SABINA MOSER TRALAMAZZA

**DIVERSIDADE FÚNGICA, ANÁLISE POLIFÁSICA DO GÊNERO *Fusarium* E
DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM GRÃOS
DE TRIGO DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do *Título de Doutor em Ciências*.

São Paulo
2015

SABINA MOSER TRALAMAZZA

**DIVERSIDADE FÚNGICA, ANÁLISE POLIFÁSICA DO GÊNERO *Fusarium* E
DETERMINAÇÃO DE DESOXINIVALENOL E ZEARALENONA EM GRÃOS
DE TRIGO DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do *Título de Doutor em Ciências*.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Tralamazza, Sabina Moser.

Diversidade fúngica, análise polifásica do gênero *Fusarium* e determinação de desoxinivalenol e zearalenona em grãos de trigo de diferentes regiões do Brasil / Sabina Moser Tralamazza. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fungos toxigênicos e micotoxinas.

Versão do título para o inglês: Fungal diversity, polyphasic analysis of the genus *Fusarium* and determination of deoxynivalenol and zearalenone in wheat grains from different regions of Brazil.

1. Trigo 2. Fungos 3. *Fusarium* 4. Tricotecenos 5. Desoxinivalenol 6. Zearalenona I. Corrêa, Prof. Dr. Benedito II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB049/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sabina Moser Tralamazza.

Título da Tese: Diversidade fúngica, análise polifásica do gênero *Fusarium* e determinação de desoxinivalenol e zearalenona em grãos de trigo de diferentes regiões do Brasil.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 461/11 referente ao projeto intitulado: "*Estudo polifásico de cepas de Fusarium spp. Produtoras de tricotecenos isoladas de milho e trigo*" sob a responsabilidade de Sabina Moser Tralamazza, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 29 de junho de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Concluir uma pós-graduação é também ter a rara oportunidade de agradecer publicamente todo amor, consideração e apoio que as pessoas me deram nesses anos todos.

Assim, gostaria de agradecer imensamente:

Ao Prof. Benedito por ter confiado em mim e em minhas ideias e por ter me dado à chance de aprender e crescer, tanto na vida profissional como pessoal.

À Prof.^a Eliana, uma pessoa que adorei conhecer e a toda sua equipe, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus colegas e amigos de laboratório que me ensinaram e me ajudaram, mas principalmente me fizeram rir quando eu precisava e me entupiram de café quando eu precisava mais ainda. Segue em ordem alfabética, pois assim fica mais divertido: Arianne, Cynara, Ednei, Gabriela, Lívia, Lorena, Luciana, Patrícia, Tainah, Tatiana e Vinícius.

Ao meu estagiário Fábio por ter ajudado a desenvolver este projeto.

À minha nova prima Márcia, minha veterinária favorita Raquel e minha querida pseudo Liliana, por longas horas de conselhos e risadas.

À Renata, não só pela grande ajuda neste trabalho, mas também pela amizade;

Aos amigos que estão longe e perto, desde sempre: Angela, Anna, Bárbara e Tharcyla,.

Aos meus biólogos preferidos: Priscila, Paloma, Juliana, Eloisa e Celso.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

Por fim quero agradecer à minha família:

À minha mãe Irene, que sempre me apoiou, me fortaleceu e acreditou em minhas escolhas;

Ao meu pai Flávio, que nunca saiu do meu coração e meus pensamentos;

Ao meu irmão Daniel que me ensinou a pensar e questionar o mundo a minha volta.

Ao Gregory, meu namorado e melhor amigo, pelo amor e apoio para que eu terminasse esta aventura.

À Lola, que não sabe ler (eu acho), mas que faz parte da família.

À minha grande família Moser, tios, tias, primos e primas, de que me orgulho fazer parte.

À minha segunda família: Suy, Álvaro, Thagla, Derek, Minny e Belinha, por toda ajuda nesses anos.

A Deus/ Luz/ Universo/ Anjo da Guarda, por me escutar e me tranquilizar todas as noites.

Enfim, meu muito obrigada!

