

NOTA CIENTÍFICA

Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticale no sul do Brasil

Francislene Angelotti¹, Dauri José Tessmann¹, Tatiane Cristina Albuquerque Alves¹, João Batista Vida¹, David de Souza Jaccoud Filho², Ricardo Harakava³

¹Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR; ²Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, 84010-919, Ponta Grossa, PR; ³Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, 04014-002, São Paulo, SP.

Autor para correspondência: Dauri J. Tessmann

Data de chegada: 04/10/2004. Aceito para publicação em: 01/07/2005.

1129

ABSTRACT

Angelotti, F.; Tessmann, D.J.; Alves, T.C.A.; Vida, J.B.; Jaccoud Filho, D.S.; Harakava, R. Morphological characterization and molecular identification of *Fusarium graminearum* isolates associated with fusarium head blight in wheat and triticale in Southern Brazil. *Summa Phytopathologica*, v. 32, n. 2, p.177-179, 2006.

Fusarium head blight (FHB) or scab is an important disease of wheat and triticale in Southern Brazil. The fungus *Fusarium graminearum* has been reported as the causal agent of this disease in Brazil even though other *Fusarium* species are also associated to FHB in other regions of the world. The aim of this study was to identify species of *Fusarium* associated with FHB on wheat and

triticale in Southern Brazil. The identification was based on morphological features, and upon polymerase chain reaction using species specific primers. The pathogenicity of the isolates in wheat was evaluated after inoculation of ears under greenhouse conditions. The twenty single spores isolates obtained from diseased ears and seeds were classified as *F. graminearum*.

Additional keywords: scab, *Triticum aestivum*, *Triticosecale*, PCR.

RESUMO

Angelotti, F.; Tessmann, D.J.; Alves, T.C.A.; Vida, J.B.; Jaccoud Filho, D.S.; Harakava, R. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticale no sul do Brasil. *Summa Phytopathologica*, v. 32, n. 2, p.177-179, 2006.

A giberela ou fusariose da espiga é uma das principais doenças do trigo e triticale no sul do Brasil. A espécie de fungo *Fusarium graminearum* é citada como agente causal da doença, muito embora, em outros países, outras espécies de *Fusarium* também estejam associadas à doença. No País, não existem relatos de levantamentos de espécies associadas à doença. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de *Fusarium* associados à giberela do trigo e

triticale procedentes do sul do Brasil, com base na morfologia e no emprego da reação da polimerase em cadeia (PCR) baseada em oligonucleotídeos específicos para espécies de *Fusarium*. A patogenicidade dos isolados em trigo foi avaliada em espigas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Os 20 isolados monospóricos analisados, obtidos de espigas doentes e sementes, foram identificados como *F. graminearum*.

Palavras-chave adicionais: Fusariose, *Triticum aestivum*, *Triticosecale*, PCR.

A giberela ou fusariose da espiga é uma das principais doenças fúngicas do trigo (*Triticum aestivum* L.) e triticale (*Triticosecale* sp.) em várias regiões do mundo, nas quais *Fusarium graminearum* Schwabe [teleomorfo: *Gibberella zae* (Scw.) Petch] é descrito como o principal agente causal da doença. Entretanto,

outras espécies de *Fusarium* também estão associadas à doença nos Estados Unidos da América, Canadá, regiões sul e leste da Europa (2, 4). No sul do Brasil apenas *F. graminearum* está relatada como o agente causal da giberela em cereais de inverno (8).

A identificação de espécies de *Fusarium* é realizada, tradicionalmente, com base na morfologia do patógeno, o que além de constituir uma tarefa difícil de ser executada, também pode gerar controvérsias devido à variabilidade dos caracteres fenotípicos empregados na classificação taxonômica desse gênero (5, 10). Entretanto, mais recentemente, a reação da polimerase em cadeia (PCR) tem auxiliado na identificação de espécies de *Fusarium* associadas à giberela em cereais de inverno (2, 9).

