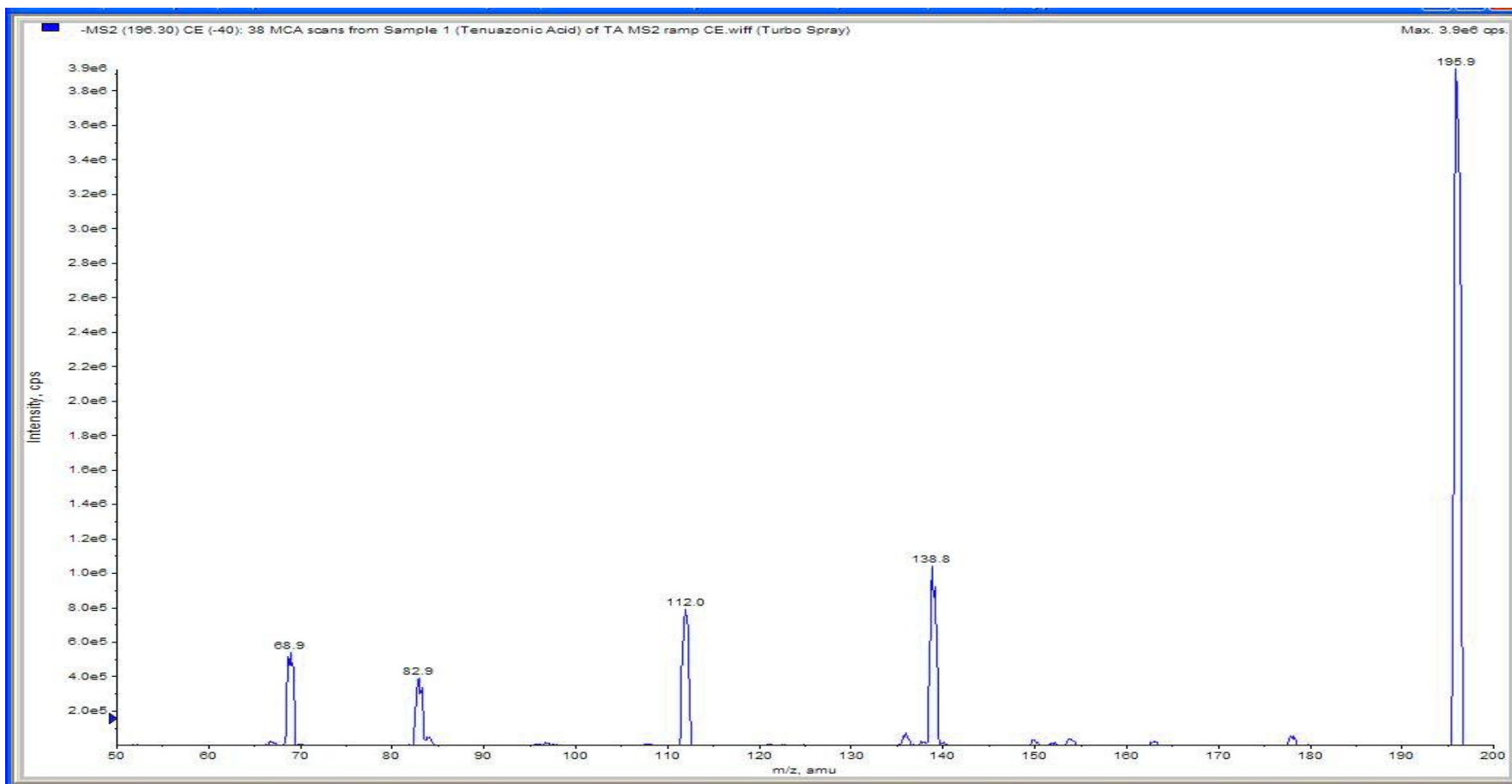


Figura A.8: Espectro (MS/MS) do padrão de ácido tenuazônico em modo de ionização electrospray negativa com suas estruturas de fragmentação.