“Somewhere, something incredible is
waiting to be known.”
Carl Sagan

RESUMO

TRALAMAZZA, S. M. **Diversidade fúngica, análise polifásica do gênero *Fusarium* e determinação de desoxinivalenol e zearalenona em grãos de trigo de diferentes regiões do Brasil.** 2015, 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A presença de micotoxinas em cereais e outros alimentos geram anualmente perdas bilionárias. Seus efeitos nocivos à saúde humana e animal tornaram várias micotoxinas um problema de saúde pública. Estudos epidemiológicos têm mostrado que a ausência de sintomas de giberela, doença causada principalmente pelo gênero *Fusarium*, não exclui a presença de micotoxinas, o que dificulta o controle da contaminação nos grãos. Devido à relevância da cultura de trigo na alimentação humana e animal, o presente trabalho visou utilizar o perfil polifásico, envolvendo características fenotípicas e genotípicas, na identificação de *Fusarium* spp. isolados de grãos de trigo como também investigar a presença das principais toxinas: desoxinivalenol e zearalenona nos grãos de trigo de três regiões produtoras de trigo (São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul). Para esse fim foi realizado a determinação da micobiota naturalmente encontrada em grãos de trigo recém-colhido, identificação das espécies do gênero *Fusarium*, detecção do perfil genotípico e quantificação do DNA dos fungos produtores de tricotecenos, análise do comportamento de expressão gênica de genes envolvidos na via de biossíntese de tricotecenos e determinação de desoxinivalenol e zearalenona nos grãos de trigo. Nossos resultados revelaram que os gêneros mais frequentes no isolamento do trigo foram *Alternaria*, *Fusarium* e *Epicoccum*, destacando-se também a elevada frequência de *Microdochium nivale* no Estado de São Paulo. Dentro do gênero *Fusarium* constatou-se predomínio do complexo de espécie *Fusarium graminearum* (CEFG), a saber: *F. graminearum sensu stricto*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*. Os genótipos dos isolados foram, na sua maioria, NIV para as espécies *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*, e 15-ADON para *F. graminearum* s.s. Já a determinação do genótipo nos grãos de trigo por qPCR demonstrou predomínio de 15-ADON (100% das amostras) seguido por NIV (80%) e 3-ADON (33,3%). A quantificação de DNA dos isolados do CEFG nos grãos de trigo demonstrou que o perfil 15-ADON foi responsável por 96% de todo DNA quantificado, seguido por NIV com 3.84% e 3-ADON, com somente 0.06%, indicando que 3-ADON não é um perfil relevante e que 15-ADON, é o principal genótipo de tricoteceno nos grãos de trigo nacional. Também constatou-se diferenças na expressão gênica de acordo com a espécie filogenética analisada (TRI5 e TRI12) e do comportamento de outros genes (TRI4, TRI6 e TRI101). A toxina desoxinivalenol foi detectada em todas as 150 amostras analisadas de trigo, com mediana de 323, 466 e 783 µg/kg em SP, PR e RS, respectivamente. Já a determinação de zearalenona demonstrou contaminação em 100%, 80% e 42% dos grãos dos Estados do RS, PR e SP e medianas de 843, 100 e 14 µg/kg, respectivamente.

Palavras-chave: Trigo. Fungos. *Fusarium*. Tricotecenos. Desoxinivalenol. Zearalenona.

