Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido

Júlia Ronzella Ottoni

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2008

Júlia Ronzella Ottoni
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Ottoni, Júlia Ronzella
Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido / Júlia Ronzella Ottoni. - - Piracicaba, 2008.
54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. ELISA 2. Fusarium 3. Micotoxinas 4. Milho 5. Reação em cadeia por polimerase 6. Semente - Patologia I. Título

CDD 633.15
O91a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

Dedico ao meu pai João Batista Ottoni, que sempre me apoiou incondicionalmente, me ouve e me orienta em todos os aspectos da minha vida. Ao meu irmão João Evangelista Ottoni, que apesar das brigas e discussões sei que sempre estará por perto me ajudando com o que eu precisar. A minha mãe, Maria de Fátima Ronzella Ottoni (in memorian) que mesmo muito diferente de mim, me deu a vida. A minha tia Maria José Ottoni Bueno da Silva que sempre participou da minha vida como se fosse minha mãe. Ao meu tio Paulo Roberto Ottoni (in memorian) que sempre me aconselhou nos momentos de indecisão sobre a vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai João Batista Ottoni por estar ao meu lado em todos os momentos sempre com muito carinho.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação no mestrado e por todas as oportunidades durante os quase sete anos de laboratório.

À ESALQ/USP, instituição que me acolhe desde a graduação e que possibilitou mais essa experiência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia que permitiu que eu aprendesse mais sobre microbiologia nesses 2 anos e meio.

À Dow AgroScience e Roberto Carvalho pela parceria, à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos colegas do programa, pelos churrascos, viagens e momentos divertidos.

À todos os amigos do LGM: Alexandre, Aninha, Bruno, Carol, Cynthia, Daniel, Danilo, Erikinha, Fátima, Fernanda, Geovana, Juliana, Lara, Leandro, Márcia, Neiva, Osmar, Raphaelle, Reinaldo, Thayne, Vyvian. Pela convivência diária, almoços, festas, churrascos, apoio e auxílio prático e teórico, paciência e por proporcionarem um ambiente de trabalho leve e aconchegante.

Às minhas estagiárias Marília, Luiza, e Thais. Pela grande ajuda no projeto, pelo companheirismo, pela dedicação cedida, compreensão comigo e pela amizade que já deixa saudades.

Ao departamento Fitopatologia: Adriana, Alderi, Ana Paula, Anne, Alessandra, Barbara, Carmen, Diogo, Edivaldo, Ely, Fabrício, Fernanda e Rodolfo, Helô, Jefferson, Julio, Liliane, Linda, Luciano, Luana, Moro, Natália, Pastora, Paulo, Thais, Vanessa. Pela disponibilidade em me auxiliar, amizade, companheirismo.

Ao professor Dr. José Otávio Machado Menten pelo auxílio inicial, pelas conversas e pela disposição em preservar a união entre todos mesmo estando um pouco distante. Ao Prof. Dr. Nelson Massola Jr. Pelos ensinamentos da área e disponibilidade em auxiliar nas dúvidas. Ao Dr. Welington Araújo, Dr. Fernando Andreoti, Dr. Eduardo Micotti, Dra. Maria Antônia C. Domingues, Prof. Dr. Marcio Lambais, Dr. Tiago Zucchi, que de alguma forma me ajudaram nesta etapa.

Ao Mario Aguiar pelo auxílio com a tradução.

Aos meus amigos: Flávia e Catarina, Paula Prezotto (D-lícia), Ana Paula Sanches Loureiro (Aipo), Roberta (1/2 Kilo), Carlos Manocchio, Polé, Manoela,

Fernanda, Maíra, Gerusa, I Turma de Ciências dos Alimentos, por fazerem parte da minha vida, estarem sempre presentes e pela paciência que sempre tiveram comigo.

À minha família: João Batista Ottoni (pai), Maria de Fátima Ronzella Ottoni (mãe – *in memorian*), João Evangelista Ottoni (irmão), Mika, tia Zezé, tio Toninho, Augusto, Gisleiva e Henrique, Andréa, tio André, tia Tereza, Ricardo, Lídia, tio Paulo (*in memorian*) e tia Marlene. Pelo apoio incondicional, estrutura e por comporem a melhor família que alguém pode ter.

Às minhas companheiras de mestrado Cristiane Cipolla Fasanella (Kit), Laura de Castro Assumpção (Laurinda) e Lilian Luzia Beloti (Bíbian) por todos os momentos. Por terem se tornado pessoas especiais e essenciais nesses anos. Pela grande amizade que surgiu e que carregarei pra sempre comigo. Pelas risadas, discussões e telefonemas diários. Por me consolarem nos momentos difíceis. Pelo simples fato de estarem por perto.

SUMÁRIO

RESUMO....8
ABSTRACT....9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES....10
LISTA DE TABELAS....11
1. INTRODUÇÃO....12
2. DESENVOLVIMENTO....13
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....13
2.1.1 A cultura do milho....13
2.1.2 Grãos ardidos....14
2.1.3 Fungos micotoxigênicos....15
2.1.4 Fumonisinas....16
2.1.5 Micotoxicoses....19
2.1.6 Micotoxicoses causadas por fumonisinas....20
2.1.7 Doenças relacionadas ao consumo de fumonisinas no mundo....21
2.1.8 Doenças relacionadas ao consumo de fumonisinas no Brasil....22
2.1.9 Recomendações máximas aceitáveis de consumo de fumonisinas nos E.U.A e Comunidade Européia....23
2.1.10 Detecção imunológica de micotoxinas....23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS....24
2.2.1 Material vegetal....24
2.2.2 Avaliação da incidência de *Fusarium* spp. em grãos ardidos....25
2.2.3 Obtenção de isolados monospóricos de *Fusarium* spp.....25
2.2.4 Extração de DNA de isolados monospóricos de *Fusarium* spp.....26
2.2.5 Reações polimerásicas em cadeia (PCRs) para confirmação de gênero e espécie e para avaliação do potencial toxigênico em isolados monospóricos de *Fusarium* spp....27
2.2.6 Identificação morfológica de *Fusarium* spp.....28
2.2.7 Quantificação de fumonisinas em amostras de grãos ardidos....29
2.2.8 Incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e concentração de fumonisinas em grãos assintomáticos....30
2.3 RESULTADOS....30

2.3.1 Incidência de *Fusarium* spp.em grãos ardidos 30
2.3.2 Reações polimerásicas em cadeia (PCRs) para confirmação de gênero e espécie e para avaliação do potencial toxigênico em espécies de *Fusarium* spp. 34
2.3.3 Quantificação de fumonisinas em amostras de grãos ardidos 41
2.3.4 Incidência de Fusarium spp. com potencial toxigênico e quantificação de fumonisinas em grãos assintomáticos de milho híbrido 42
2.4 DISCUSSÃO 44
3 CONCLUSÕES 49
REFERÊNCIAS.....50

RESUMO

Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido

O milho (*Zea mays*) é um cereal amplamente cultivado no Brasil e no mundo. Sua produtividade pode ser afetada por diversos fatores incluindo a colonização fúngica. Em Fitopatologia, grãos afetados por fungos são denominados “grãos ardidos” e os gêneros mais encontrados em milho são *Stenocarpella* e *Fusarium*. Espécies de *Fusarium* podem causar podridões nas espigas e também podem produzir fumonisinas, toxina esta tóxica para animais e humanos e associadas ao desenvolvimento de diversas doenças. O presente trabalho teve como objetivo analisar a incidência de *Fusarium* ssp. com potencial toxigênico em amostras de grãos ardidos através da identificação da presença do gene *fum5*, responsável pela produção de fumonisinas pelo fungo, bem como quantificar os níveis de fumonisinas encontrados nessas amostras e comparação com os resultados obtidos de grãos assintomáticos. Um total de 100 amostras dos anos de 2006 e 2007 provenientes das principais regiões produtoras do Brasil foram submetidas à três análises. A primeira avaliou a incidência de *Fusarium* spp. nos grãos através do método do papel de filtro com congelamento e em 100% das amostras foi encontrado o fungo em níveis que variaram de 34 a 91%. A segunda análise utilizou a PCR para confirmação do gênero, identificação de espécies (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*) e identificação da presença do gene *fum5*. A PCR confirmou 93% dos isolados como pertencentes ao gênero *Fusarium*. Os isolados negativos passaram por análise morfológica e todos foram confirmados. As PCRs para espécies identificaram 82% dos isolados como *F. verticillioides*, 3% como *F. subglutinans* e nenhum como *F. proliferatum*. A PCR para potencial toxigênico foi positiva para 81% dos isolados. A terceira análise consistiu na quantificação de fumonisinas (B_1, B_2 e B_3 na proporção 5:3:1) através do método de ELISA e os níveis variaram de 4,4 a mais de 90 µg/g. Grãos assintomáticos da segunda safra de 2007 foram analisados separadamente para comparação. Em 100% das amostras houve incidência de *Fusarium* spp, variando de 74 a 87%. A PCR para confirmação do gênero foi positiva para 87% dos isolados e os demais passaram por análise morfológica e então confirmados. As PCRs para identificação de espécies mostrou 60% dos isolados como sendo *F. verticillioides*, 3% como *F. subglutinans* e nenhum como *F. proliferatum*. A maior concentração de fumonisinas nos grãos assintomáticos foi de 2,1 µg/g e em 53% das amostras não foram detectadas fumonisinas. Os resultados mostraram que há uma alta incidência de *Fusarium* spp. em grãos ardidos e assintomáticos. Grãos ardidos e assintomáticos têm *Fusarium* spp. com potencial toxigênico mas os níveis de fumonisinas encontrados nos grãos assintomáticos foram muito baixos em comparação com os encontrados nos grãos ardidos mostrando que, em condições adversas, esse fungo deixa de ser endofítico e passa a ser patogênico, podendo causar doenças na planta e produzir toxinas. Pelo fato das fumonisinas estarem concentradas nos grãos ardidos, a redução dessas toxinas da dieta deve ser baseada na eliminação dos mesmos através do controle do beneficiamento.

Palavras-chave: Micotoxinas, Patologia de sementes, PCR, ELISA

ABSTRACT

Incidence of toxigenic *Fusarium* spp. and levels of fumonisins in hybrid maize rot grains

Maize is a cereal widely cultivated in Brazil and worldwide. Its productivity can be affected by numerous factors including fungal colonization. In pathological terms, affected grains by fungi are denominated “rot grains” and the two most prevalent genera found in maize are *Stenocarpella* and *Fusarium*. Species of *Fusarium* can cause rotting in the stalks and also produce fumonisins, which are toxic both for animals and humans since their occurrence is associated to many diseases. The present work aimed to analyse the incidence of *Fusarium* ssp. with toxigenic potential in rot grains samples through the identification of the presence of the gene *fum5*, responsible for the production of fumonisins, as well as to quantify the levels of fumonisins found in these samples and compare with the results obtained in asymptomatic grains. A total of 100 samples from the 2006 and 2007 harvests were collected from the main producing regions of Brazil and were submitted to three analyses. The first evaluated the incidence of *Fusarium* ssp. in the grains through the method of filter paper and freezing, which revealed incidences that varied from 34 to 91%. The second analysis used specific primers and PCR to confirm the genus and species (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*) and to detect the presence of the *fum5* gene. The results indicated that 93% of the isolates belonged to the genus *Fusarium*. The PCR - negative isolates were confirmed as *Fusarium* after morphological analysis. Eigthy two percent of the isolates were classified as *F. verticillioides*, 3% as *F. subglutinans* and none as *F. proliferatum* using species-specific PCR. The *fum5* gene was detected in eighty one percent of the isolates. The third analysis consisted in the quantification of the fumonisins (B_1, B_2 e B_3 in the proportion of 5:3:1) through the ELISA method and the levels varied from 4,4 to more than 90 µg/g. Asymptomatic grains from the second cropping season of 2007 were analyzed separately for comparison purposes. The incidence of *Fusarium* spp. in these varied from 74 to 87%. The PCR for confirmation of the genus was positive for 87% of the isolates. The PCRs for species identification showed 60% of the isolated as being *F. verticillioides*, 3% as *F. subglutinans* and none as *F. proliferatum.* The greater concentration of fumonisins in the asymptomatic grains was of 2,1 µg/g and in 53% of the samples fumonisins were not detected. Rot and asymptomatic grains presented *Fusarium* spp. with toxigenic potential but the levels of fumonisins found in the asymptomatic grains were much lower compared with rot grains, showing that, in adverse conditions, this fungus changes from endophytic to pathogenic, being able to parasitize the plant and to produce toxins. The fact that fumonisins levels are much higher in rot grains, a simple measure to reduce the levels of these toxins in the animal diet would be to eliminate them during processing.

Keyword: Mycotoxins, Seed pathology, PCR, ELISA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Incidência de *Fusarium* spp. em grãos ardidos das primeira e segundas safras de 2006 e 2007. 33

Figura 2 - Porcentagens de reações positivas de PCR com primers específicos para gênero de isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grãos ardidos 34

Figura 3 - Porcentagens de reações positivas de PCR com primers específicos para *F. verticillioides* de isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grãos ardidos 35

Figura 4- Porcentagens de reações positivas de PCR com primers específicos para o gene *fum5* de isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grãos ardidos..... 36

Figura 5 - Reações polimerásicas em cadeia de isolados de *Fusarium* spp. isolados de grãos de milho com primers específicos para gênero *Fusarium* (A); espécie *F. verticillioides* (B); espécie F. *subglutinans* (C) e para o gene *fum5* (D). 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidência de *Fusarium* spp. (%*Fusarium*) e concentração de fumonisinas (µg/g) em grãos ardidos coletados em amostras de grãos de armazéns comerciais segundo safra/ano e local de coleta e respectivas porcentagens de grãos ardidos nas amostras comerciais.....30

Tabela 2 - Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em grãos ardidos nas duas safras de 2006 e 2007 segundo amostra de origem e resultados das PCRs com primers específicos para gênero *Fusarium* (FUS), para o gene *fum5* (*fum5*) e para as espécies *F. verticillioides* (FV), *F. Proliferatum* (FP) e *F. subglutinans* (FS). 37

Tabela 3 - Incidência de *Fusarium* spp. (%fus) e concentração de fumonisinas (µg/g) em amostras de grãos assintomáticos. 42

Tabela 4- Isolados de *Fusarium* spp. coletados em grãos assintomáticos na segunda safra de 2007 segundo amostra de origem e resultados das PCRs com primers específicos para gênero *Fusarium* (FUS), para o gene *fum5* (*fum5*) e para as espécies *F. verticillioides* (FV), *F. Proliferatum* (FP) e *F. subglutinans* (FS) 43

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, ficando atrás dos Estados Unidos e da China. Atualmente, o milho é uma das culturas de grãos mais importantes, com uma produção anual de cerca de 637 milhões de toneladas (OKLAHOMA STATE UNIVERSITY, 2007).