## BLAST®

## Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/tblastx-2sequences/](#) Formatting Results - B57AXJFP114

[Formatting options](#)

[Download](#)

[Blast report description](#)

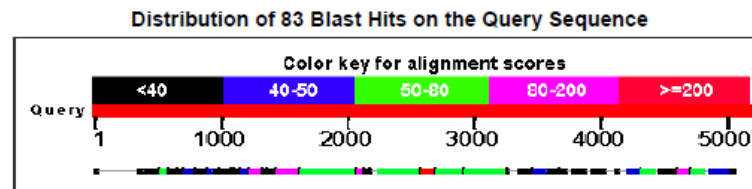
## Blast 2 sequences

mgr:MGG\_07803 D-alanine-poly(phosphoribitol)

RID [B57AXJFP114](#) (Expires on 02-05 07:37 am)

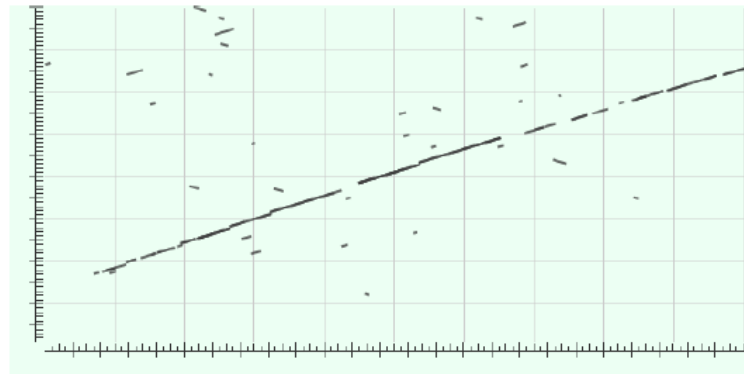
**Query ID** Icl|Query\_52657  
**Description** mgr:MGG\_07803 D-alanine-poly(phosphoribitol) ligase subunit 1 (N)  
**Molecule type** nucleic acid  
**Query Length** 5187

**Subject ID** Icl|Query\_52659  
**Description** Contig218 PSH.fasta.screen.ace.3 from 50000 to 58000  
[See details](#)  
**Molecule type** nucleic acid  
**Subject Length** 8001  
**Program** TBLASTX 2.3.1+

[Graphic Summary](#)[Dot Matrix View](#)

Plot of Icl|Query\_52657 vs Icl|Query\_52659

[2]

[Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	N	Accession
Contig218 PSH.fasta.screen.ace.3 from 50000 to 58000	257	3663	83%	0.0	Sumn22	Query_52659

Figura A.9: Confirmação, através da ferramenta *BLAST*, da presença do gene *TSA1* no genoma de *E. sorghinum*.

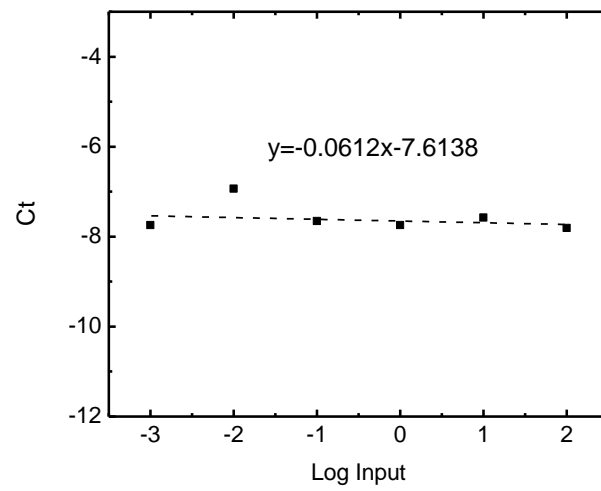
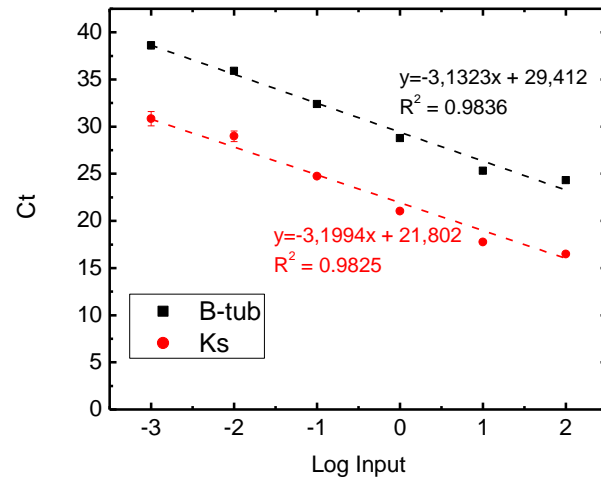


Figura A.10 – Gráfico da eficiência entre o gene alvo (*TSAI*) e controle endógeno ( $\beta$ -tubulina).