ABSTRACT

TRALAMAZZA, S. M. **Fungal diversity, polyphasic analysis of the genus *Fusarium* and determination of deoxynivalenol and zearalenone in wheat grains from different regions of Brazil.** 2015. 98 p. Ph. D Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The presence of mycotoxins in cereals and foodstuff cause annually, billionaire losses. Their harmful effects on animals and humans became a public health problem. Epidemiologic studies showed that the absence of symptoms of *Fusarium* Head Blight, main disease in wheat, caused mainly by *Fusarium* species, do not necessarily exclude the presence of mycotoxins, which difficult contamination control of grains. Due to the wheat culture relevance in feed and foodstuff, the present work aimed to use a polyphasic approach, by phenotypic and genotypic characteristics for the identification of *Fusarium* strains from wheat grains as well to investigate the presence of deoxynivalenol and zearalenone on wheat grains from three wheat producers States (Parana, Rio Grande do Sul and Sao Paulo). To this end it was performed de mycobiota determination from freshly harvested wheat grains, identification of the isolates from the genus *Fusarium*, genotype profile and DNA quantification from trichothecene producers isolated from wheat grains, analysis of gene expression of genes involved in the trichothecene biosynthetic pathway from four producers strains and determination of deoxynivalenol and zearalenone in wheat grains. Our results showed that the most frequent genera were *Alternaria*, *Fusarium* and *Epicoccum*. Also, a high frequency of *Microdochium nivale* was found in wheat grains from Sao Paulo State. Within the *Fusarium* genus, *Fusarium graminearum* specie complex (FGSC) was dominant and four members were identified: *F. graminearum* s.s., *F. meridionale*, *F. cortaderiae* and *F. austroamericanum*. Genotype profiles from the FGSC isolates were mostly NIV for *F. meridionale*, *F. cortaderiae* and *F. austroamericanum* and 15-ADON for *F. graminearum* s.s. Genotype detection from qPCR revealed predominance of 15-ADON (100% of samples), followed by NIV (80%) and 3-ADON (33,3%). The qPCR demonstrated that 15-ADON genotype was responsible for 96% of all DNA quantified, followed by NIV with 3.84% and 3-ADON with 0.06%, indicating that 3-ADON genotype is not relevant profile and 15-ADON is the main trichothecene genotype from Brazilian wheat grains. The gene expression results, showed that some genes behaved according to the phylogenetic species analyzed (TRI5 and TRI12) and some according to other genes expression (TRI4, TRI6 and TRI101). The toxin deoxynivalenol was detected in all 150 samples analyzed from wheat grains, with medians of 323, 466 and 783 µg/kg in SP, PR and RS, respectively. The zearalenone determination showed contamination on 100%, 80% and 42% of wheat grains from RS, PR and SP State and medians of 843, 100 and 14 µg/kg, respectively.

Keywords: Wheat. Fungi. *Fusarium*. Trichothecenes. Deoxynivalenol. Zearalenone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Limites máximos tolerados de acordo com a resolução RDCn7 estipulada pela ANVISA com aplicação a partir de 2012 e 2017.....	35
Figura 1 - Isolamento fúngico de grãos de trigo.....	38
Quadro 2 - Iniciadores utilizados para identificação dos genótipos de tricotecenos.....	41
Quadro 3 - Iniciadores utilizados para detecção dos genótipos de tricotecenos em grãos de trigo.....	43
Quadro 4 - Iniciadores utilizados para análise da expressão gênica de tricotecenos.....	44
Figura 2 - Perfil de isolamento fúngico nos grãos de trigo provenientes dos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo.....	49
Gráfico 1 - Frequência de fungos isolados de grãos de trigo provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo.....	50
Figura 3 - Identificação dos isolados de <i>Microdochium nivale</i> com iniciadores espécie-específicos para <i>M. nivale</i> e <i>M. majus</i>	51
Figura 4 - Morfologia da colônia de <i>Microdochium nivale</i>	52
Figura 5 - Morfologia dos membros do Complexo de espécie <i>Fusarium graminearum</i>	54
Gráfico 2 - Frequência dos genótipos encontrados nas diferentes espécies do Complexo de espécie <i>F. graminearum</i>	56
Gráfico 3 - Frequência dos genótipos dos isolados provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo.....	57
Gráfico 4 - Proporção média da concentração de DNA de fungos produtores de tricotecenos em grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	59
Gráfico 5 - Concentração média de DNA de fungos produtores de tricotecenos em grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	60

Gráfico 6 - Concentração de desoxinivalenol e de DNA dos isolados fúngicos (15ADON+3-ADON) em grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	61
Gráfico 7 - Correlação entre produção de desoxinivalenol e concentração de DNA dos isolados (15ADON+3-ADON) em grãos de trigo.....	62
Gráfico 8 - Expressão relativa dos genes TRI4, TRI5, TRI6, TRI12 E TRI101 dos grupos biológicos <i>F. graminearum</i> s.s, <i>F. meridionale</i> , <i>F. cortaderiae</i> e <i>F. austroamericanum</i>	66
Gráfico 9 - Expressão relativa dos genes TRI6, TRI101 e TRI4 dos isolados do Complexo de espécie <i>Fusarium graminearum</i>	67
Gráfico 10 - Comparação entre as médias de produção de desoxinivalenol, zearalenona e as médias da concentração de DNA dos genótipos de tricotecenos nos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	72
Gráfico 11 - Porcentagem de co-ocorrência de DON e ZEA nos grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência dos membros do Complexo de espécie <i>Fusarium graminearum</i> isolados de grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	55
Tabela 2 - Frequência de genótipo de tricotecenos em grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	59
Tabela 3 - Determinação de desoxinivalenol em grãos de trigo naturalmente contaminado provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	68
Tabela 4 - Concentrações de desoxinivalenol encontradas nos grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	69
Tabela 5 - Determinação de zearalenona em grãos de trigo naturalmente contaminado provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	70
Tabela 6 - Concentrações de zearalenona encontradas nos grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - micrograma