A produção de milho pode ser afetada de diversas maneiras, dentre elas podemos citar a ação patogênica de fungos. Em fitopatologia, grãos afetados por fungos são denominados “grãos ardidos” e, dentre os fungos mais comumente encontrados, estão os dos gêneros *Stenocarpella* e *Fusarium* (EMBRAPA, 2005; DESJARDINS, 2006). Algumas espécies do gênero *Fusarium*, além de causarem podridões de colmo e espiga, também produzem substâncias tóxicas denominadas micotoxinas.

O milho é um cereal amplamente consumido em todo o mundo por animais e humanos e a presença de micotoxinas nos grãos pode levar ao consumo inadvertido desses metabólitos que, por sua vez, estão associados a diversas doenças. As principais toxinas produzida por espécies de *Fusarium* em milho são as fumonisinas, toxinas associadas a enfermidades como leucoencefalomalácia em cavalos (MARASAS et al., 1988) e edema pulmonar em suínos (COLVIN; HARRISON, 1992), dentre outras. Em humanos, o consumo de fumonisinas pode estar associado à ocorrência de câncer esofágico (MARASAS, 1993 e 1996), má formação do tubo neural (MARASAS et al., 2003) e câncer hepático em locais onde o consumo de grãos de baixa qualidade é elevado (UENO, 2000).

Este estudo objetivou realizar um levantamento da incidência de *Fusarium* spp. com potencial toxigênico em amostras de grãos ardidos de milho híbrido provenientes de diferentes regiões do Brasil bem como avaliar os níveis de contaminação dessas amostras por fumonisinas .

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 A cultura do Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância e cerca de 637 milhões de toneladas de grãos são produzidos por ano mundialmente. É o cereal mais cultivado, produzido em 77 países, principalmente devido à sua facilidade de adaptação que permite o cultivo em regiões de clima tropical a temperado, desde o nível do mar a altitudes de 3600 m (FIGUEIRA et al., 2003). O Brasil, que participa com 7% da produção mundial, é o terceiro maior produtor mundial, ficando atrás dos Estados Unidos (maior produtor) e China (FIGUEIRA et al., 2003). Anualmente no Brasil são produzidas cerca de 50 milhões de toneladas de grãos, sendo que no ano de 2007 essa produção alcançou 51 milhões de toneladas (IBGE, 2008). Cerca de 66% do milho produzido no país é destinado à fabricação de ração animal, enquanto 20% é utilizado para consumo humano direto, principalmente em propriedades rurais e 8% é destinado à indústria. O restante constitui a somatória de perdas e produção de sementes (FIGUEIRA et al., 2003).

Em países desenvolvidos, o consumo “per capita” anual de grãos atinge aproximadamente 1000 kg, sendo 70 kg ingeridos diretamente na dieta e 930 kg indiretamente na forma de ração utilizada na produção de carne e leite. Em países asiáticos em desenvolvimento, o consumo “per capita” é de 150 kg, sendo quase totalmente ingerido sob forma de grãos “in natura” (FIGUEIRA et al., 2003). As propriedades nutritivas do milho, aliados à presença de micronutrientes e à proteína de alto valor nutricional, explicam sua ampla aplicação como principal ingrediente de rações animais, além do uso na culinária humana (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Na indústria, o milho pode originar diversos subprodutos. Seu óleo pode ser usado diretamente para consumo humano ou ainda compor margarina e maionese. O amido pode ser transformado em dextrina para adesivos e xaropes, dextrose para utilização em produtos enlatados, ou ainda em forma de frutose, utilizado como principal adoçante da indústria de doces e bebidas. (SEEDNEWS, 2007). A

importância do milho como ingrediente da dieta é evidente por participar em mais de 500 produtos alimentícios, tendo maior diversidade de aplicação em relação a outros cereais (FIGUEIRA et al., 2003). Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, o milho atualmente pode ser encontrado em quase todos os produtos, desde alimentícios até cosméticos, roupas, revistas, tintas, remédios, material escolar entre outros. (SEEDNEWS, 2007).

A produção do milho pode ser afetada de diversas maneiras, como pela utilização de cultivares pouco produtivas ou suscetíveis a doenças e pragas, por condições desfavoráveis de clima e solo e manejo inadequado da cultura e qualidade sanitária das sementes. Dentre as doenças, estas podem ser causadas por vírus, nematóides, bactérias e fungos. Grãos de milho podem ser infectados por fungos sob duas condições específicas: em pré-colheita, a partir de infecções da espiga, e em pós-colheita, durante o beneficiamento, armazenamento e transporte (EMBRAPA, 2005).

2.1.2 Grãos ardidos

O termo “grãos ardidos”, em fitopatologia, se refere aos grãos atacados por fungos. Porém, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA define “grãos ardidos” de uma forma mais abrangente, como sendo grãos atacados por patógenos e/ou que sofreram algum tipo de injúria que levou a alteração de cor, fermentação em toda área do germe ou em qualquer outra parte do endosperma. Os fungos podem causar redução do potencial de germinação, geração de focos de aquecimento e de migração de umidade na massa de grãos, aceleração das trocas químicas (DINIZ, 2002), redução nos conteúdos de carboidratos, proteínas e açúcares, perda de peso, descoloração e necrose (JULIAN et al., 1995). Dentre os fungos produtores de grãos ardidos em milho, estão *Drechslera zeicola*, *Cladosporium herbarum, Ustilago maydis, Nigrospora oryzae, Colletotricum graminicola*, *Cephalosporium* sp., *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris* sp., *Fusarium* spp., entre outros. Alguns fungos, além de produzirem grãos ardidos, também são capazes de produzir micotoxinas em grãos infectados no campo ou durante o armazenamento, como *Stenocarpella maydis, Stenocarpella macrospora*, *Fusarium verticillioides, F. proliferatum, F. subglutinans, F. graminearum, F. sporothichioides, Penicillium*

oxalicum, Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, entre outros (EMBRAPA, 2005 e 2006; DESJARDINS, 2006). Estima-se que cerca de 10 a 30% dos grãos colhidos se percam por infecções promovidas pelo desenvolvimento de fungos anualmente (LINO et al., 2004).

2.1.3 Fungos micotoxigênicos

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos naturalmente por fungos filamentosos e que podem ser tóxicos para plantas, vertebrados e microorganismos (BENNET; KLICH, 2003). Esses compostos podem estar presentes no micélio ou nos esporos do fungo e têm sido associados à ocorrência de efeitos adversos em animais e humanos (BULLERMAN, 1979; D´MELLO; MacDONALD, 1997), cuja severidade depende da toxicidade do metabólito, da extensão à exposição ao mesmo, do estado nutricional do indivíduo e de efeitos sinergísticos com outros compostos aos quais o indivíduo está exposto (PERAICA et al., 1999). A presença de micotoxinas está principalmente associada a grãos como amendoim, pistache, nozes, castanhas, semente de algodão, milho, trigo, soja, arroz, feijão, cacau, sorgo, centeio, café, cevada, entre outras, mas também podem ser encontradas em frutas, leite e produtos lácteos, ovos, produtos cárneos curados e embutidos, frutas secas, chás e pimentas (DINIZ, 2002). É importante ressaltar que a presença de um fungo toxigênico no grão não implica necessariamente na produção de micotoxinas, uma vez que a produção destes compostos está intimamente relacionada à capacidade de biossíntese do fungo e das condições ambientais predisponentes, como alternância das temperaturas diurna e noturna (EMBRAPA, 2005). O fator umidade é considerado o mais relevante para o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas, uma vez que a presença de água disponível é uma condição essencial para o crescimento destes organismos. Desse modo, na conservação de grãos é empregado o processo de secagem, que visa reduzir o teor de umidade para 14 a 22%. Os fungos crescem numa faixa de pH que varia de 2 a 8 e algumas micotoxinas são produzidas em pH entre 5 e 7. Outro fator que influencia na produção de micotoxinas é a composição química do alimento. Em geral, alimentos com alto teor de carboidrato são mais favoráveis para a produção de micotoxinas, embora outros compostos como lipídios, presença de glicerina e traços de metais como molibdênio, zinco, manganês e ferro

também favoreçam a produção de algumas toxinas. Condições microaerofílicas retardam o crescimento do fungo e podem chegar a inibir completamente seu desenvolvimento. Outro importante fator que influencia na produção de toxinas é a temperatura. A temperatura ótima para o crescimento do fungo geralmente coincide com a de mais alta produção de toxina, em geral variando de 20 a 30℃, podendo-se considerar a temperatura mínima de 3 a 7℃. Em casos de armazenamento de produtos agrícolas a baixas temperaturas, fungos psicrófilos poderão crescer e assim elevar a temperatura em determinados pontos, oferecendo condições propícias para uma contaminação secundária (DINIZ, 2002).

Dentre as espécies de fungos produtoras de micotoxinas estão aquelas afiliadas aos gêneros *Aspergillus (A. flavus, A. parasiticus, A. ochraceus), Penicillium (P. viridicatum, P. cyclopium, P. expansum), Fusarium (F. culmorum, F. graminearum, F. sporotrichioides, F. poae, F. verticillioides, F. proliferatum, F. oxysporum), Acremonium (A. coenophialum, A. lolii), Phomopsis leptostromiformis, Pithomyces chartarum, Alternaria sp.* (D´MELLO; MacDONALD, 1997). Essas espécies sintetizam diferentes micotoxinas, sendo que as mais importantes sob ponto de vista da saúde humana, saúde animal e produtividade são os tricotecenos, zearalenona, aflatoxinas, ocratoxinas e fumonisinas (GONZALEZ et al., 2001), estas últimas objeto de estudo do presente projeto.

A FAO / World Health Organization (WHO) estima que 25% de toda a produção de grãos do mundo esteja contaminada com micotoxinas (LINO et al., 2004) e os principais fungos envolvidos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (ONO et al., 2006).

2.1.4 Fumonisinas

As principais micotoxinas da cultura do milho são as fumonisinas (RICHARD, 2007), toxinas estas produzidas principalmente por fungos do gênero *Fusarium* mas também por *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (CHEN et al., 1992, RHEEDER et al., 2002). As fumonisinas foram descritas pela primeira vez em 1988 por W. C. A. Gerderblom et al., e desde então foram identificados 28 análogos de fumonisina, divididos em quatro grupos principais identificados como séries A, B, C e P (RHEEDER et al., 2002).

O nome fumonisina deriva de *Fusarium moniliforme* (atualmente denominado *F. verticillioides*), de onde o primeiro membro desta classe de compostos tóxicos, fumonisina B_1 (FB_1), foi caracterizado. Trata-se de um diester de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico e 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-pentahidroxieicosano. A esta classe pertencem também outros dois membros, FB_2 e FB_3, que se distinguem pela ausência de grupos livres de hidroxila (DESJARDINS, 2006). Dentre as fumonisinas, as da série B (FB_1, FB_2 e FB_3) são as de ocorrência mais freqüente e as mais importantes do ponto de vista toxicológico. Já dentro da série B, a FB_1 é a fumonisina mais encontrada e em maiores níveis, sendo responsável por 70 a 80% do total de fumonisinas (RHEEDER et al., 2002). Fumonisina B_4, a qual apresenta falta dos dois grupos de hidroxila livre na ponta da cadeia é um metabólito de menor importância. As fumonisinas da série C (C_1, C_2 e C_3), as quais não apresentam o grupo metil terminal das fumonisinas do grupo B, são as fumonisinas predominantemente produzidas por uma cepa de *Fusarium oxysporum* mas também são produzidas em quantidades mínimas por outras espécies. Outros metabólitos menores incluem as fumonisinas da série P (P_1, P_2 e P_3), nas quais o grupo amino é substituído por um grupo -3 hidroxipiridínio; as fumonisinas da série A, as quais são *N-acetil* amidos das fumonisinas da série B; e a AK- fumonisina B_1, a qual contém um grupo *N-acetil* e um grupo keto C-15. A maioria das fumonisinas que não pertencem à série B são metabólitos menores que podem ser produzidos sob condições ótimas de cultivo no laboratório, porém não ocorrem em níveis significativos em grãos naturalmente contaminados (DESJARDINS, 2006).

A via biossintética de fumonisina em *Fusarium verticillioides* começa com a síntese de um composto policetônico e condensação com um aminoácido, seguida de cinco oxigenações e duas esterificações. A biossíntese de fumonisina também requer a expressão de uma rede de genes regulatórios, porém estes ainda não foram relatados. Tanto a biossíntese de fumonisina como o crescimento de *F. verticillioides* são afetados pelo gene *fcc1*, que codifica um fator de transcrição, como pelo gene *pac1*, que é um regulador de pH. Análise genética mendeliana de *F. verticillioides* sugere que pelo menos três loci envolvidos na biossíntese de fumonisina estão fortemente ligados. Esta hipótese preliminar foi confirmada em 1999, quando um cluster de 15 genes co-reguladores da biossíntese de fumonisina foi identificado no grupo 1 de ligação do mapa genético de *F. verticillioides* (DESJARDINS, 2006).

Um cluster de genes responsáveis pela biossíntese de fumonisina foi identificado recentemente em *F. proliferatum*. Os clusters de genes de *F. proliferatum* e *F. verticillioides* possuem similaridade, no que tange a conservação do número de genes, ordem e orientação. Por outro lado, os 15 genes apresentam média similaridade entre espécies, com 77-89% de identidade em nível de aminoácido. As regiões das extremidades dos agrupamentos gênicos são completamente diferentes, exceto por 2 kb adjacentes ao gene *fum1*.

O gene fumonisina policetônico sintase (*fum1*) de *F. verticillioides* foi primeiramente isolado como *fum5* por meio de PCR com primers degenerados de policetônico sintase (*PKS*) e cDNA preparado de cultura produtora de fumonisina. Embora *fum5* tenha sido o primeiro gene de produção de fumonisina a ser clonado, ele foi designado *fum5* devido aos locos *fum1-4* previamente identificados por análise genética mendeliana de variantes de *F. verticillioides* não produtores de fumonisina B_1. Subseqüentemente, análises complementares revelaram que *fum5* e o meioticamente definido locus *fum1* de variantes naturais não produtoras de fumonisina do Nepal e dos Estados Unidos eram o mesmo gene, agora designado *fum1*.