O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de isolados de *Fusarium* associados à giberela do trigo e triticale do sul do Brasil com base em características morfológicas e na reação da polimerase em cadeia (PCR), na qual empregou-se oligonucleotídeos específicos para identificação de espécies de *Fusarium* (9).

Isolados foram obtidos a partir de espigas doentes e sementes contaminadas de trigo e triticale, procedentes de diversas regiões produtoras de cereais de inverno do sul do Brasil (Tabela 1). Isolados monoconidiais foram obtidos conforme a metodologia descrita por Nelson et al. (5) e estão preservados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá. A morfologia das colônias (pigmentação e crescimento micelial) foi avaliada em meio de batata-dextrose-ágar (BDA), no escuro a 25 e 30 °C. No meio de folha de cravo-ágar foi avaliado forma e tamanho de macroconídios; formação, forma e tamanho de microconídios e formação de clamidósporos. A identificação das espécies foi feita com base em Nelson et al. (5) e Ventura (10).

Os isolados apresentaram pigmentação das culturas com a coloração variando de vermelho carmim, vermelho carmim-cinza e marrom claro (Tabela 1). A maioria das culturas formou micélio aéreo denso e apenas o isolado 14 apresentou micélio raro. A pigmentação desse isolado também foi bem diferente dos demais isolados. Verificou-se que as diferenças de crescimento micelial dos isolados em meio BDA a 25 e 30 °C não foram significativas de acordo com o teste de Scott-Knot ($P=0.05$) (resultados não apresentados).

A análise microscópica das estruturas reprodutivas mostrou que todos os isolados formaram macroconídios com célula apical cônica e célula basal em forma de pé. Os isolados não apresentaram grande variação no comprimento, largura e número de septos de macroconídios, com exceção do isolado 14 que apresentou macroconídios com maior comprimento do que os demais isolados (Tabela 1). Nenhum isolado apresentou a formação de microconídios e aproximadamente a metade do número de isolados apresentou a formação de clamidósporos. Com base na análise das características culturais e na morfologia das estruturas reprodutivas, os isolados foram identificados como a espécie *F. graminearum*, com exceção do isolado 14. A identificação deste isolado não foi conclusiva porque tamanho de macroconídios e a morfologia da cultura não eram típicos de *F. graminearum* (5, 10).

O teste de patogenicidade foi conduzido em plantas de trigo das cultivares Avante e Coodetec 104, cultivadas em vaso. O ensaio teve o delineamento experimental completamente casualizado, com cinco repetições para cada isolado e cultivar. A inoculação e avaliação da doença foram realizadas conforme o protocolo de Bai e Shaner (1). Verificou-se que a exceção do isolado 60, todos os demais isolados foram patogênicos no trigo, causando o sintoma de giberela nas espigas.

O DNA genômico dos isolados foi extraído de micélio conforme a metodologia de Koenig et al. (3). A identificação da espécie através da reação da polimerase em cadeia foi baseada no protocolo de Schilling et al. (9), com os oligonucleotídeos UBC85F₄₁₀ (5'-GCAGGGTTTGAATCCGAGAC-3') e UBC85R₄₁₀ (5'-AGAATGGAGCTACCAACGGC-3'), os quais são específicos para *F. graminearum*. O controle positivo foi o isolado NRRL2903 de *F. graminearum* e o controle negativo conteve apenas reagentes, sem amostra de DNA. O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 1,5%, contendo 10 mg de brometo de etídio/mL de gel. Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultra violeta e fotografados.

A análise com a reação da polimerase em cadeia (PCR) mostrou que os isolados analisados nesse estudo pertencem a espécie *F. graminearum*, inclusive o isolado 14. O produto da reação de PCR teve aproximadamente 330 pares de bases e está de acordo com a descrição de Schilling et al. (9) para essa espécie (Figura 1).