µl - microlitro

15-ADON – 15-acetildesoxinivalenol

3-ADON – 3-acetildesoxinivalenol

Aa – atividade de água

AME – Alternariol monometil eter

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOH - Alternariol

BDA – Batata dextrose ágar

CEFG – Complexo de espécie *Fusarium graminearum*

CLA – Carnation leaf agar (folha de cravo ágar)

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DOM-1 – deepoxi- desoxinivalenol

DON – desoxinivalenol

EC – European Comission (Comissão Europeia)

EF-1α – Fator de alongação 1α

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas)

FB1 – Fumonisina B1

FL - Fluorescência

FNE – Fungos não esporulados

ITS – Internal transcribed space (Espaçador interno transcrito)

Kg – kilograma

LMT- Limite Máximo Tolerado

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg - miligrama

Min - minuto

ml - mililitro

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)

NIV - Nivalenol

nm – nanômetro

pb – pares de base

PCR – Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PR – Estado do Paraná

qPCR – Quantitative polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)

RS – Estado do Rio Grande do Sul

SNA – Synthetic Nutrient Deficient Agar (Ágar deficiente nutrient sintético)

SP – Estado de São Paulo

TA – Ácido tenuazônico

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)

UV – Ultra Violeta

YES – Sacarose Extrato de levedura àgar

ZEA - Zearalenona

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Trigo	19
3.1.1 <i>Histórico Nacional</i>	19
3.1.2 <i>Produção</i>	19
3.1.3 <i>Cultivo</i>	20
3.1.4 <i>Giberela</i>	21
3.2 Fungos micotoxigênicos	22
3.3 O gênero <i>Fusarium</i>	22
3.3.1 <i>Fusarium graminearum</i>	24
3.4 Genótipo de tricotecenos	25
3.5 Tricotecenos	25
3.5.1 <i>Efeitos nocivos dos tricotecenos</i>	26
3.5.2 <i>Tricotecenos tipo B</i>	28
3.5.2.1 <i>Metabolismo dos tricotecenos tipo B</i>	28
3.5.2.2 <i>Via de biossíntese e aspectos moleculares dos tricotecenos tipo B</i>	29
3.5.2.3 <i>Reguladores globais de tricotecenos</i>	31
3.6 Zearalenona	32
3.6.1 <i>Efeitos nocivos da zearalenona</i>	33
3.6.2 <i>Metabolismo de zearalenona</i>	33
3.6.3 <i>Biossíntese e aspectos moleculares de zearalenona</i>	34
3.7 Legislação para desoxinivalenol e zearalenona	34
4 MATERIAIS E MÉTODO	37
4.1 Amostragem do trigo	37
4.2 Atividade de Água (Aa)	37
4.3 Isolamento e identificação da micobiota de amostras de grãos de trigo	37
4.4 Identificação dos fungos não esporulados (FNE)	38
4.4.1 <i>Extração do DNA genômico</i>	38
4.4.2 <i>Identificação dos gêneros FNE pelo sequenciamento parcial da região espaçadora interna transcrita (ITS)</i>	38
4.4.3 <i>Reação de sequenciamento</i>	39
4.5 Identificação dos isolados de <i>Microdochium</i> spp	40
4.6 Identificação dos isolados de <i>Fusarium</i> spp	40
4.7 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B dos isolados do Complexo de espécie de <i>F. graminearum</i>	40
4.7.1 <i>Reação de PCR</i>	40
4.8 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B de grãos de trigo	41
4.8.1 <i>Amostragem de grãos de trigo</i>	41
4.8.2 <i>Extração de DNA genômico</i>	41
4.8.3 <i>Reação de amplificação por PCR quantitativa (qPCR)</i>	42