Fumonisina policetônico sintase é uma policetônico sintase interativa tipo 1, com sete domínios funcionais (cetoacilsintase, aciltransferase, acil carregadora de proteína, cetoacilredutase, deidratase, metiltransferase e enoilredutase) presente em um único produto de tradução. O *fum1* contém todos os três domínios funcionais (cetoacilredutase, deidratase e enoilredutase) requerida para reduzir completamente β-carbonis em carbonos saturados. A desativação do gene *fum1* resulta em uma redução de mais de 99% de produção de fumonisina na cultura, sem o acúmulo de intermediários de fumonisina detectáveis. Isso mostra que a policetônico sintase decodificada pelo gene *fum1* catalisa o primeiro passo da biossíntese de fumonisina. A desativação de outros genes que também estão envolvidos em diferentes etapas da formação da fumonisina promove a redução da mesma, porém em menores quantidades do que a promovida pela desativação do gene *fum1* (DESJARDINS, 2006).

Quinze espécies de *Fusarium* foram relatadas como produtoras de fumonisinas, sendo oito pertencentes à Seção *Liseola* (*F. verticillioides* mating population A; *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. subglutinans sensu lato* isolado de semente de teosinte, *F. thapsinum thophilum* e *F.*

globosum). Outras cinco espécies estão na Seção proposta *Dlaminia* (intimamente ligada à Seção *Liseoa*): *F. nygamai* MP-G, *F. dlamini* e *F. napiforme*. Traços de fumonisina foram detectados em cultivos de materiais de duas espécies recentemente descritas, *F. andiyazi* e *F. pseudonygamai*. As duas espécies produtoras de fumonisina restantes se encontram uma na seção *Elegans* (*F. oxysporum*) e uma na Seção *Arthrosporiella* (*F. polyphialidicum*). Os registros de que algumas espécies de *F. oxysporum* var. *redolens* e *F. polyphialidicum* produzem fumonisinas precisam ser confirmadas por verificação taxonômica das espécies em questão assim como a verificação da fumonisina produzida (RHEEDER et al., 2002). A produção de fumonisina é aparentemente ausente em espécies do complexo *F. solani* e de todas as espécies produtoras de tricotecenos: *F. acuminatum, F. armeniacum, F. camptoceras, F. compactum, F. crookwellense, F. culmorum, F. equiseti, F. graminearum, F. kyushuense, F. poae, F. pseudograminearum, F. sambucinum, F. semitectum, F. sporotrichioides* e *F. venenatum* (DESJARDINS, 2006).

Os principais produtores de fumonisinas FB_1, FB_2 e FB_3 são *F. verticillioides* e *F. proliferatum* devido ao alto nível de produção total, ampla distribuição geográfica, ocorrência freqüente em milho e associação com conhecidas micotoxicoses animais (RHEEDER et al., 2002). Espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisina podem infectar uma ampla variedade de culturas e também podem ocorrer em alimentos e ração. Na prática, o milho é a fonte mais importante de contaminação por fumonisina em dietas humanas e animais. Fumonisinas podem contaminar o grão no campo quando as condições ambientais são favoráveis à infecção por fungo e seus níveis podem aumentar se as condições de armazenamento forem favoráveis ao crescimento do fungo e à produção de fumonisina (DESJARDINS, 2006).

2.1.5 Micotoxicoses

As micotoxicoses (doenças causadas por micotoxinas) são conhecidas há mais de 2000 anos, sendo que a micotoxicose mais notória é o ergotismo, causada pelo consumo de cereais (principalmente cevada) infectados com escleródios de *Claviceps purpúrea*, que produz alcalóides de ergot. Na Idade Média, o ergotismo alcançou proporções epidêmicas, mutilando e matando milhares de pessoas na Europa. A toxicose também era conhecida como “fogo de Santo Antônio”, pois

naquela época acreditava-se que uma peregrinação ao santuário de Santo Antônio traria alívio para a intensa sensação de queimação que as pessoas doentes experimentavam. As vítimas eram expostas ao ácido lisérgico (LSD), um alucinógeno, produzido durante o preparo de pães feitos com farinha contaminada com ergot (PERAICA et al., 1999).

O interesse pelas micotoxinas aumentou em 1960, quando 100.000 perus morreram de necrose aguda do fígado e hiperplasia do ducto da bile na Inglaterra após consumirem amendoins infectados com *Aspergillus flavus*. A pesquisa que seguiu esse evento levou à identificação e isolamento das aflatoxinas (D´MELLO; MacDONALD, 1997).

2.1.6 Micotoxicoses causadas por fumonisinas

A contaminação de alimentos e rações por fumonisina tem sido associada a doenças de origem hepatotóxicas e nefrotóxicas para a maioria das espécies animais testadas. Estão associadas à leucoencefalomalácia (ELEM) em cavalos, edema pulmonar em suínos (PPE) e toxicidade renal e hepatotoxidade em ovelhas, ratos e coelhos. Epidemiologicamente, as fumonisinas têm sido relacionadas ao câncer esofágico, sendo classificadas pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como possíveis carcinogênicos para o homem (grupo 2B). Essas micotoxinas têm uma estrutura química análoga à da esfinganina, e essa semelhança sugeriu inicialmente que o efeito tóxico das fumonisinas poderia estar relacionado com alterações no metabolismo dos esfingolipídeos, compostos presentes nas membranas celulares onde desempenham papel importante no crescimento, diferenciação e morte das células. Além disso, são citotóxicas, inibem a síntese protéica e do DNA e interrompem o ciclo celular (LINO et al., 1999 e 2006). De fato, hoje se sabe que estas toxinas inibem a enzima dihidroceramida sintase, responsável pelo terceiro passo da via da biossíntese *de novo* dos esfingolipídeos que catalisa a conversão de acetil-CoA e esfinganina em dihidroceramida. Esta inibição leva ao acúmulo de esfinganina, que é altamente tóxica, e a uma depleção de esfingolipídeos complexos, resultando em alterações nas estruturas de membranas e nas funções de receptores, como por exemplo de receptor de folato (MERRIL, 2002).

2.1.7 Doenças relacionadas ao consumo de fumonisinas no mundo

Estudos mostram que em algumas regiões do mundo a incidência de câncer esofágico em humanos é maior que em outras e isso possivelmente se deve à alta freqüência de *Fusarium* e fumonisinas em alimentos básicos das populações dessas áreas. Desde 1955, uma alta incidência de câncer esofágico tem sido observada em populações rurais na região de Transkei (África do Sul), onde o milho é a principal fonte de alimento. No distrito de Kentani, entre 1955 e 1990, a incidência de câncer esofágico (incidência em idade padronizada por 100,000 indivíduos por ano) variou entre 16 a 30 para mulheres e de 40 a 56 para homens. Para Kentani e outros três distritos adicionais, a incidência média foi de 36 para mulheres e 77 para homens. Para comparação, a incidência média de câncer esofágico para mulheres e homens nos Estados Unidos tem sido consistentemente menor que 10 para 100,000 habitantes por ano (DESJARDINS, 2006). Fumonisina B_1 também foi encontrada mais freqüentemente e em maiores concentrações em milho de regiões da China e Itália. Nessas regiões o milho é alimento base e onde foram relatadas maiores incidências de câncer esofágico em comparação a outras regiões. Outro estudo, realizado comparando concentrações de aflatoxina B_1, deoxinivalenol e fumonisinas B_1, B_2 e B_3 de duas diferentes regiões da China e suas incidências de câncer hepático, mostrou que a incidência da doença foi maior nas áreas onde as concentrações de fumonisina e deoxinivalenol foi maior nas amostras de milho analisadas e, apesar dos resultados serem inconclusivos, os autores do estudo levantaram a hipótese de que as fumonisinas, as quais conhecidamente têm atividade promotora de câncer de fígado em ratos, junto com o deoxinivalenol, promovem a lesão inicial causada por aflatoxina B_1 (PERAICA et al., 1999).

Altos níveis de consumo de fumonisinas também podem estar associados à defeitos no tubo neural em recém nascidos. Um estudo realizado na região do Vale do Rio Grande, no estado do Texas e na divisa dos Estados Unidos com o México, constatou a alta incidência de leucoencefalomalácia em cavalos da região. Coincidentemente, na mesma região e na mesma época (1990 e 1991), muitas mulheres americanas de origem mexicana deram a luz a crianças com defeitos no tubo neural. Foi constatado que nos anos do estudo o milho continha altos níveis de fumonisina e, devido ao fato de culturalmente os hispano-americanos consumirem grande quantidade de milho, os problemas com os recém-nascidos poderiam estar

associados à exposição das gestantes ao consumo de milho contaminado com fumonisinas. A média da incidência de defeitos no tubo neural, incluindo espinha bífida e anencefalia, foi de 29 por 10.000 nascimentos na região estudada, enquanto a incidência típica nos Estados Unidos é de 9-16 para americanos de origem mexicana e 5-6 para brancos não-hispânicos e afro-americanos (DESJARDINS, 2006). Em 1995, um levantamento sobre o consumo de tortilhas e quantidades de fumonisina foi conduzido na Guatemala, com comunidades Maias tipicamente rurais localizadas em região montanhosa central. Os níveis encontrados foram bastante altos e, em 2000, estudos clínicos conduzidos em hospitais nacionais e regionais constataram altos índices de defeitos no tubo neural em recém nascidos. Em algumas regiões, a incidência foi extremamente alta, como em Quetzaltenango, onde a média de ocorrências foi de 106 em 10,000 nascimentos. Na região rural de Transkei, África do Sul, foram encontradas incidências de defeitos no tubo neural de 61 a cada 10,000 nascimentos, contrastando com as incidências de regiões urbanas como Cidade do Cabo (1,06/10,000), Pretoria (0,99/10,000) e Johanesburgo (1,18/10,000). Alta incidência também foi observada em províncias de regiões rurais da China (57 a 73/10,000). Os habitantes dessas regiões possivelmente são expostos periodicamente a uma contaminação causada por fungos presentes no milho (MARASAS et al., 2003).

2.1.8 Doenças relacionadas ao consumo de fumonisinas no Brasil

No Brasil, as primeiras análises sobre níveis de contaminação de amostras de ração de milho associados à epidemia de leucoencefalomalácia eqüina se deram entre 1985 e 1990 (SYDENHAM et al., 1992), evidenciando que contaminação por fumonisinas é um problema também no Brasil. Trabalhos posteriores, embora em número reduzido, confirmaram a extensão do problema. Orsi et al. (2000) relataram freqüências de 90,2% e 97,4% de contaminação por FB_1 e FB_2 em amostras de grãos armazenados de milho híbrido. Vargas et al. (2001) analisaram 214 amostras de milho não processado coletadas em armazéns de diferentes localidades do país e encontraram níveis variando de 200 a 6100 µg/kg de FB_1 em 99% das amostras. Ono et al. (2006) chegaram a resultados similares ao relatarem níveis de 130 a 20.380 µg/kg de fumonisinas em 109 amostras de milho coletadas no Paraná. Finalmente, de Castro et al. (2004) mostraram que a contaminação não se restringe

a grãos e se estende aos produtos processados derivados de milho. Os autores analisaram teores de FB_1 e FB_2 em diferentes produtos coletados em 13 cidades do estado de São Paulo e encontraram contaminação em 100% de amostras de cereal infantil tipo C (composto por farinha de milho, açúcar, amido, sal e outros sais minerais, aromatizantes e traços de glúten), de alimento infantil instantâneo à base de milho e de mingau de milho. Os valores médios totais variaram de 437 a 2.242 µg/kg.

2.1.9 Recomendações máximas aceitáveis de consumo de fumonisina nos E.U.A e Comunidade Européia

O Food and Drug Administration (FDA) recomenda que milho moído, limpo e seco destinado para consumo humano não contenha mais de 2 a 4 µg de fumonisinas totais (FB_1, FB_2 e FB_3) por grama (FAO). As orientações para níveis aceitáveis de fumonisinas (somatória de FB_1, FB_2) propostos recentemente pela Comunidade Européia variam de acordo com os diferentes destinos do milho. O teor aceito de fumonisinas em milho não transformado é de 4 µg/g; em milho ou alimentos à base de milho para consumo direto humano é de 1 µg/g; em cereais e pequenas refeições à base milho é de 0,8 µg/g; em alimentos transformados à base de milho e alimentos destinados para lactentes e crianças jovens é de 0,2 µg/g. O teor de fumonisinas em frações de moagem do milho e outros produtos da moagem do milho não destinados ao consumo humano direto com partículas de dimensões maiores de 500 mícron (35 mesh) é de 1,4 µg/g e para partículas maiores de 500 mícron é de 2 µg/g (CE, 2007).

2.1.10 Detecção imunológica de micotoxinas

Os métodos analíticos convencionais para micotoxinas incluem cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta performance e cromatografia gasosa. Estes métodos analíticos podem ser usados em amostras de alimentos ou rações e seus resultados são obtidos após horas ou dias. Devido à alta competitividade entre as indústrias de alimentos e rações, estas são forçadas a adotar métodos mais econômicos, simples e que forneçam resultados rápidos. Desta forma, os métodos rápidos de análise de micotoxina têm se tornado importantes

(ZHENG et al., 2006). A indústria alimentar utiliza ensaios imunológicos devida à sua relativa simplicidade, boa reprodutibilidade e elevada sensibilidade (LINO et al., 2006). A tecnologia empregada no método ELISA é baseada na habilidade de um anticorpo específico distinguir a estrutura tri-dimensional de uma micotoxina específica. O ELISA competitivo direto é o mais comumente utilizado para análise de micotoxina. A maioria dos kits comerciais disponíveis para micotoxinas trabalha com a fase cinética da ligação anticorpo – antígeno, o que reduz o tempo de incubação normalmente de 1 a 2 horas para alguns minutos. A redução do tempo de incubação pode levar a alguma perda de sensibilidade do ensaio, no entanto, o kit pode prover resultados precisos e reproduzíveis. Os kits de teste de ELISA são satisfatórios, pois requerem pouco volume de amostra e normalmente poucos procedimentos de purificação quando comparados aos métodos de cromatografia de camada delgada e cromatografia líquida de alta performance. São rápidos, simples, específicos, sensíveis e portáteis para uso no campo ou para detecção de micotoxinas em alimentos e rações (ZHENG et al., 2006).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Vegetal

Amostras de aproximadamente 1 kg de grãos de milho híbrido da primeira e segunda safra dos anos de 2006 e 2007 foram obtidas junto a armazéns de diferentes regiões do Brasil através da rede de Técnicos de Desenvolvimento de Produtos da empresa Dow AgroSciences S.A. A umidade dos grãos foi reduzida para 13% e as amostras foram mantidas em câmara fria a 4ºC até o momento do processamento.