## ANEXO B - QUADROS

UF/Região	22/09 a 21/12			21/12 a 20/03			20/03 a 21/06			21/06 a 22/09		
	Primavera			Verão			Outono			Inverno		
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set
<b>Norte</b>												
TO			P	P	P	C	C	C				
<b>Nordeste</b>												
PI			P				C					
CE				P	P	P		C	C			
RN				P	P	P		C	C	C		
PB				P	P	P		C	C			
PE					P	P	P	P	C	C	C	C
BA		P	P	P		C	C	C				
<b>Centro-Oeste</b>												
MT					P	P	P		C	C	C	
MS					P	P	P		C	C	C	
GO					P	P	P		C	C	C	
DF						P	P		C	C	C	
<b>Sudeste</b>												
MG					P	P	P		C	C	C	
SP					P	P	P		C	C	C	C
<b>Sul</b>												
RS	P	P	P	P	C	C	C	C				

Legenda: P - Plantio; C - Colheita; PIC - Plantio e colheita.

Quadro B.1: Calendário de plantio e colheita de sorgo granífero nos estados produtores  
Fonte: CONAB (2012).

<i>Primers</i>	Sequencia 5'-3'	Tm (°C)	GC (%)	Concentração (nM)
β-TUB-F	GAGTGCTGACCTTCCACAGG	60,3	60	300
β-TUB-R	GAAGAGCTGACCGAAGGGAC	60,1	60	50
KS-F	GCGCGATAACGATGCTGTTT	59,9	50	300
KS-R	TGGCCTGAACTCGAAGGAAC	59,9	55	300

Quadro B.2: *Primers* do gene alvo (*TSA1*) e do controle interno ( $\beta$ -tubulina) utilizados no estudo de expressão gênica e seus respectivos valores de Tm (°C), porcentagem de GC e concentração utilizada na reação (nM).



## ANEXO C – TABELAS

Tabela C.1: Caracterização macromorfológica de 65 cepas de *Epicoccum sorghinum* isoladas de grãos de sorgo.

Cepa	Cor anverso		Cor reverso		Diâmetro (mm)		Pigmento		Textura		Borda		Exudato / Cor	
	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA
P1	Cinza esverdeado e laranja acinzentado	Cinza avermelhado	Marrom escuro	Vermelho amarronzado	68	80	+	+	A	A	R	R	+ Incolor	-
P2	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Marrom	Vermelho acinzentado	72	76	-	-	A	A	R	R	-	+ Vermelho
P3	Cinza esverdeado	Vermelho pálido com borda branca	Marrom esverdeado	Laranja acinzentado	65	71	-	-	A	C	R	R	+ Incolor	-
P4	Cinza oliva	Cinza esverdeado e laranja acinzentado	Marrom oliva	Laranja pálido	52	56	-	-	A	A	R	R	-	+ Vermelho
P5	Cinza esverdeado	Laranja acinzentado	Cinza oliva	Marrom escuro	62	70	-	+	A	A	R	R	+ Incolor	-
P6	Cinza esverdeado	Branco alaranjado	Bege acinzentado	Vermelho acinzentado	68	80	-	-	C	A	R	R	-	-
P8	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Laranja acinzentado	Laranja pálido	65	72	-	-	A	C	R	R	+ Vermelho	-
P9	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Marrom esverdeado	Laranja pálido	60	72	-	-	A	C	R	R	-	-
P10	Branco alaranjado	Branco alaranjado	Bege amarronzado	Laranja amarronzado	70	78	-	-	C	A	R	R	-	-
P12	Cinza oliva	Branco alaranjado	Marrom oliva	Vermelho acinzentado	63	78	-	-	A	C	R	R	-	-
P15	Cinza esverdeado	Branco alaranjado	Cinza oliva	Marrom	59	72	-	-	C	C	R	R	-	-
P17	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Bege amarronzado	Marrom alaranjado	60	65	-	-	A	C	R	R	+ Amarelo	-
P22	Cinza esverdeado	Laranja acinzentado	Marrom claro	Marrom escuro	60	65	+	+	A	A	R	R	+ Incolor	-
P24	Cinza esverdeado	Branco alaranjado	Cinza oliva	Laranja pálido	56	60	-	-	A	A	R	R	+ Incolor	-