Este estudo buscou a ampliação de conhecimentos sobre a etiologia da giberela em cereais de inverno no sul do Brasil e embora apenas a espécie *F. graminearum* tenha sido identificada, não está descartada a possibilidade de que outras espécies desse fungo estejam associadas à doença no País. Novos estudos sobre o tema devem ampliar o número de amostras de isolados e aprofundar a análise do problema levando em consideração o trabalho de O'Donnell et al. (7), o qual verificou que no plano global ocorrem nove linhagens em *F. graminearum* que podem estar associadas à giberela, as quais são espécies filogenéticas diferentes.

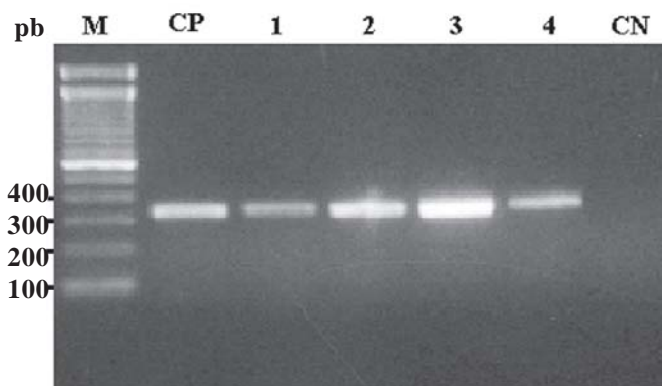


Figura 1. Produtos da reação da polimerase em cadeia (PCR) com os oligonucleotídeos UBC85F₄₁₀ e UBC85R₄₁₀, os quais são específicos para *Fusarium graminearum*; onde: M, marcador; CP, controle positivo (isolado NRRL2903 de *F. graminearum*); colunas 1 a 4, isolados 4, 5, 6 e 8, respectivamente; e CN, controle negativo (amostras sem DNA).

Tabela 1. Origem, características culturais e de estruturas reprodutivas de isolados de *Fusarium graminearum* associados com a giberela no sul do Brasil.

Identificação	Local (município/estado)	Hospedeira	Pigmentação da cultura ¹	Macroconídio ²			Clamídiosporo ^{2,4}
				Comprimento ³ (µm)	Largura ³ (µm)	Número de septos ³	
4	Mamborê/PR	Trigo ⁵	Vermelho carmim-cinza	43,8 - (54,0) - 68,8	3,8 - (5,0) - 6,3	4,0 - (5,0) - 7,0	-
5	Mamborê/PR	Trigo ⁵	Vermelho carmim-cinza	35,0 - (41,6) - 50,0	3,8 - (4,7) - 6,3	4,0 - (4,8) - 6,0	+
6	Peabiru/PR	Trigo ⁵	Vermelho carmim-cinza	41,3 - (52,4) - 62,5	3,8 - (4,8) - 6,3	3,0 - (4,3) - 5,0	-
8	Francisco Beltrão/PR	Trigo ⁵	Vermelho carmim-cinza	33,8 - (49,7) - 61,3	5,0 - (5,4) - 6,3	4,0 - (5,4) - 6,0	-
12	Iguaraçu/PR	Trigo ⁵	Vermelho carmim	31,3 - (48,4) - 62,5	3,4 - (4,1) - 5,0	3,0 - (4,7) - 6,0	-
14	Sertãoópolis/PR	Trigo ⁵	Marrom claro	75,0 - (87,7) - 110,0	5,0 - (5,0) - 6,3	5,0 - (6,3) - 7,0	-
16	Carambeí/PR	Triticale ⁶	Vermelho carmim	25,0 - (36,0) - 50,0	3,8 - (4,9) - 6,3	3,0 - (5,0) - 6,0	-
21	Carambeí/PR	Trigo ⁶	Vermelho carmim-cinza	32,5 - (40,3) - 46,3	3,1 - (4,4) - 5,0	3,0 - (5,4) - 5,0	+
22	Tibagi/PR	Trigo ⁶	Vermelho carmim-cinza	40,0 - (55,8) - 72,5	3,8 - (4,5) - 5,6	3,0 - (4,5) - 5,0	-
29	Abelardo Luz/SC	Triticale ⁶	Vermelho carmim	37,5 - (55,7) - 62,5	3,8 - (5,0) - 5,6	5,0 - (5,2) - 6,0	+
30	Abelardo Luz/SC	Triticale ⁶	Vermelho carmim	43,8 - (57,8) - 75,0	3,8 - (4,5) - 5,0	4,0 - (4,8) - 5,0	+
35	Pato Branco/PR	Triticale ⁶	Vermelho carmim	40,0 - (52,7) - 63,8	3,8 - (5,4) - 6,3	4,0 - (4,6) - 6,0	-
38	Seberi/RS	Trigo ⁵	Vermelho carmim	37,5 - (47,4) - 57,5	3,1 - (4,6) - 5,6	3,0 - (4,8) - 5,0	-
40	Palmeira das Missões/RS	Trigo ⁶	Vermelho carmim	30,0 - (42,1) - 58,8	3,8 - (5,3) - 6,3	4,0 - (5,3) - 6,0	+
44	Ijuí/RS	Trigo ⁶	Vermelho carmim	21,2 - (36,4) - 57,5	3,8 - (4,8) - 6,3	3,0 - (4,8) - 6,0	+
45	Ijuí/RS	Trigo ⁶	Vermelho carmim	25,0 - (40,2) - 52,5	2,5 - (4,0) - 5,0	3,0 - (4,5) - 5,0	+
46	Não-me-toque/RS	Trigo ⁶	Vermelho carmim	37,5 - (50,2) - 57,5	3,8 - (5,0) - 6,3	3,0 - (4,5) - 6,0	-
47	Não-me-toque/RS	Trigo ⁶	Vermelho carmim	25,0 - (39,9) - 56,2	3,8 - (4,9) - 5,7	3,0 - (4,3) - 6,0	+
56	Campos Novos/SC	Trigo ⁶	Vermelho carmim	38,7 - (53,3) - 71,2	3,7 - (4,2) - 5,0	4,0 - (4,6) - 5,0	+
60	Maringá/PR	Trigo ⁶	Vermelho carmim	30,0 - (47,1) - 62,5	3,7 - (5,0) - 6,2	4,0 - (5,6) - 6,0	+