As amostras foram identificadas de acordo com o nome do armazém de origem, localização, ano de produção e a estimativa de grãos ardidos em porcentagem no momento da coleta. A classificação dos grãos ardidos foi baseada na definição do Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA, que define grãos ardidos como grãos atacados por patógenos e/ou que sofreram algum tipo de injúria que leva a alteração de cor, fermentação em toda área do germe ou em qualquer

outra parte do endosperma. Desta forma, os grãos que apresentaram essas características foram separados para o trabalho.

2.2.2 Avaliação da incidência de *Fusarium* spp. em grãos ardidos

A primeira etapa do trabalho consistiu na avaliação da incidência de *Fusarium* spp. nas amostras através do método do papel de filtro com congelamento (LUCCA FILHO, 1987; BRASIL, 1992). Duzentos grãos ardidos de cada amostra foram analisados em placas de petri de plástico de 9 cm de diâmetro (10 grãos por placa) sobre três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada e incubados em câmara de germinação a uma temperatura de 20° ± 2℃ por 24 horas sob luz branca fluorescente e regime de 12 h de luz/12 h de escuro. Em seguida, os grãos foram colocados em congelador a -18℃ por mais 24 horas para impedir a germinação do embrião. Após o tratamento térmico, as amostras foram colocadas novamente em câmara de germinação por mais 5 dias sob as mesmas condições (MORAES, et al., 2003). Ao final, os grãos foram analisados individualmente sob microscópio estereoscópico, avaliando-se a incidência de *Fusarium* spp. com base em suas características morfológicas: coloração do micélio (branca ou rosada) e formato dos conídios.

2.2.3 Obtenção de isolados monospóricos de *Fusarium* spp.

Isolados primários de *Fusarium* spp. foram obtidos de grãos ardidos através da transferência de estruturas fúngicas para meio BDA e incubação por aproximadamente 5 dias. Os isolados foram transferidos para novas placas para eliminar contaminações. Culturas monospóricas foram obtidas a partir destas colônias após o cultivo do fungo por um período de 7 a 10 dias a 20 ± 2℃ sob regime de 12h luz/12h escuro. Com o auxílio de uma agulha previamente esterilizada, as colônias foram levemente tocadas para obtenção de alguns esporos e em seguida esses foram diluídos em tubos eppendorf de 1,5mL contendo 1,0mL de água destilada estéril. Após agitação dos tubos, 20µL da suspensão de esporos

foram plaqueados com auxílio de alça de drigalsky em novas placas de petri contendo meio ágar-água. Após aproximadamente 24 horas, os conídios começaram a germinar espaçadamente, possibilitando que, com auxílio de microscópio esteroscópico, apenas um deles fosse retirado e transferido para nova placa contendo meio BDA. Estes foram incubados a 20℃ sob regime de 12h luz/12h escuro por 7 – 10 dias e, após o período de crescimento, de 4 a 5 discos de 5 mm de diâmetro de meio contendo micélio e esporos foram retirados da placa e transferidos para vidros de penicilina contendo água destilada esterilizada para armazenamento. O micélio restante foi utilizado para extração de DNA.

2.2.4 Extração de DNA de isolados monospóricos de *Fusarium* spp.

DNA dos isolados monospóricos foi extraído segundo o protocolo de Edward et al. (1991) com modificações. Após o cultivo em placas de petri por aproximadamente 7 -10 dias, micélio foi retirado com auxílio de agulha previamente esterilizada e transferido para tubo eppendorf de 1,5mL contendo 600 µL de tampão de extração (200 mM de Tris – HCl pH 8,5; 200 mM de NaCl; 25 mM de EDTA e 0,5% de SDS). A solução foi agitada em vortex por 1 minuto e em seguida centrifugada por 5 minutos a 20℃ e 13.000 rpm em microcentrífuga. Após a centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram retirados com auxílio de micropipeta e transferidos para novo tubo, contendo 600 µL de isopropanol 100% gelado, para a precipitação do DNA. O tubo foi então invertido delicadamente por 2-4 vezes e deixado em congelador a -20ºC por 30 minutos. Após este período, o tubo foi novamente centrifugado por mais 15 minutos em microcentrífuga refrigerada a 5℃ e 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pelete lavado com 600 µL de etanol 100%. Após 1 minuto, o etanol foi descartado e o tubo contendo DNA foi colocado em estufa a 37℃ por aproximadamente 20 minutos para secagem do álcool (ou aproximadamente 1 hora em temperatura ambiente). Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em uma solução de TE pH 8,0 com RNAse (10mM de Tris – HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0, 10 µg / mL RNAse) e incubado novamente em estufa a 37℃, por uma hora, para digestão do RNA.

2.2.5 Reações polimerásicas em cadeia (PCRs) para confirmação de gênero e espécie e para avaliação do potencial toxigênico em isolados monospóricos de *Fusarium* spp.

Todos os isolados foram submetidos a cinco reações de PCR. A primeira teve o propósito de confirmar se os isolados obtidos pertenciam ao gênero *Fusarium* através de primers desenvolvidos baseados em seqüências inter-gênicas. Três outras reações tiveram como objetivo identificar as espécies *Fusarium verticillioides, Fusarium proliferatum* e *Fusarium subglutinans* através de pares de primers desenvolvidos baseados na seqüência parcial do gene calmodulina. A quinta objetivou identificar isolados com potencial de produção de fumonisinas através de primers específicos para identificação do gene *FUM5*. Todas as amostras que tiveram resultado negativo em qualquer uma das PCRs foram submetidas a uma nova reação para confirmação dos resultados.

O PCR para confirmação de gênero seguiu o protocolo proposto por Jurado et al. (2006) com modificações. O volume total das reações de amplificação foi de 20 µL, contendo 3,0 µL de DNA (200 ng), 1,0 µL de cada primer a uma concentração de 10 µM (FUS-R: 5' GGCGAAGGACGGCTTAC 3' e Fps-F: 5' CGCACGTATAGATGGACAAG 3'), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL (Fermentas), 2,0 µL de Buffer 10X (Fermentas), 1,6 µL de $MgCl_2$ 25mM, 0,4 µL de dNTPs 10mM e 10,8 µL de água. O protocolo de amplificação para a PCR foi de 1 ciclo inicial de 2 minutos a 95℃ (desnaturação), seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95℃ (desnaturação), 1 minuto a 53℃ (anelamento) e 45 segundos a 72℃ (extensão), e um ciclo final de 5 minutos a 72 ℃. Para essa reação, o tamanho do produto de PCR esperado é de 200 pb (JURADO et al., 2006).

As reações para identificação de espécies seguiram o protocolo proposto por Mulè et al. (2004) com modificações. O volume total das reações de amplificação foi de 15 µL, contendo 1,0 µL de DNA (5 ng), 0,45 µL de cada primer a uma concentração de 10 µM (*F. verticillioides* - VER1: 5' CTTCCTGCGATGTTTCTCC 3' e VER2: 5' AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA 3'; *F. proliferatum* - PRO1: CTTTCCGCCAAGTTTCTT 3' e PRO2: 5' TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG 3'; *F. subglutinans* – SUB1 5' CTGTGCCTAACCTCTTTATCCA 3' e SUB2 5' CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA 3'), 0,125 µL de *Taq* DNA polimerase

5U/µL (Fermentas), 1,5 µL de Buffer 10X (Fermentas), 1,2 µL de $MgCl_2$ 25mM, 0,3 µL de dNTPs 10mM e 9,9 µL de água. O protocolo de amplificação foi de 1 ciclo inicial de 5 minutos a 95℃ (desnaturação), seguido de 35 ciclos de 50 segundos a 94℃ (desnaturação), 50 segundos a 55℃ (anelamento) e 1 minuto a 72℃ (extensão), e um ciclo final de 7 minutos a 72℃. P ara essas reações, o tamanho do produto de PCR esperado para *Fusarium verticillioides* é de 578pb, para *Fusarium proliferatum* é de 585pb e para *Fusarium subglutinans* é de 631pb (MULÈ et al., 2004).

A reação polimerásica PCR para identificar os isolados com potencial de produção de fumonisina seguiu o protocolo proposto por Bluhm et al. (2002) com modificações. O volume total das reações foi de 20 µL, contendo 2,0 µL de DNA (200 ng), 0,8µL de cada primer a uma concentração de 10 µM (Fum5F: 5' GTCGAGTTGTTGACCACTGCG 3' e Fum5R: 5' CGTATCGTCAGCATGATGTAGC 3'), 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL (Fermentas), 2,0 µL de Buffer 10X (Fermentas), 1,6 µL de $MgCl_2$ 25mM, 0,4 µL de dNTPs 10mM e 11,9 µL de água. O protocolo de amplificação para a PCR foi de 1 ciclo inicial de 2 minutos a 94℃ (desnaturação), seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 93℃ (desnaturação), 1 minuto a 56℃ (anelamento) e 1 minuto a 72℃ (exten são), finalizando com 1 ciclo de 10 minutos a 72℃. Para essa reação, o tamanho d o produto de PCR esperado é de 850 pb (BLUHM et al., 2002).

2.2.6 Identificação morfológica de *Fusarium* spp.

Embora todos os isolados tenham sido submetidos à identificação genética para gênero e para espécies através de PCR, alguns foram negativos em todas as reações e, por esse motivo, estes foram analisados com base em características morfológicas sob duas condições: crescimento em meio SNA (synthetic nutrient-poor agar) e em microcultura (COUTO; GONÇALVES, 2007). Nestes casos, os isolados preservados foram plaqueados em meio BDA e mantidos em câmara de crescimento por 3 dias a 20 ± 2℃ sob regime de 12h luz/12h esc uro. Ao final do terceiro dia, estruturas fúngicas foram transferidas para placas de petri contendo meio SNA e também utilizadas para inoculação no preparo de microculturas. A microcultura foi

feita utilizando-se 1 cubo de meio SNA disposto em lâmina de microscopia óptica. Em cada lado dos cubos, esporos fúngicos foram inoculados com auxílio de agulha esterilizada, cobertos com lamínula e mantidos dentro de placa de petri de vidro fechada contendo papel de filtro umedecido por 3 dias em câmara de crescimento sob as mesmas condições descritas anteriormente. Passado o período de incubação, as estruturas fúngicas produzidas em microcultura foram visualizadas sob microscópio óptico.

2.2.7 Quantificação de fumonisinas em amostras de grãos ardidos

Os testes para quantificação dos níveis de fumonisinas foram feitos pelo método ELISA, utilizando-se o kit Myco Fumonisin™ (Strategic Diagnostics Inc., E.U.A.). Este kit é aprovado pelo GIPSA (Grain Inspection, Packers and Stokyards Administration), agência atrelada ao USDA (United States Department of Agriculture) nos Estados Unidos. O teste consiste em um ensaio competitivo imuno-solvente onde a toxina livre extraída da amostra compete com a toxina conjugada à enzima (horseradish peroxidase – HRP) na ligação com anticorpos nos poços da placa. O teste é calibrado para uma mistura de fumonisina B_1, B_2 e B_3 na razão 5:2:1, respectivamente.

O primeiro passo para essa análise consistiu na moagem das amostras a 20 mesh. Após mistura para homogeneização, uma sub-amostra de 500g foi separada e, a partir desta, uma alíquota de 20g foi pesada em erlenmeyers para a realização do teste. A extração das fumonisinas das amostras foi realizada em 100 mL de uma solução de metanol 70%. Em seguida, as amostras foram agitadas em agitador orbital a 28 rpm por 25 minutos e, ao término dessa etapa, os extratos permaneceram sem agitação por 2 a 3 minutos, para decantação. Passado esse tempo, 15 mL do extrato foi filtrado com filtro tipo Whatman® #1 e recolhido em tubo Falcon de 50 mL. O teste foi realizado com o filtrado final.

Alíquotas de 50 µL dos filtrados foram transferidos para poços de placa ELISA revestidos com anticorpos anti-fumonisina. Estas foram brevemente agitadas e incubadas por 5 minutos. Após essa etapa, os poços foram lavados e secos. Uma solução contendo fluoróforo foi adicionada para reagir e se ligar com o conjugado enzima-toxina e nova agitação e incubação de 5 minutos foi realizada. Ao término da

incubação, uma solução de NaOH foi adicionada para parar a reação. Essas reações produziram uma coloração azul, sendo que quanto mais escura a reação, menos fumonisinas na amostra. Os resultados dos testes foram quantificados em leitor de ELISA Expert Plus da Asys Hitech GmbH (Áustria) com filtro de 650 nm. Todas as amostras foram feitas em duplicata e foi tirada uma média dos resultados.