Cepa	Cor anverso		Cor reverso		Diâmetro (mm)		Pigmento		Textura		Borda		Exudato / Cor	
	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA
P25	Cinza esverdeado	Branco alaranjado	Bege acinzentado	Laranja claro	61	71	-	-	A	C	R	R	-	-
P27	Laranja acinzentado	Laranja acinzentado	Marrom avermelhado	Marrom alaranjado	68	70	+	-	C	C	R	R	-	-
P28	Cinza amarronzado	Branco alaranjado	Bege amarronzado	Vermelho acinzentado	48	69	-	-	C	C	R	R	+	-
P29	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado e cinza oliva	Marrom esverdeado	Marrom escuro	66	79	-	+	C	C	R	R	+	+
P30	Branco esverdeado	Branco esverdeado	Cinza amarronzado	Marrom escuro	75	80	-	+	C	A	R	R	-	-
P31	Cinza oliva e laranja acinzentado	Cinza alaranjado	Bege amarronzado	Laranja claro	62	66	-	-	A	A	R	R	-	-
P32	Cinza amarronzado	Branco alaranjado	Bege amarronzado	Vermelho pastel	65	70	-	+	A	C	R	R	+	-
P33	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado e laranja acinzentado	Bege acinzentado	Laranja pálido	64	70	-	-	A	C	R	R	+	+
P34	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Cinza amarronzado	Marrom	55	65	-	+	A	A	R	R	+	-
P35	Cinza oliva	Branco alaranjado	Cinza oliva	Vermelho escuro	65	70	-	+	A	A	R	R	-	-
P37	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Marrom oliva	Vermelho acinzentado	66	73	-	-	A	A	R	R	+	+
P40	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Bege amarronzado	Laranja pálido	60	72	-	-	C	A	R	R	+	+
P41	Cinza oliva	Branco alaranjado	Marrom oliva	Marrom escuro	60	68	-	+	A	A	R	R	-	-
P43	Cinza esverdeado e laranja acinzentado	Branco alaranjado	Marrom acinzentado	Vermelho amarronzado	70	75	-	+	A	A	R	R	+	-
P44	Cinza esverdeado	Laranja acinzentado	Cinza oliva	Vermelho acinzentado	64	80	-	-	A	A	R	R	+	-

A: aveludado; C: cotonoso; R: regular; + Presença; - Ausência.

Cepa	Cor anverso		Cor reverso		Diâmetro (mm)		Pigmento		Textura		Borda		Exudato / Cor	
	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA
P45	Cinza amarronzado	Laranja acinzentado	Marrom acinzentado	Vermelho escuro	65	77	-	+	A	A	R	R	-	-
P47	Cinza oliva	Cinza amarronzado	Marrom acinzentado	Marrom avermelhado	50	80	-	+	A	A	R	R	-	+ Incolor
P48	Cinza esverdeado e laranja acinzentado	Laranja acinzentado	Marrom oliva	Vermelho acinzentado	65	75	-	-	A	A	R	R	+	+
P49	Cinza oliva e laranja acinzentado	Laranja acinzentado	Marrom acinzentado	Laranja acinzentado	63	68	-	-	A	A	R	R	+	+
P50	Cinza oliva	Branco avermelhado	Cinza amarronzado	Laranja acinzentado	55	65	-	-	C	C	R	R	-	-
P53	Cinza alaranjado	Branco avermelhado	Marrom oliva	Vermelho pastel	50	60	-	+	A	C	R	R	-	-
P54	Cinza esverdeado	Branco alaranjado	Marrom	Laranja acinzentado	40	60	-	-	C	C	R	R	+	-
P55	Laranja acinzentado	Branco avermelhado	Rubi escuro	Vermelho amarronzado	50	62	+	+	A	C	R	R	-	-
P56	Branco alaranjado	Branco avermelhado	Laranja acinzentado	Vermelho pastel	65	70	-	+	C	C	R	R	+	+
P59	Laranja acinzentado e cinza oliva	Laranja acinzentado	Marrom acinzentado	Marrom escuro	65	70	-	+	A	C	R	R	+	+
P78	Cinza oliva	Branco alaranjado	Marrom oliva	Laranja acinzentado	63	78	-	-	A	C	R	R	+	+
P84	Laranja acinzentado cinza oliva	Vermelho acinzentado	Marrom oliva	Vermelho pastel	65	74	-	+	A	A	R	R	+	+
P86	Branco alaranjado e verde acinzentado	Branco alaranjado	Marrom	Marrom avermelhado	65	75	-	+	A	C	R	R	+	+

A: aveludado; C: cotonoso; R: regular; + Presença; - Ausência.