¹ Meio de cultura batata-dextrose-ágar, a 25°C, no escuro; ² Meio de folha de cravo-ágar, a 25°C sob fotoperíodo de 12 h; ³ mínimo, médio (parênteses) e máximo, respectivamente; ⁴ Presença (+) e ausência (-); ^{5,6} Obtido de espigas doentes e sementes, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai, G.H.; Shaner, G. Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.9, p.975-979, 1996.
- Gale, L.R. Population biology of *Fusarium* species causing head blight of grain crops. In: Leonard, K.J.; Bushnell, W.R. (Ed.) **Fusarium head blight of wheat and barley**. St. Paul: APS Press, 2003. p.120-143.
- Koenig, R.L.; Ploetz, R.C.; Kistler, H.C. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.9, p.915-923, 1997.
- McMullen, M.; Jones, R.; Gallenberg, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.12, p.1340-1348, 1997.
- Nelson, P. E.; Touson, T. A.; Marassas, W. F. O. **Fusarium species, an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.
- Nicholson, P. Molecular assays as aids in the detection, diagnosis and quantification of *Fusarium* species in plants. In: Summerell, B.A.; Leslie, J.F.; Backhouse, D.; Bryden, W.L.; Burgess, L.W. **Fusarium Paul E. Nelson memorial symposium**. St. Paul: APS Press, 2001. p.176-192.
- O'Donnell, K.; Kistler, H.C.; Tacke, B.K.; Casper, H.H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, vol.97, n.14, p.7905-7910. 2000.
- Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 35., 2003. **Indicações...** Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2003. Fundacep Fecotriga, Passo Fundo. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/rcsbpt03.htm>. Acesso em: 20 out. 2004.
- Schilling, A. G.; Moller, E.M.; Geiger, H.H. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n.5, p.515-522, 1996.
- Ventura, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II - Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.8, p.303-338, 2000.