2.2.8 Incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e concentração de fumonisinas em grãos assintomáticos

Grãos assintomáticos da 2ª safra de 2007 foram analisados separadamente para posterior comparação de resultados com os obtidos de grãos ardidos, uma vez que os grãos assintomáticos podem ser infectados com *Fusarium* spp. que, por sua vez, podem ou não produzir fumonisinas. Assim como com os grãos ardidos, os grãos assintomáticos foram analisados quanto à incidência de *Fusarium* spp, foram submetidos aos PCRs de gênero, espécies e potencial toxigênico e quantificação de fumonisinas conforme descrito anteriormente.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Incidência de *Fusarium* spp. em grãos ardidos

Um total de 100 amostras das primeiras e segundas safras dos anos de 2006 e 2007 foram recebidas das regiões Sul (52 amostras), Sudeste (18 amostras) e Centro-Oeste (30 amostras). Os resultados da avaliação da incidência de *Fusarium* spp., concentração de fumonisinas e porcentagem de grãos ardidos em todas as amostras se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 - Incidência de *Fusarium* spp. (%*Fusarium*) e concentração de fumonisinas (µg/g) em grãos ardidos coletados em amostras de grãos de armazéns comerciais segundo safra/ano e local de coleta e respectivas porcentagens de grãos ardidos nas amostras comerciais

(continua)

Amostra	Origem	Safra	% *Fusarium*	% grãos ardidos	[ ] Fumonisinas
LGM 1-1/06	Campo Mourão PR	1ª safra 2006	14	0,30	36

Tabela 1 - Incidência de *Fusarium* spp. (%*Fusarium*) e concentração de fumonisinas (µg/g) em grãos ardidos coletados em amostras de grãos de armazéns comerciais segundo safra/ano e local de coleta e respectivas porcentagens de grãos ardidos nas amostras comerciais

(continuação)

Amostra	Origem	Safra	% *Fusarium*	% grãos ardidos	[ ] Fumonisinas
LGM 2-1/06	Ivaiporã PR	1ª safra 2006	29	nd*	19,6
LGM 3-1/06	Pitanga PR	1ª safra 2006	39	0,5	> 90
LGM 4-1/06	Mamborê PR	1ª safra 2006	32	0,3	8,8
LGM 5-1/06	Palmeiras de Goiás GO	1ª safra 2006	56	14	22,3
LGM 6-1/06	Boa Esperança MG	1ª safra 2006	78	6	> 90
LGM 7-1/06	Rio Verde GO	1ª safra 2006	48	nd	> 90
LGM 8-1/06	Machado MG	1ª safra 2006	56	nd	> 90
LGM 9-1/06	Chapadão do Sul MS	1ª safra 2006	61	8	**
LGM 10-1/06	Chapadão do Sul MS	1ª safra 2006	42	6,3	> 90
LGM 11-1/06	Uberaba MG	1ª safra 2006	42	nd	> 90
LGM 12-1/06	Iraí de Minas MG	1ª safra 2006	53	nd	> 90
LGM 13-1/06	Primavera do Leste MT	1ª safra 2006	5	nd	**
LGM 14-1/06	Primavera do Leste MT	1ª safra 2006	85	nd	**
LGM 15-1/06	Campo Verde MT	1ª safra 2006	46	nd	41,6
LGM 16-1/06	Uberlândia MG	1ª safra 2006	54	nd	> 90
LGM 17-1/06	Campo Erê SC	1ª safra 2006	47	nd	**
LGM 18-1/06	Palmas PR	1ª safra 2006	62	nd	**
LGM 19-1/06	Rio Verde GO	1ª safra 2006	65	nd	**
LGM 20-1/06	Boa Esperança MG	1ª safra 2006	37	nd	> 60
LGM 21-1/06	Unaí MG	1ª safra 2006	65	nd	> 60
LGM 22-1/06	Tangará SC	1ª safra 2006	44	nd	12,2
LGM 23-1/06	Cristalina GO	1ª safra 2006	61	nd	> 60
LGM 24-1/06	Cristalina GO	1ª safra 2006	67	nd	> 60
LGM 25-1/06	Unaí MG	1ª safra 2006	90	nd	> 60
LGM 26-1/06	São Gabriel do Oeste MS	1ª safra 2006	84	nd	**
LGM 27-1/06	Capão Bonito SP	1ª safra 2006	100	nd	11,1
LGM 28-1/06	Capão Bonito SP	1ª safra 2006	22	nd	9,8
LGM 29-1/06	Capão Bonito SP	1ª safra 2006	58	nd	**
LGM 30-1/06	Capão Bonito SP	1ª safra 2006	20	nd	14,8
LGM 31-1/06	Uberaba MG	1ª safra 2006	58	nd	31,7
LGM 1-2/06	Sapezal MT	2ª safra 2006	47	nd	15,5
LGM 2-2/06	Sapezal MT	2ª safra 2006	82	nd	13,7
LGM 3-2/06	Londrina PR	2ª safra 2006	31	2	12,8
LGM 4-2/06	São Sebastião da Amoreira PR	2ª safra 2006	69	2	**
LGM 5-2/06	Campo Mourão PR	2ª safra 2006	26	5	22,9
LGM 6-2/06	Rondonópolis MT	2ª safra 2006	86	nd	**
LGM 7-2/06	Alto Graças MT	2ª safra 2006	79	nd	9,7
LGM 8-2/06	Guaira PR	2ª safra 2006	80	nd	**
LGM 9-2/06	Assis SP	2ª safra 2006	30	nd	8,9
LGM 10-2/06	Maracaí SP	2ª safra 2006	38	nd	**
LGM 11-2/06	São Gabriel do Oeste MS	2ª safra 2006	63	nd	**
LGM 12-2/06	Maracaú MS	2ª safra 2006	74	nd	**
LGM 13-2/06	Maracaú MS	2ª safra 2006	77	nd	**
LGM 14-2/06	Sindrolândia MS	2ª safra 2006	82	nd	**
LGM 1-1/07	Uberaba MG	1ª safra 2007	91	74	> 60

Tabela 1 - Incidência de *Fusarium* spp. (%*Fusarium*) e concentração de fumonisinas (µg/g) em grãos ardidos coletados em amostras de grãos de armazéns comerciais segundo safra/ano e local de coleta e respectivas porcentagens de grãos ardidos nas amostras comerciais

(continuação)

Amostra	Origem	Safra	% *Fusarium*	% grãos ardidos	[ ] Fumonisinas
LGM 2-1/07	Rio Verde GO	1ª safra 2007	63	46	17,1
LGM 3-1/07	Primavera do Leste MT	1ª safra 2007	55	49	20,3
LGM 4-1/07	Campo Erê SC	1ª safra 2007	43	37	14,3
LGM 5-1/07	Cleverlândia PR	1ª safra 2007	50	50	23
LGM 6-1/07	Palmasola SC	1ª safra 2007	26	46	11,9
LGM 7-1/07	Pitanga PR	1ª safra 2007	57	41	12,6
LGM 8-1/07	Tangará SC	1ª safra 2007	80	44	28,2
LGM 9-1/07	Água Santa RS	1ª safra 2007	9	55	6,2
LGM 10-1/07	Ciriaco RS	1ª safra 2007	20	64	12
LGM 11-1/07	Muitos Capões RS	1ª safra 2007	61	55	22,8
LGM 12-1/07	Rachadinho RS	1ª safra 2007	10	44	19,5
LGM 13-1/07	Santa Rosa RS	1ª safra 2007	12	67	9
LGM 14-1/07	São José do Ouro RS	1ª safra 2007	56	43	11,1
LGM 15-1/07	Serrania Cirrêia RS	1ª safra 2007	25	25	22,4
LGM 16-1/07	Vacaria RS	1ª safra 2007	10	87	14,9
LGM 17-1/07	Vila Maria RS	1ª safra 2007	20	46	8,7
LGM 18-1/07	Chapadão do Sul MS	1ª safra 2007	47	82	10,1
LGM 19-1/07	Campo Mourão PR	1ª safra 2007	68	62	9,8
LGM 20-1/07	São Sebastião da Amoreira PR	1ª safra 2007	42	67	5,6
LGM 21-1/07	Santa Mariana PR	1ª safra 2007	46	48	6,6
LGM 22-1/07	Ivaí PR	1ª safra 2007	70	86	4,4
LGM 23-1/07	Tibagi PR	1ª safra 2007	12	85	6,6
LGM 24-1/07	Cornélio Procópio PR	1ª safra 2007	46	73	4,4
LGM 25-1/07	Teixeira Soronez PR	1ª safra 2007	40	63	10
LGM 26-1/07	Quitandinha PR	1ª safra 2007	69	61	6,6
LGM 27-1/07	Ponta Grossa PR	1ª safra 2007	32	41	11,4
LGM 28-1/07	Cornélio Procópio PR	1ª safra 2007	1	47	> 60
LGM 29-1/07	Maringá PR	1ª safra 2007	63	70	6,85
LGM 30-1/07	Ponta Grossa PR	1ª safra 2007	39	59	6,85
LGM 31-1/07	Lapa PR	1ª safra 2007	40	32	8,8
LGM 32-1/07	Piraí do Sul PR	1ª safra 2007	58	45	5,7
LGM 33-1/07	Araucária PR	1ª safra 2007	63	73	5,5
LGM 34-1/07	Ventania PR	1ª safra 2007	58	42	10,5
LGM 35-1/07	Tibagi PR	1ª safra 2007	37	57	4,3
LGM 36-1/07	Missal PR	1ª safra 2007	43	82	4,8
LGM 37-1/07	Guarapuava PR	1ª safra 2007	31	37	27,4
LGM 38-1/07	Palmeira PR	1ª safra 2007	37	58	4,6
LGM 39-1/07	Araucária PR	1ª safra 2007	65	75	4,9
LGM 40-1/07	Quitandinha PR	1ª safra 2007	50	83	8,5
LGM 1-2/07	Rio Verde GO	2ª safra 2007	74	55	13,2
LGM 2-2/07	Rio Verde GO	2ª safra 2007	69	42	8,4
LGM 3-2/07	Santa Juliana MG	2ª safra 2007	87	41	5,2
LGM 4-2/07	Santa Juliana MG	2ª safra 2007	85	37	8,7
LGM 5-2/07	Chapadão do Céu GO	2ª safra 2007	80	50	4,6
LGM 6-2/07	São Gabriel do Oeste MS	2ª safra 2007	99	55	4,4

Tabela 1 - Incidência de *Fusarium* spp. (%*Fusarium*) e concentração de fumonisinas (µg/g) em grãos ardidos coletados em amostras de grãos de armazéns comerciais segundo safra/ano e local de coleta e respectivas porcentagens de grãos ardidos nas amostras comerciais

(conclusão)

Amostra	Origem	Safra	% *Fusarium*	% grãos ardidos	[ ] Fumonisinas
LGM 7-2/07	Chapadão do Sul MS	2ª safra 2007	96	52	9
LGM 8-2/07	Ponta Porã MT	2ª safra 2007	96	44	15,1
LGM 9-2/07	São Gabriel do Oeste MS	2ª safra 2007	99	51	19,5
LGM 10-2/07	Dourados MS	2ª safra 2007	80	55	6,5
LGM 11-2/07	Itambé PR	2ª safra 2007	79	51	10,7
LGM 12-2/07	Marialva PR	2ª safra 2007	70	52	46
LGM 13-2/07	Astorga PR	2ª safra 2007	80	43	11,9
LGM 14-2/07	São Sebastião da Amoreira PR	2ª safra 2007	69	45	6,5
LGM 15-2/07	Atalaia PR	2ª safra 2007	90	58	8,1

* nd = porcentagem de grãos ardidos na amostra original de não foi determinada.

** - concentração de fumonisinas não foi determinada.

Os resultados das incidências de *Fusarium* ssp. foram agrupados de acordo com as safras e anos de produção (Figura 1).

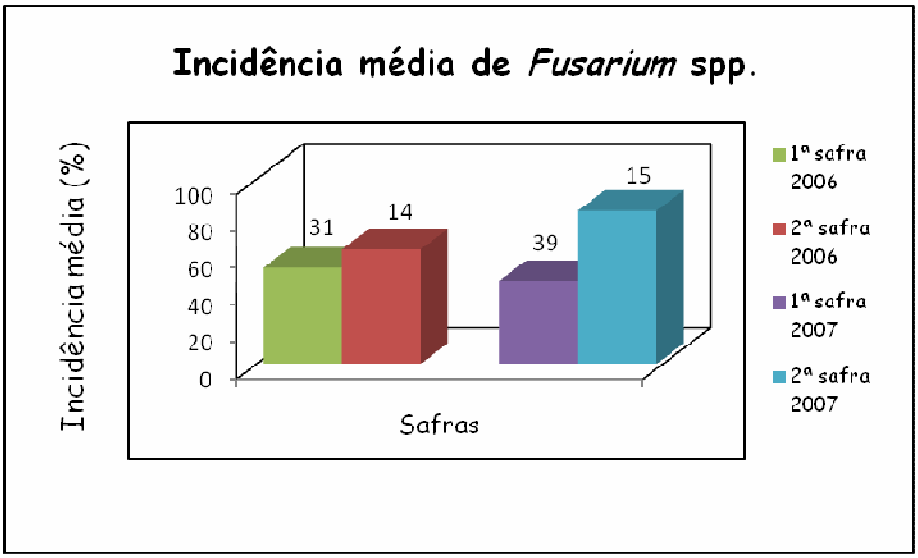

Figura 1 - Incidência de *Fusarium* spp. em grãos ardidos das primeira e segundas safras de 2006 e 2007. Os números sobre as barras representam a quantidade de amostras analisadas por safra

A incidência de *Fusarium spp*. variou entre as primeira e segundas safras do mesmo ano e entre as respectivas safras nos dois anos de estudo. Nos dois anos de

estudo a incidência média de *Fusarium* spp. foi maior na segunda safra em comparação com a primeira. No ano de 2006, a incidência na primeira safra foi de 52% e na segunda foi de 62%. No ano de 2007, a incidência na primeira safra foi de 45% na primeira safra e de 83% na segunda. Com relação às safras, na primeira safra de 2006 a incidência de *Fusarium* spp. foi maior do que a mesma safra de 2007 (52 e 45% respectivamente). Já nas segundas safras foi observado um aumento do ano de 2006 para 2007, de 62% para 83%.

2.3.2 Reações polimerásicas em cadeia (PCRs) para confirmação de gênero e espécie e para avaliação do potencial toxigênico em espécies de *Fusarium* spp.

As PCRs para gênero *Fusarium*, para as espécies *F. verticillioides, F. proliferatum* e *F. subglutinans* e para potencial de produção de fumonisina (gene *FUM5*) foram feitas com repetição (duplicata). Isolados que não puderam ser identificados com base em PCR foram analisados para características morfológicas. Os resultados de todas as PCRs estão na Tabela 2. Os resultados das PCRs para gênero estão na figura 2. A figura 5 exibe exemplos de reações polimerásicas em cadeia para gênero, *F. verticillioides* e *F. sublutinans* e presença do gene *fum*5.