Cepa	Cor anverso		Cor reverso		Diâmetro (mm)		Pigmento		Textura		Borda		Exudato / Cor	
	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA
P87	Cinza amarronzado	Branco avermelhado	Marrom acinzentado	Marrom escuro	60	65	-	+	A	C	R	R	+ Incolor	+ Incolor
P88	Marrom alaranjado	Vermelho acinzentado	Marrom acinzentado	Vermelho pastel	65	72	-	+	A	A	R	R	+ Incolor	+ Vermelho
P89	Cinza oliva	Vermelho escuro	Laranja acinzentado	Vermelho pastel	66	74	-	+	A	C	R	R	+ Vermelho	-
P91	Cinza oliva	Branco avermelhado	Marrom oliva	Vermelho pastel	65	63	-	+	A	A	R	R	-	-
P93	Laranja acinzentado	Branco avermelhado	Marrom esverdeado	Bege acinzentado	70	77	-	-	A	A	R	R	+ Vermelho	-
P94	Cinza oliva	Branco avermelhado	Marrom acinzentado	Marrom escuro	50	60	-	+	A	A	R	R	-	-
P96	Laranja acinzentado e cinza esverdeado	Branco avermelhado	Marrom acinzentado	Marrom avermelhado	50	65	-	+	C	A	R	R	+ Incolor	-
P97	Marrom alaranjado	Laranja acinzentado	Marrom acinzentado	Marrom avermelhado	70	75	-	+	A	A	R	R	+ Vermelho	-
P98	Cinza oliva	Cinza alaranjado	Cinza oliva	Laranja acinzentado	66	79	-	-	A	A	R	R	-	-
P99	Laranja acinzentado e cinza oliva	Vermelho pálido e borda branca	Cinza oliva	Vermelho pastel	66	75	-	+	A	C	R	R	-	-
P104	Laranja acinzentado e cinza oliva	Branco alaranjado	Marrom avermelhado	Laranja acinzentado	60	68	-	-	A	A	R	R	-	+ Vermelho
P105	Cinza esverdeado	Branco alaranjado	Marrom oliva	Laranja amarronzado	60	60	-	-	A	C	R	R	+ Incolor	+ Incolor
P108	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco avermelhado	Marrom acinzentado	Marrom avermelhado	65	72	-	+	A	A	R	R	+ Vermelho	-
P110	Cinza oliva e laranja acinzentado	Branco avermelhado	Marrom acinzentado	Marrom avermelhado	60	70	-	+	A	C	R	R	+ Incolor	-

A: aveludado; C: cotonoso; R: regular; + Presença; - Ausência.

Cepa	Cor anverso		Cor reverso		Diâmetro (mm)		Pigmento		Textura		Borda		Exudato / Cor	
	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA	OA	MEA
P114	Verde acinzentado e laranja acinzentado	Branco e laranja acinzentado	Marrom oliva e amarelo acinzentado	Marrom escuro	67	78	-	-	A	C	R	R	+ Vermelho	-
P115	Cinza amarronzado	Branco alaranjado	Cinza oliva	Marrom alaranjado	65	75	-	-	A	A	R	R	-	-
P117	Cinza oliva	Branco alaranjado	Marrom oliva	Vermelho pastel	65	80	-	+	A	C	R	R	-	-
P118	Laranja acinzentado	Vermelho pálido	Marrom escuro	Marrom avermelhado	70	80	+	+	A	C	R	R	+ Incolor	+ Vermelho
P119	Cinza esverdeado	Cinza amarronzado	Cinza oliva	Marrom	74	80	-	-	A	C	R	R	-	-
P123	Cinza alaranjado e laranja acinzentado	Laranja amarronzado	Bege acinzentado	Vermelho pastel	60	70	-	+	A	A	R	R	-	-
P125	Cinza oliva	Vermelho acinzentado	Amarelo acinzentado	Laranja acinzentado	70	75	-	-	A	A	R	R	+ Vermelho	+ Vermelho
P126	Cinza turquesa	Cinza alaranjado	Cinza turquesa	Marrom avermelhado	70	75	+	+	A	A	R	R	+ Incolor	-
P128	Cinza alaranjado e cinza oliva	Cinza alaranjado e cinza oliva	Marrom	Vermelho amarronzado	68	75	-	+	A	A	R	R	+ Vermelho	+ Vermelho

A: aveludado; C: cotonoso; R: regular; + Presença; - Ausência.