4.8.4 Validação da técnica.....	42
4.9 Expressão gênica de tricotecenos por PCR quantitativa (qPCR).....	43
4.9.1 Cultivo e isolamento de RNA	43
4.9.2 Reação de amplificação dos genes <i>TRI</i> envolvidos na via biossintética de tricotecenos.....	44
4.9.3 Análise da expressão gênica	44
4.10 Detecção e quantificação de desoxinivalenol e zearalenona nos grãos de trigo	45
4.10.1 Solventes e reagentes utilizados.....	45
4.10.2 Extração das micotoxinas.....	45
4.10.3 Instrumentação e condições cromatográficas de análise.....	46
4.11 Análises estatísticas.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Isolamento fúngico de grãos de trigo	48
5.2 Gênero <i>Microdochium</i>	51
5.3 Identificação dos isolados do gênero <i>Fusarium</i>	52
5.4 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B dos isolados do Complexo de espécie de <i>F. graminearum</i>	55
5.5 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B em grãos de trigo	58
5.6 Comparação entre a detecção dos genótipos dos isolados e a dos genótipos em grãos de trigo	62
5.7 Expressão dos genes envolvidos na via biossintética de tricotecenos	64
5.7.1 Validação do método.....	64
5.7.2 Resultados.....	65
5.8 Detecção e quantificação de desoxinivalenol em grãos de trigo	67
5.9 Detecção e quantificação de zearalenona em grãos de trigo	70
5.10 Co-ocorrência de DON e ZEA	73
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS*	76
APÊNDICES	91
Apêndice A - Curvas padrão referentes a eficiência dos iniciadores utilizados para análise de expressão gênica de tricotecenos.....	91
Apêndice B - Curva de melting indicando a especificidade dos iniciadores utilizados na técnica de expressão gênica de tricotecenos.	93
Apêndice C - Curvas padrão para quantificação de DNA dos genótipos nos grãos de trigo	95
Apêndice D - Equações das curvas analíticas dos padrões de micotoxinas e suas linearidades.....	97
Apêndice E - Cromatograma dos padrões de micotoxinas no detector A (ZEA) e B (DON).....	98

1 INTRODUÇÃO

O Brasil não é um grande produtor de trigo, o alto valor de produção e falta de incentivo do governo não permitiu essa cultura desenvolver todo seu potencial no país. Porém, o interesse tem aumentado, e a perspectiva é de um aumento de área plantada para a próxima safra (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015). Dessa forma, existe a necessidade de desenvolver um produto de boa qualidade e principalmente seguro para consumo. O complexo de espécie *Fusarium graminearum* (CEFG) são os principais agentes etiológicos de giberela, doença que torna as espigas de trigo rosadas, gerando grãos ardidos com aspecto enrugado, chocho e não comercializáveis (DILL-MACKY; JONES, 2000; GARCIA JÚNIOR, et al., 2008). Além da perda de produção, esses mesmos fungos podem produzir metabólitos tóxicos quando estão se multiplicando nos alimentos. Estes metabólitos recebem a denominação genérica de “micotoxinas” e correspondem a produtos metabólitos secundários que, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto no homem quanto outros animais (CAST, 2003). De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), as perdas mundiais de alimentos contaminados por micotoxinas estão em torno de 1000 milhões de toneladas por ano (FAO, 1997). No trigo, as micotoxinas predominantes são os tricotecenos, principalmente desoxinivalenol. Os tricotecenos são sesquiterpenos que podem causar vômito, perda de peso, desnutrição, efeitos neurotóxicos e teratogênicos (MARESCA, 2013). Outra micotoxina presente no trigo é a zearalenona que possui forte efeito estrogênico devido sua alta afinidade com os receptores de estrogênio de animais e humanos. O metabólito é responsável por causar sérios danos nos órgãos reprodutivos, como carcinomas, hiperplasia do útero, diminuição de fertilidade, modificação da próstata, entre muitos outros (ZINEDINE, et al., 2007). Em virtude da escassez de trabalhos sobre a diversidade fúngica e a presença de toxinas no trigo brasileiro, ainda não foi possível definir o perfil micotoxigênico dos grãos produzidos no Brasil.