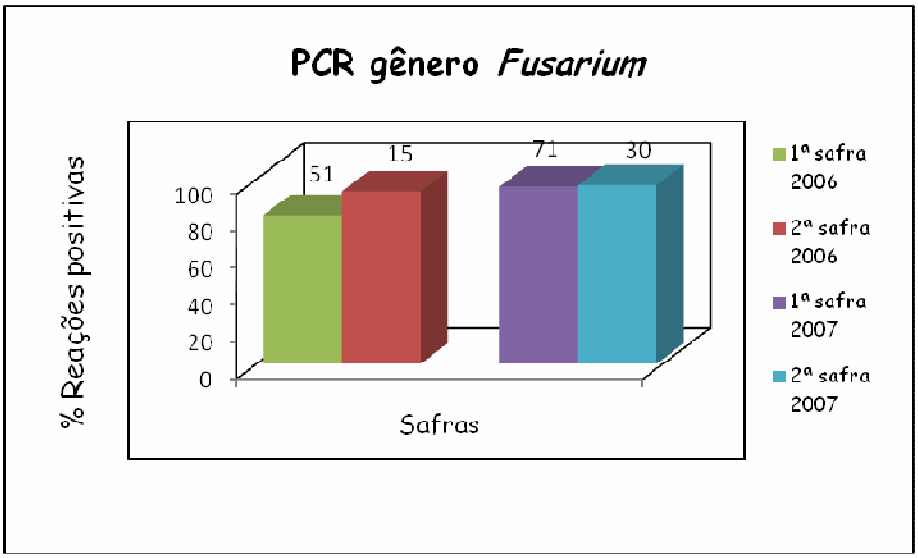

Figura 2 - Gráfico das porcentagens de reações positivas de PCR com primers específicos para gênero de isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grãos ardidos. Os números acima das barras correspondem ao número de amostras analisadas

As PCRs para confirmação de gênero não foram positivas para todos os isolados. Os isolados que não foram identificados como sendo do gênero *Fusarium* pela PCR, passaram por análise morfológica e todos foram confirmados, resultando em 100% de isolados de *Fusarium* spp. (dados não apresentados).

A identificação da espécie *Fusarium verticillioides* através de PCR foi agrupada por safras e anos de estudo e os gráficos das porcentagens de reações positivas para essa espécie estão na figura 3.

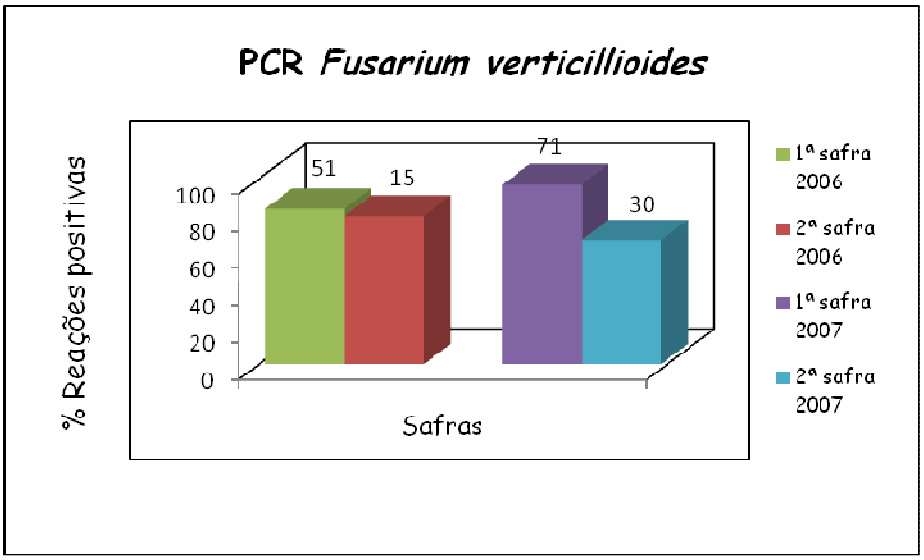

Figura 3 - Gráficos das porcentagens de reações positivas de PCR com primers específicos para *F. verticillioides* de isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grãos ardidos. Os números acima das barras correspondem ao número de isolados analisados

A incidência de isolados confirmados como sendo *Fusarium verticillioides* através de PCR foi elevada em todas as safras analisadas. Na primeira safra de 2006, 84% dos isolados foram confirmados e na segunda safra de 2006, 80% dos isolados foram positivos para *F. verticillioides*. A maior incidência foi encontrada na primeira safra de 2007, que apresentou 97% dos seus isolados como sendo *F. verticillioides*. Na segunda safra de 2007, 67% dos isolados foram confirmados como pertencentes a essa espécie.

Nenhum dos isolados foi positivo para as PCRs para identificação de *F. proliferatum*. As PCRs conduzidas para a identificação de *F. subglutinans* confirmou 6 isolados no total, sendo 2 da primeira safra de 2006 (LGM-Fus 077 e LGM-Fus

133), 1 da segunda safra de 2006 (LGM-Fus 160), 2 da primeira safra de 2007 (LGM-Fus 314 e LGM-Fus 340) e 1 da segunda safra de 2007 (LGM-Fus 398).

A incidência do gene *fum5* nos isolados confirmada por meio de PCR foi agrupada por safras e anos de estudo e os gráficos das porcentagens de reações positivas para o potencial toxigênico estão na figura 4.

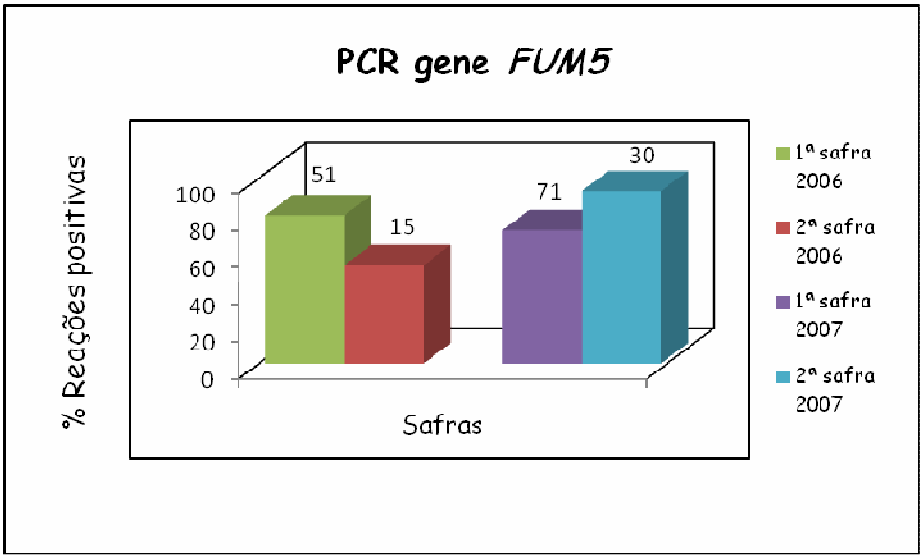

Figura 4 - Gráfico das porcentagens de reações positivas de PCR com primers específicos para o gene *fum5* de isolados de *Fusarium* spp. obtidos de grãos ardidos. Os números acima das barras correspondem ao número de isolados analisados

As médias dos isolados cuja PCR identificou potencial toxigênico variou entre safras e anos. Na primeira safra de 2006 a média de isolados contendo o gene *fum5* foi de 80% e na segunda safra do mesmo ano foi de 53%. Na primeira safra de 2007, 72% dos isolados foram positivos para a presença do gene e na segunda safra de 2007 a média foi de 93%, a mais alta de todas as safras.

Tabela 2 - Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em grãos ardidos nas duas safras de 2006 e 2007 segundo amostra de origem e resultados das PCRs com primers específicos para gênero *Fusarium* (FUS), para o gene *fum5* (*fum5*) e para as espécies *F. verticillioides* (FV), *F. Proliferatum* (FP) e *F. subglutinans* (FS)

(continua)

Isolado	Amostra de origem	FUS	*fum5*	FV	FP	FS
LGM-Fus 005	LGM 1-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 007	LGM 1-1/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 009	LGM 2-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 011	LGM 2-1/06	-	-	-	-	-
LGM-Fus 013	LGM 3-1/06	-	+	+	-	-
LGM-Fus 015	LGM 4-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 017	LGM 4-1/06	-	-	-	-	-
LGM-Fus 021	LGM 5-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 027	LGM 6-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 029	LGM 6-1/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 031	LGM 7-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 035	LGM 8-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 037	LGM 8-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 043	LGM 9-1/06	-	-	+	-	-
LGM-Fus 045	LGM 9-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 047	LGM 10-1/06	-	+	+	-	-
LGM-Fus 051	LGM 11-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 053	LGM 11-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 055	LGM 12-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 057	LGM 12-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 059	LGM 14-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 061	LGM 14-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 063	LGM 15-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 065	LGM 15-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 067	LGM 16-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 069	LGM 16-1/06	-	+	+	-	-
LGM-Fus 071	LGM 17-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 073	LGM 17-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 075	LGM 18-1/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 077	LGM 18-1/06	-	-	-	-	+
LGM-Fus 079	LGM 19-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 081	LGM 19-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 095	LGM 20-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 097	LGM 20-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 099	LGM 21-1/06	-	+	+	-	-
LGM-Fus 101	LGM 21-1/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 103	LGM 22-1/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 105	LGM 22-1/06	+	+	-	-	-
LGM-Fus 107	LGM 23-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 109	LGM 23-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 111	LGM 24-1/06	+	+	+	-	-

Tabela 2 - Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em grãos ardidos nas duas safras de 2006 e 2007 segundo amostra de origem e resultados das PCRs com primers específicos para gênero *Fusarium* (FUS), para o gene *fum5* (*fum5*) e para as espécies *F. verticillioides* (FV), *F. Proliferatum* (FP) e *F. subglutinans* (FS)

(continuação)

Isolado	Amostra de origem	FUS	*fum5*	FV	FP	FS
LGM-Fus 113	LGM 24-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 115	LGM 25-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 117	LGM 25-1/06	+	+	-	-	-
LGM-Fus 119	LGM 26-1/06	-	+	-	-	-
LGM-Fus 123	LGM 27-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 129	LGM 29-1/06	+	+	-	-	-
LGM-Fus 131	LGM 30-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 133	LGM 30-1/06	-	-	-	-	+
LGM-Fus 143	LGM 31-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 145	LGM 31-1/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 147	LGM 1-2/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 149	LGM 1-2/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 154	LGM 3-2/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 156	LGM 3-2/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 158	LGM 4-2/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 160	LGM 4-2/06	+	+	-	-	+
LGM-Fus 165	LGM 5-2/06	+	-	-	-	-
LGM-Fus 167	LGM 6-2/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 169	LGM 6-2/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 171	LGM 7-2/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 173	LGM 7-2/06	+	-	-	-	-
LGM-Fus 179	LGM 9-2/06	+	+	+	-	-
LGM-Fus 181	LGM 9-2/06	-	-	+	-	-
LGM-Fus 183	LGM 10-2/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 185	LGM 10-2/06	+	-	+	-	-
LGM-Fus 271	LGM 1-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 272	LGM 1-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 273	LGM 2-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 274	LGM 2-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 275	LGM 3-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 276	LGM 3-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 277	LGM 4-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 278	LGM 4-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 279	LGM 5-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 280	LGM 5-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 281	LGM 6-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 282	LGM 6-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 283	LGM 7-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 284	LGM 7-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 285	LGM 8-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 286	LGM 8-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 287	LGM 9-1/07	+	+	+	-	-

Tabela 2 - Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em grãos ardidos nas duas safras de 2006 e 2007 segundo amostra de origem e resultados das PCRs com primers específicos para gênero *Fusarium* (FUS), para o gene *fum5* (*fum5*) e para as espécies *F. verticillioides* (FV), *F. Proliferatum* (FP) e *F. subglutinans* (FS)

(continuação)

Isolado	Amostra de origem	FUS	*fum5*	FV	FP	FS
LGM-Fus 288	LGM 10-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 289	LGM 10-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 290	LGM 11-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 291	LGM 11-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 292	LGM 12-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 293	LGM 13-1/07	-	-	+	-	-
LGM-Fus 294	LGM 13-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 295	LGM 14-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 296	LGM 14-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 297	LGM 15-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 298	LGM 15-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 299	LGM 16-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 300	LGM 16-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 301	LGM 17-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 302	LGM 17-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 303	LGM 18-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 304	LGM 18-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 305	LGM 19-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 306	LGM 19-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 307	LGM 20-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 308	LGM 20-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 309	LGM 21-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 310	LGM 21-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 311	LGM 22-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 312	LGM 22-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 313	LGM 23-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 314	LGM 23-1/07	+	-	-	-	+
LGM-Fus 315	LGM 24-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 316	LGM 25-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 317	LGM 25-1/07	-	+	+	-	-
LGM-Fus 318	LGM 26-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 319	LGM 27-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 320	LGM 27-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 321	LGM 29-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 322	LGM 29-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 323	LGM 30-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 324	LGM 30-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 325	LGM 31-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 326	LGM 31-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 327	LGM 32-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 328	LGM 32-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 329	LGM 33-1/07	+	+	+	-	-

Tabela 2 - Isolados monospóricos de *Fusarium* spp. coletados em grãos ardidos nas duas safras de 2006 e 2007 segundo amostra de origem e resultados das PCRs com primers específicos para gênero *Fusarium* (FUS), para o gene *fum5* (*fum5*) e para as espécies *F. verticillioides* (FV), *F. Proliferatum* (FP) e *F. subglutinans* (FS)

(conclusão)

Isolado	Amostra de origem	FUS	*fum5*	FV	FP	FS
LGM-Fus 330	LGM 33-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 331	LGM 34-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 332	LGM 34-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 333	LGM 35-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 334	LGM 35-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 335	LGM 36-1/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 336	LGM 36-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 337	LGM 37-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 338	LGM 37-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 339	LGM 38-1/07	-	-	+	-	-
LGM-Fus 340	LGM 39-1/07	+	-	-	-	+
LGM-Fus 341	LGM 40-1/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 396	LGM 1-2/07	+	-	-	-	-
LGM-Fus 397	LGM 1-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 398	LGM 2-2/07	+	+	-	-	+
LGM-Fus 399	LGM 2-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 400	LGM 3-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 401	LGM 3-2/07	+	-	+	-	-
LGM-Fus 402	LGM 4-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 403	LGM 4-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 404	LGM 5-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 405	LGM 5-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 406	LGM 6-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 407	LGM 6-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 408	LGM 7-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 409	LGM 7-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 410	LGM 8-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 411	LGM 8-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 412	LGM 9-2/07	-	+	+	-	-
LGM-Fus 413	LGM 9-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 414	LGM 10-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 415	LGM 10-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 416	LGM 11-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 417	LGM 11-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 418	LGM 12-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 419	LGM 12-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 420	LGM 13-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 421	LGM 13-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 422	LGM 14-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 423	LGM 14-2/07	+	+	-	-	-
LGM-Fus 424	LGM 15-2/07	+	+	+	-	-
LGM-Fus 425	LGM 15-2/07	+	+	+	-	-