Tabela C.2: Resultado da identificação molecular através do sequenciamento parcial da região ITS e dos genes da  $\beta$ -tub e Actina de 104 cepas de *Phoma* spp.

Isolado	Id. Molecular	ITS		Id. Molecular	$\beta$ Tubulina		Actina		Id. Final
		<i>e-v</i>	<i>Id.</i>		<i>e-v</i>	<i>Id.</i>	<i>e-v</i>	<i>Id.</i>	
P1	<i>Microsphaeropsis proteae</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> PD 03486771	1e-154	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P2	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> PD 03486771	1e-154	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P3	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> PD 03486771	2e-152	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P4	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> PD 03486771	1e-154	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P5	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	5e-158	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P6	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	1e-159	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P7	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	3e-155	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P8	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	3e-155	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P9	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	6e-163	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P10	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,0	99 %	<i>Epicoccum nigrum</i> CBS 115825	2e-142	99%	0,0	99%	<b><i>E. nigrum</i></b>
P11	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	1e-164	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P12	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	6e-158	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P13	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	1e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P14	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-158	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P15	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	5e-164	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>

P16	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	1e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P17	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P18	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-152	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P19	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	5e-164	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P20	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	9e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P21	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	2e-178	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P22	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-168	98%	0,0	98%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P23	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	6e-163	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P24	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846.68	4e-159	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P25	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,0	99 %	<i>Epicoccum nigrum</i> CBS 125.82	8e-162	97%	0,0	97%	<b><i>E. nigrum</i></b>
P26	<i>Microsphaeropsis proteae</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P27	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	4e-170	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P28	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-175	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P29	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P30	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-175	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P31	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P32	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	3e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P33	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	3e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P34	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	6e-163	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P35	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-165	98%	0,0	98%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>

P36	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-175	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P37	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum nigrum</i> CBS 125.82	3e-145	98%	0,0	98%	<i>E. nigrum</i>
P38	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> PD 76/1025	8e-177	100%	0,0	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P39	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P40	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	1e-175	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P41	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-165	98%	0,0	98%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P42	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-177	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P43	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-175	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P44	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-178	100%	0,0	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P45	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P46	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	5e-164	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P47	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	5e-164	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P48	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 301.89	2e-173	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P49	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,0	99 %	<i>Epicoccum nigrum</i>	2e-142	99%	0,0	99%	<i>E. nigrum</i>
P50	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-177	100%	0,0	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P51	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-178	100%	0,0	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P52	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> PD 76/1025	8e-177	100%	0,0	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P53	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-170	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P54	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P55	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-159	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>



P56	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-168	98%	0,0	98%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P57	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,0	99 %	<i>Epicoccum nigrum</i>	2e-142	99%	0,0	99%	<b><i>E.nigrum</i></b>
P58	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,0	99 %	<i>Epicoccum nigrum</i>	2e-142	99%	0,0	99%	<b><i>E.nigrum</i></b>
P59	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P60	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P61	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P62	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	4e-170	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P63	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-172	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P64	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	5e-164	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P65	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P66	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-172	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P67	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P68	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-159	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P69	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-159	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P70	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P71	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-168	98%	0,0	98%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P72	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	96%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	8e-172	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P73	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	3e-160	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P74	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-172	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P75	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>

P76	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-173	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P77	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-173	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P78	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	4e-175	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P79	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P80	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P81	<i>Epicoccum nigrum</i>	0,0	99%	<i>Epicoccum nigrum</i>	2e-142	99%	0,0	99%	<i>E.nigrum</i>
P82	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-175	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P83	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-178	100%	0,0	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P84	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	100%	0,0	100%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P85	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P86	<i>Microsphaeropsis proteae</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	6e-158	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P87	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-136	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P88	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-136	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P89	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	8e-172	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P90	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P91	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-164	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P92	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-164	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P93	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P94	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-164	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P95	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-173	99%	0,0	99%	<i>Epicoccum sorghinum</i>

P96	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97 %	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-168	98%	0,0	98%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P97	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-170	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P98	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	2e-173	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P99	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	4e-170	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P100	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-175	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P101	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	4e-165	98%	0,0	98%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P102	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P103	<i>Coniothyrium fuckelii</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 846-68	1e-165	99%	0,0	99%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>
P104	<i>Coniothyrium nitidae</i>	0,0	97%	<i>Epicoccum sorghinum</i> CBS 293.72	2e-158	100%	0,0	100%	<b><i>Epicoccum sorghinum</i></b>