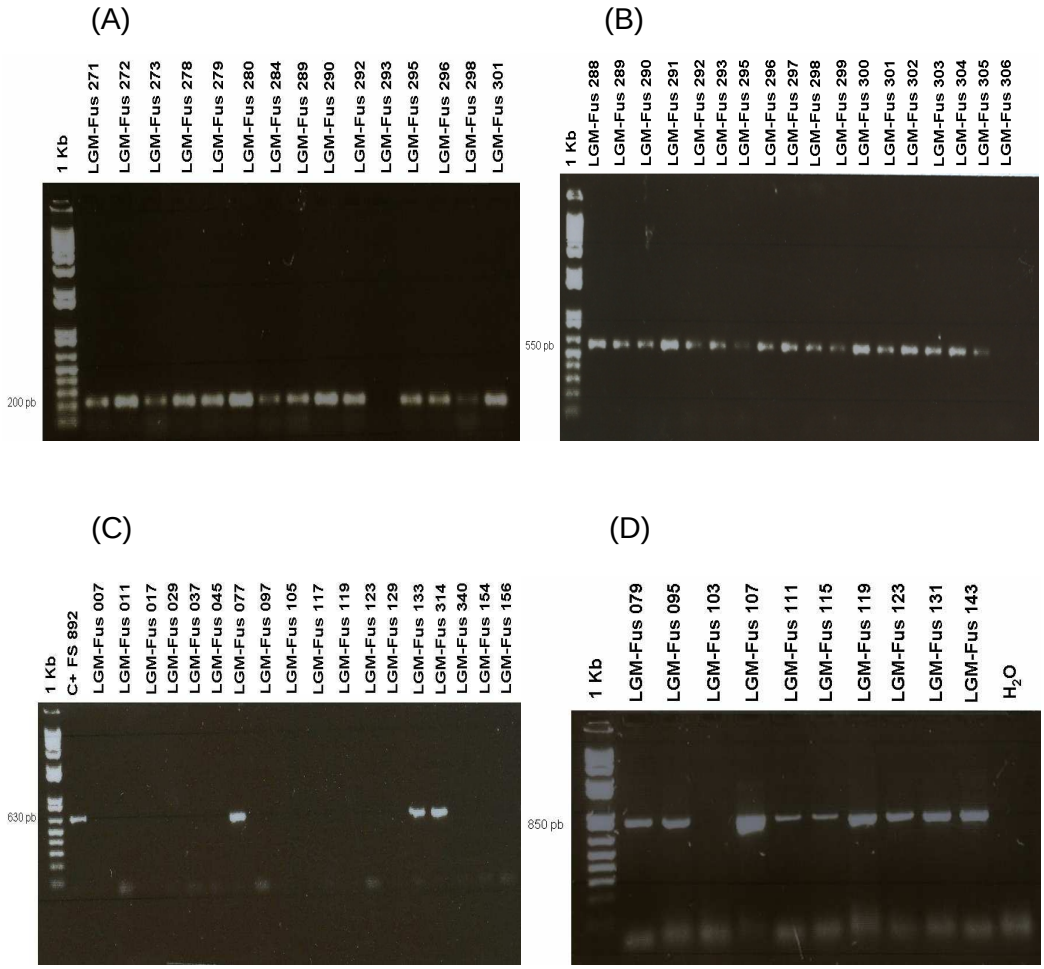

Figura 5 - Exemplos de reações polimerásicas em cadeia de isolados de *Fusarium* spp. isolados de grãos de milho com primers específicos para gênero *Fusarium* (A); espécie *F. verticillioides* (B); espécie F. *subglutinans* (C) e para o gene *fum5* (D)

2.3.3 Quantificação de fumonisinas em amostras de grãos ardidos

Em todas as amostras de grãos ardidos de 2006 e 2007 foram encontradas fumonisinas (tabela 1). As maiores concentrações foram de amostras provenientes da primeira safra de 2006. Das 23 amostras analisadas, 8 tiveram níveis maiores de 90 µg/g, 5 tiveram níveis maiores de 60 µg/g e as demais apresentaram níveis que variaram de 11,1 a 41,6 µg/g Na segunda safra de 2006 foram quantificadas 6 amostras e os níveis encontrados variaram de 8,9 a 22,9 µg/g, os mais baixos de todas as safras estudadas. Na primeira safra de 2007 foram analisadas 40 amostras

e 2 apresentaram níveis acima de 60 µg/g. Nas demais, os níveis de fumonisinas variaram de 4,3 a 28,2 µg/g. Na segunda safra de 2007 foram analisadas 15 amostras e os níveis de fumonisinas variaram de 2,1 a 24 µg/g.

2.3.4 Incidência de *Fusarium* spp. com potencial toxigênico e quantificação de fumonisinas em grãos assintomáticos de milho híbrido

Os resultados da avaliação da incidência de *Fusarium* spp. e concentração de fumonisinas em grãos assintomáticos encontram-se na Tabela 3:

Tabela 3 - Incidência de *Fusarium* spp. (%fus) e concentração de fumonisinas (µg/g) em amostras de grãos assintomáticos

Amostras	Local	% fus	% Grãos Ardidos	Fumonisinas (µg/g)
LGM 1-2/07 A	Rio Verde – GO	90	55	0,0
LGM 2-2/07 A	Rio Verde – GO	71,5	42	1,1
LGM 3-2/07 A	Santa Juliana - MG	81,5	41	0,0
LGM 4-2/07 A	Santa Juliana - MG	80	37	0,9
LGM 5-2/07 A	Chapadão do Céu – GO	81	50	1,4
LGM 6-2/07 A	S. Gabriel do Oeste - MS	71,5	55	1,1
LGM 7-2/07 A	Chapadão do Sul – MS	99,5	52	0,0
LGM 8-2/07 A	Ponta Porã – MT	88,5	44	0,0
LGM 9-2/07 A	S. Gabriel do Oeste - MS	76	51	1,7
LGM 10-2/07 A	Dourados – MS	65,5	55	1,3
LGM 11-2/07 A	Itambé – PR	75	51	0,0
LGM 12-2/07 A	Marialva – PR	69	52	0,0
LGM 13-2/07 A	Astorga – PR	77,5	43	0,0
LGM 14-2/07 A	S. S. da Amoreira – PR	70,5	45	0,0
LGM 15-2/07 A	Atalaia – PR	75	58	2,1

A incidência de *Fusarium* spp. nos grãos assintomáticos de uma forma geral foi menor do que a observada nos grãos ardidos das mesmas amostras (Tabela 1) , com exceção das amostras LGM 2-2/07 A e LGM 14-2/07 A, que tiveram uma incidência maior em grãos assintomáticos do que em grãos ardidos. A incidência média nos grãos assintomáticos foi de 78%, menor do que a observada em grãos ardidos (83%).

As PCRs para gênero *Fusarium*, para as espécies *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, e para potencial de produção de fumonisina (gene *fum5*) foram feitas com repetição (duplicata). Os isolados cuja identificação de

espécie não foi obtida por meio de PCR foram submetidos à análise com base em características morfológicas. Os resultados de todas as PCRs estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Isolados de *Fusarium* spp. coletados em grãos assintomáticos na segunda safra de 2007 segundo amostra de origem e resultados das PCRs com primers específicos para gênero *Fusarium* (FUS), para o gene *fum5* (*fum5*) e para as espécies *F. verticillioides* (FV), *F. Proliferatum* (FP) e *F. subglutinans* (FS)

Amostra	Isolado	FUS	*fum5*	FV	FP	FS
LGM 1-2/07 A	LGM-Fus 426	+	+	+	-	-
	LGM-Fus 427	+	+	+	-	-
LGM 2-2/07 A	LGM-Fus 428	+	+	+	-	-
	LGM-Fus 429	+	+	+	-	-
LGM 3-2/07 A	LGM-Fus 430	+	-	-	-	-
	LGM-Fus 431	+	+	+	-	-
LGM 4-2/07 A	LGM-Fus 432	+	+	+	-	-
	LGM-Fus 433	+	+	+	-	-
LGM 5-2/07 A	LGM-Fus 434	+	+	-	-	-
	LGM-Fus 435	+	-	-	-	-
LGM 6-2/07 A	LGM-Fus 436	-	+	-	-	-
	LGM-Fus 437	+	+	+	-	-
LGM 7-2/07 A	LGM-Fus 438	+	+	-	-	-
	LGM-Fus 439	+	-	-	-	-
LGM 8-2/07 A	LGM-Fus 440	+	+	+	-	-
	LGM-Fus 441	+	+	-	-	-
LGM 9-2/07 A	LGM-Fus 442	-	+	-	-	-
	LGM-Fus 443	+	+	+	-	-
LGM 10-2/07 A	LGM-Fus 444	+	+	+	-	-
	LGM-Fus 445	+	+	+	-	-
LGM 11-2/07 A	LGM-Fus 446	+	+	-	-	-
	LGM-Fus 447	+	+	-	-	-
LGM 12-2/07 A	LGM-Fus 448	+	+	+	-	-
	LGM-Fus 449	+	-	-	-	+
LGM 13-2/07 A	LGM-Fus 450	+	+	+	-	-
	LGM-Fus 451	+	+	+	-	-
LGM 14-2/07 A	LGM-Fus 452	+	-	+	-	-
	LGM-Fus 453	+	-	+	-	-
LGM 15-2/07 A	LGM-Fus 454	+	-	-	-	-
	LGM-Fus 455	+	+	+	-	-

Assim como nos grãos ardidos, as PCRs para confirmação de gênero não foram positivas para todos os isolados. Os isolados que não foram identificados como sendo do gênero *Fusarium* pela PCR passaram por análise morfológica e todos foram confirmados, resultando em 100% de isolados de *Fusarium* spp.

As PCRs realizadas com os isolados obtidos de grãos assintomáticos confirmou 93% dos isolados como pertencentes ao gênero *Fusarium*. A PCR para espécie *F. verticillioides* foi positiva para 60% dos isolados, para *F. proliferatum* nenhum isolado mostrou amplificação e para *F. subglutinans* apenas 1 isolado foi positivo. A PCR para identificação dos isolados com potencial toxigênico foi positiva para 70% dos isolados.

As PCRs conduzidas para identificação da espécie *F. proliferatum* não foram positivas para nenhum dos isolados. Foram feitas reações com um controle positivo, mostrando que os primers utilizados funcionam e, desta forma, nenhum dos isolados pode ser caracterizado como *F. proliferatum*.

As concentrações de fumonisinas foram obtidas por meio de teste de ELISA. Em 8 amostras não foram detectadas fumonisinas e nas demais amostras os níveis variaram de 0,9 a 2,1 µg/g (maior nível encontrado).

2.4 DISCUSSÃO

A alta incidência de *Fusarium* spp. encontrada nas amostras tanto de grãos ardidos como de grãos assintomáticos concorda com outros trabalhos já realizados, os quais também descrevem esse gênero como o mais freqüentemente associado a grãos de milho no Brasil. Em 2000, por exemplo, Orsi et al. analisaram 195 amostras de milho de 3 diferentes híbridos do estado de São Paulo e registraram incidências que variaram de 84,6 a 92,3%. Em outro trabalho realizado com amostras do Paraná, Ono et al (2008) analisaram um total de 615 amostras de duas safras de anos diferentes e detectaram *Fusarium* sp. em 100% das amostras nas duas safras. De acordo com Munkvold e Desjardins,(1997), a presença de algumas espécies de *Fusarium* (principalmente *F. verticillioides*, antes denominado *F. moniliforme*) em milho (planta e grãos) é muito comum, tanto em grãos assintomáticos como ardidos. A relação entre o microrganismo e a planta é referida como endofítica e alguns estudos relatam que a infecção por *F. verticillioides* pode estimular o crescimento e desenvolvimento da planta devido à produção de hormônios promotores de crescimento. Alguns relatos associaram a infecção por *F.verticillioides* à proteção da planta contra patógenos mais severos e insetos (MUNKVOLD & DESJARDINS,

1997) ao passo que outros relataram a redução de infecção por *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina em espigas co-inoculadas com *Fusarium sp.*(ONO et al. 1999, ZUMMO; SCOTT, 1992).

A identificação dos isolados com oligonucleotídeos gênero e espécie-específicos não foi positiva para todos os isolados, tendo sido necessária a análise morfológica dos mesmos, que confirmou se tratarem de organismos pertencentes ao gênero *Fusarium*. Dois isolados foram negativos para todos os primers testados, mas na maioria dos casos, isolados negativos para o primer específico de gênero (FUS) foram positivos para o primer VER, específico para *F. verticillioides*. Somente em um caso o isolado foi positivo para o primer SUB, de *Fusarium subglutinans*. Desta forma, conclui-se que estes oligonucleotídeos não são universais e que devem ser validados quando testados em populações diferentes daquelas em que foram produzidos. Por outro lado, a identificação em nível de espécie destes isolados PCR-negativos poderá ser definida por meio do seqüenciamento do gene que codifica para o fator de elongamento 1-alfa, já que este tem sido utilizado para propósitos classificatórios relativos a este gênero (GEISER et al., 2004). De acordo com os autores, este gene oferece excelente representação dos produtores de tricotecenos Tipo-B e dos complexos *Giberella fujikuroi*, *F. oxysporum* e *F. solani*. Esta abordagem é de interesse, pois poderá revelar novas variantes de *Fusarium* ainda não descritas na literatura, haja vista que este foi um dos primeiros trabalhos que empregou reações polimerásicas com primers espécie-específicos com isolados de milho no Brasil.

A identificação molecular de espécies mostrou que 162 dos 197 isolados (82%) pertenciam à espécie *F. verticillioides* e somente 6 pertenciam a *F. subglutinans*. A PCR com primers específicos para *F.proliferatum* não foi positiva para nenhum isolado. Os 28 isolados não identificados por PCR espécie-específico foram submetidos a análise morfológica e foram identificados como sendo *F. verticillioides.* No entanto essa análise não é conclusiva pois a diferenciação morfológica de espécies de *Fusarium* muitas vezes é complicada pela semelhança das estruturas. Espécies como *F. verticillioides* e *F. proliferatum* possuem tênues diferenças estruturais e é preciso muito treino e estudo para diferenciá-los. A principal característica que diferencia *F. verticillioides* de *F. proliferatum* é que o último, além de possuir monofiálides, também tem polifiálides como estrutura

reprodutiva, uma característica de difícil visualização. De qualquer maneira, espera-se uma menor incidência de *F. proliferatum* em relação a *F. verticillioides* em grãos de milho no Brasil, por ser uma espécie comumente encontrada em clima temperado (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

A diferenciação molecular de espécies de *Fusarium* requer mais estudos regionais. O desenvolvimento de primers gênero ou espécie-específicos para essa finalidade deve levar em consideração as diferenças genéticas entre populações de regiões distintas.

Os resultados da identificação molecular de isolados de *Fusarium* com potencial toxigênico (gene *fum5*) foi, em sua grande maioria, positivo para ao menos 1 isolado de cada amostra de grãos ardidos. A presença do gene também foi detectada em isolados de grãos assintomáticos, o que implica na possibilidade desses grãos conterem fumonisinas, o que foi confirmado na prática. A quantificação de fumonisinas em grãos assintomáticos já foi realizada em outro estudo no Brasil, no entanto a identificação molecular do potencial toxigênico dos isolados provenientes desses grãos e também dos grãos ardidos de amostras do Brasil é inédita.

A quantificação de fumonisinas em grãos ardidos revelou alta concentração da toxina nas amostras, variando de 4,4 µg/g a mais de 90 µg/g. Levando em consideração que foram utilizados apenas grãos ardidos separadamente e guardando a proporção com relação à quantidade de grãos ardidos por amostra, os níveis variaram de 2,1 a acima de 44,4 µg/g quando extrapolados para amostras de armazéns coletadas sem distinção entre grãos ardidos ou não. Estudo feito por Hirooka et al. (1996) constatou níveis médios de 5,490 µg/g em amostras de milho provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás. Ono et al. (1999) verificaram níveis que variaram de 7,0 a 13,460 µg/g em amostras do Paraná e Orsi et al. (2000) observaram níveis que variaram de 0,87 a 49,32 µg/g em amostras de São Paulo. No presente estudo, foram encontrados diferentes níveis de fumonisinas em diferentes regiões. No entanto, todas as amostras tiveram níveis que excederam 4 µg/g, nível este proposto como máximo recomendado pelo FDA que é um órgão mais tolerante que a rígida Comunidade Européia. Ao fazer a proporção de concentração de fumonisinas em relação à quantidade de grãos assintomáticos nas amostras cuja porcentagem de grãos ardidos foi fornecida, esses valores são

reduzidos e mesmo assim aproximadamente 50% das amostras ultrapassam 4 µg/g. Esse resultado mostra que o milho produzido no Brasil, além poder apresentar um risco para a saúde humana e animal, não se encaixa nos padrões exigidos por países importadores, o que implica diretamente em perdas para a economia.

A quantificação de fumonisinas em grãos assintomáticos também identificou a presença das toxinas, embora em níveis muito mais baixos, sendo o maior valor encontrado de 2,1 µg/g. Os resultados para grãos assintomáticos desse trabalho foram menores que os relatados por Ono et al, 2006, que também analisou grãos ardidos e assintomáticos separadamente quanto à presença de FB_1 e FB_2 e encontrou níveis de 0,57 a 20,38 µg/g em grãos assintomáticos. Comparando os resultados com os obtidos de grãos ardidos, Ono verificou que as concentrações de fumonisinas dos grãos ardidos chegaram a ser 166 vezes mais altas que as quantificadas em grãos assintomáticos indicando assim que grãos ardidos representam quase a totalidade de contaminação por fumonisinas. Assim como no trabalho citado, os níveis de fumonisinas encontrados nos grãos ardidos foram maiores que os níveis encontrados nos grãos assintomáticos, e variaram de 4,4 a 19,5 µg/g. Os resultados indicam a impossibilidade de eliminar esta toxina da dieta humana e de outros animais e que medidas devem ser tomadas para reduzir suas concentrações em alimentos e rações, tais como a utilização de sementes de qualidade, utilização de híbridos resistentes, manejo adequado da cultura, controle de condições do solo, entre outros.

O presente trabalho analisou amostras das principais regiões produtoras de grãos de milho híbrido quanto à incidência de *Fusarium* ssp. e quanto aos níveis de fumonisinas. As altas incidências de *Fusarium* spp. encontradas eram esperadas, uma vez que fungos deste gênero são constantemente associados a grãos de milho. A alta incidência de *Fusarium* spp. com potencial toxigênico não se mostrou diretamente relacionada às altas concentrações de fumonisinas encontradas nas amostras de grãos assintomáticos. Pode-se inferir que, por ser um metabólito secundário, as fumonisinas são produzidas pelo fungo quando as condições ambientais ou de armazenamento não são favoráveis. Em condições favoráveis, o *Fusarium* spp. é classificado como endofítico e estabelece uma relação de simbiose, podendo trazer benefícios para a planta como proteção contra patógenos e insetos, liberação de hormônios que estimulam o crescimento e desenvolvimento da planta,

inibição de infecção por outros fungos. Isolados de *Fusarium* spp. com potencial toxigênico foram encontrados tanto em grãos ardidos como assintomáticos e a alta concentração de fumonisinas em grãos ardidos e baixa concentração em grãos assintomáticos mostra que o fungo deixa de ser endofítico e passa a ser patogênico sob certas condições, podendo causar danos na planta (como podridões) e produzir micotoxinas. Nas diferentes regiões foram encontradas altas concentrações de fumonisinas, mostrando que não se trata de um problema isolado ou regional e que, portanto, são necessárias medias de controle em âmbito nacional. Levando-se em consideração os limites máximos tolerados pelo FDA e pela Comunidade Européia, poucas amostras analisadas seriam aceitas e liberadas para consumo humano. Nossos resultados indicam que as fumonisinas nunca serão totalmente eliminadas da nossa dieta haja vista que estas foram detectadas, embora em níveis baixos, em amostras de grãos assintomáticos. Os maiores níveis foram encontrados em grãos ardidos, responsáveis por quase a totalidade de fumonisinas nas amostras e dessa forma, para reduzir as fumonisinas da dieta, o primeiro passo a ser tomado é estabelecer um controle rigoroso no beneficiamento dos grãos. Os programas de melhoramento genético e o desenvolvimento de híbridos resistentes devem ser continuados, mas estes devem ser combinados com outros procedimentos para obtenção de melhores resultados.

3 CONCLUSÕES

Foram encontradas altas incidências de *Fusarium* spp. e fumonisinas nas principais regiões produtoras de milho no Brasil.

Potencial toxigênico para produção de fumonisinas (presença do gene *FUM5*) foi detectado em isolados de *Fusarium* spp. provenientes de populações do Brasil.

A alta incidência de *Fusarium* spp. não está diretamente associado a altos níveis de fumonisinas.

Grãos ardidos são responsáveis pela maior parte da contaminação por fumonisinas.

A completa eliminação das fumonisinas da dieta não é possível. A redução deve ser baseada na eliminação dos grãos ardidos através do controle rigoroso no beneficiamento.

REFERÊNCIAS

AGROLINK. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br:8888/agrolinkfito/artigos_pg_detalhe_noticia.asp?cod=>. Acesso em: 20 dez de 2007.

BENNET, J. W., KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Philadelphia, v. 16, n. 3, p. 497 – 516, 2003.

BLUHM, B. H., FLAHERTY, J E., COUSIN, M. A., WOLOSHUK, C. P. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin- producing species of *Fusarium* in cormeal, **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p 1955-1961, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 42, p. 65–86, 1979.

CASTRO, M. F. P. M., SHEPHARD, G. S., SEWRAN, V., VICENTE, E., MENDONÇA, T. A., JORDAN, A. C. Fumonisins in brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 7, p. 693-699, 2004.

CHEN, J., MIROCHA, C. J., XIE, W., HOGGE, L., OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B_1 by *Alternaria alternata f. sp. lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3928-3931, 1992.

COLVIN, B. M., HARRISON, L. R. Fumonisin – indiced pulmonary edema and hidrotorax in swine. **Mycopathologia**, New York, v. 117, p. 79-82, 1992.

COUTO, A. A., GONÇALVES, R. M. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa. 2007. p. 213 – 214.

DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* Mycotoxins. Chemistry, Genetics and Biology**. St. Paul: The American Phytopathological Society.2006. 260p,

DINIZ, S. S. de S. **Micotoxinas**. Maringá: Livraria e Editora Rural. 2002. 181p.

D´MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, Nottingham, v. 69, p. 155-166, 1997.

EDWARDS, K., JOHNSTONE, C., THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1349, 1991.

EMBRAPA. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas, 2005. (Circular Técnica n. 66).

EMBRAPA. **Podridão branca da espiga de milho**. Sete Lagoas, 2006. (Circular Técnica n.141).

FAO. Disponível em: www.fao.org. Acesso em: 23 jan.2008.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html>. Acesso em: 23 jan. 2008.

GEISER, D. M., JIMÉNEZ-GASCO, M. M., KANG, S., MAKALOWSKA, I., VEERARAGHAVAN, N., WARD, T. J., ZHANG, N., KULDAU, G. A., O´DONNELL, K. FUSARIUM-IS v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 110, p. 473-479, 2004.

GELDERBLOM, W. C. A., JASKIEWICZ, J., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., HORAK, R. M., VLEGGAR, R.; KRIEK, N. P. J. Fumonisins – mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GONÇALEZ, E., FELÍCIO, J. D., PINTO, M. M. Bioflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research***,* Ribeirão Preto, v. 34, p. 1453, 2001.

HIROOKA, E. Y., YAMAGUCHI, M. M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, Bari, v. 13, p. 173-183, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 11 nov. 2008.

JULIAN, A. M., WAREING, P. W., PHILLIPS, S. I., MEDLOCK, V. F. P., MACDONALD, M. V., DEL RÍO, L. E. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre-and-post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia,** New York, v. 129, p. 5-16, 1995.

LINO, C. M., SILVA, L. J. G., PENA, A. S. Fumonisinas: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, n. 552, p. 181-192, 2004.

LINO, C. M., SILVA, L. J. G., PENA, A. S. Metodologias para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 293-299, 2006.

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. V. S. **Patologia de sementes**, Campinas: Fundação Cargill, 1987, p. 176-198

MARASAS, W. F. O. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and fumonisins in maize in relation to human health. **South African Medical Journal**, Cape Town, v. 83, p. 382-383, 1993.

MARASAS, W. F. O. Fumonisins: hystory, world-wide occurrence and impact. In: JACKSON, L. S., DelVRIES, J. W., BILLERMAN, L. B. (Ed.), **Fumonisins in food**. New York: Plenum Press, 1996. p. 1-17.

MARASAS, W. F. O., KELLERMAN, T., S., GELDERBLOM, W. C. A., COETZER, J. A. W., THIEL, P. G., LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B_1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 55, p. 197 – 203, 1988.

MARASAS, W. F. O., RILEY, R. T., HENDRICKS, K. A., STEVENS, V. L., SADLER, T. W., WAES, J. G., MISSMER, S. A., CABRERA, J., TORRES, O., GELDERBLOM, W. C. A., ALLEGOOD, J., MARTÍNEZ, C., MADDOX, J., MILLER, J. D., STARR, L., SULLARDS, ROMAN, A. V., VOSS, K. A., WANG, E., MERRIL, A. H. Jr. Fumonisins Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. **Journal of Nutrition**, Bethesda , v. 134, p. 711 – 716, 2003.

MERRIL, A. H. Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: A necessary, but dangerous, pathway. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 25843-25846, 2002.

MORAES, M. H. D., MENTEN, J. O. M., GRAVENA, J. C., ALVES, C. A. Controle químico de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho: metodologia de avaliação e efeitos sobre a qualidade fisiológica. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras**,** v. 28, p. 626-632, 2003.

MUNKVOLD, G. P., DESJARDINS, E. A. Fumonisins in Maize. Can We Reduce Their Occurrence? **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n 6, p. 556-565, 1997.

OKLAHOMA STATE UNIVERSITY. Disponível em: <http://nue.okstate.edu/Crop_Information/World_Wheat_Production.htm>. Acesso em: 19 dez. 2007.

ONO, E. Y. S., SUGIURA, Y., HOMECHIM, M., KAMOGAE, M., VIZZONI, E., UENO, Y., HIROOKA, E. Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvest corn of State of Paraná**. Mycopathologia**, New York, v. 147, p. 139-148, 1999.

ONO, E. Y. S., BIAZON, L., SILVA, M., VIZZONI, E., SIGIURA, Y., UENO, Y., HIROOKA, E. Y. Fumonisin in Corn: Correlation with *Fusarium* sp. Count, Damaged Kernels, Protein and Lipid Content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 63-71, 2006.

ONO, E. Y. S., SILVA, M., HASHIMOTO, E. H., VIZONI, E., KAWAMURA, O., SUGIURA, Y., HIROOKA, E. Y. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná state, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 11, p. 1392-1399, 2008.

ORSI, R. B., CORREA, B., POSSI, C. R., SHAMMASS, E. A., NOGUEIRA, J. R., DIAS, S. M. C. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvest and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, São Paulo, v. 36, p. 75-87, 2000.

PERAICA, M., RADIĆ, B., LUCIĆ, A., PAVLOVIĆ, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 77, p. 754-766, 1999.

RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro. 2007.07.019, 2007.

SEEDNEWS. Disponível em: <http://www.seednews.inf.br/portugues/seed62/milho62.shtmL> Acesso em: 19 dez. 2007.

SYDENHAM, E. W., MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in brazilian feeds associated wiyh field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, v. 40, p. 994-997, 1992.

UENO, Y. Risk os multi-exposure to natural toxins, **Mycotoxins**, Bilthoven, v. 50, p. 13-22, 2000.

VARGAS, E. A., CASTRO, P. L.; SILVA, C. M. G. Co-occurrence of aflatoxins B_1, B_2, G_1 G_2, zearalenona and fumonisin B_1 in brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

ZHENG, M. Z., RICHARD, J. L., BINDER, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia**, New York, v. 161, p. 261-273, 2006.

ZUMMO, N., SCOTT, G. E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavu*s on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 771-773, 1992.