Nosso trabalho teve como objetivo contribuir para uma melhor compreensão do perfil fúngico e do perfil de toxinas produzidas no trigo brasileiro, agregando assim mais informações para que diretrizes e regulamentações estejam de acordo com a realidade do nosso país.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Identificar as espécies do complexo de espécie *Fusarium* isoladas de grãos de trigo em três regiões produtoras do Estado do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo; utilizando estudo polifásico (características fenotípicas e genotípicas);

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a micobiota dos grãos de trigo recém-colhidos provenientes de regiões produtoras do Estado do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo;
- Analisar os aspectos morfológicos dos isolados pertencentes ao complexo de espécie *F. graminearum*;
- Identificar as espécies de *Fusarium*, a partir do sequenciamento do gene fator de elongação alfa (TEF-1 α);
- Caracterizar, empregando PCR, os isolados do complexo de espécie *F. graminearum* de acordo com seus genótipos (NIV; DON; 3ADON; 15ADON);
- Determinar, nas amostras de grãos de trigo, o perfil genotípico e quantificar o DNA dos genótipos através do PCR quantitativa;
- Avaliar, utilizando a técnica de PCR quantitativa, o perfil de expressão dos genes *TRI* a partir das espécies *F. graminearum sensu stricto*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*;
- Detectar e quantificar a presença de desoxinivalenol e zearalenona nos grãos de trigo provenientes das regiões produtoras do Estado do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Trigo

3.1.1 *Histórico Nacional*

O trigo (*Triticum aestivum*) foi introduzido no Brasil em 1534, na capitania São Vicente (atual Estado de São Paulo). No Rio Grande do Sul o trigo foi levado em 1737 onde passou a ser cultivado de maneira significativa com enfoque tanto no mercado interno como externo. Porém, devido à localização estratégica do Estado, em 1793 a coroa Portuguesa proibiu a exportação do trigo gaúcho, perdendo-se um mercado importante. Historiadores acreditam que somado a esse fato, o interesse na pecuária, conflitos estabelecidos no Estado que perduraram até 1870 e o surgimento de pragas foram fatores decisivos para o desaparecimento da cultura de trigo em 1823. A cultura ressurgiu por volta de 1875 com a vinda dos primeiros imigrantes italianos. Incentivos e novas regulamentações permitiram a cultura se fortalecer novamente (JACOBSEN, 2003).

3.1.2 *Produção*

O trigo é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, após o milho e o arroz (FAO, 2015). Porém, hoje o Brasil não é um grande produtor de trigo. Com uma produção nacional aproximada de cinco milhões de toneladas e consumo interno de 11 milhões, mais da metade do trigo consumido no país precisa ser importado (CONAB, 2015). Hoje a maioria do trigo tem origem na Argentina, Estados Unidos e Uruguai. Essa discrepância ocorre devido a inúmeros fatores, como alto valor de produção, falta de incentivo do governo, acordos de importação que não protegem o mercado interno, além da necessidade de clima e solo adequados.

Felizmente, nos últimos anos devido ao avanço genético e manejo, aumentou o interesse por parte dos agricultores em investir na cultura do trigo, o que gerou um aumento significativo tanto na área de cultivo como de produção (CONAB, 2015). Diante da mudança de mercado, os estudos voltados a qualidade do grão nacional são essenciais.

Devido à preferência por temperaturas amenas, os maiores produtores de trigo no Brasil ficam na região Sul, nos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná. Sendo o RS responsável por quase 90% da produção. Produções em menor escala também se encontram em São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina (CONAB, 2015).

3.1.3 Cultivo

O período de semeadura, cultivar, adubação do solo como também o manejo da cultura diferem de acordo com o local que é realizado o cultivo. No RS, principal produtor de trigo, a semeadura se dá entre maio e julho, dependendo da região. O ciclo de desenvolvimento da cultura pode ser dividido em três fases: vegetativa, reprodutiva e de enchimento dos grãos.

A fase vegetativa envolve a germinação das sementes até o desenvolvimento das primeiras estruturas foliares (estádio duplo-anel). A fase reprodutiva engloba o período que vai do estágio duplo-anel até antese (floração). Nesse período ocorre a diferenciação das estruturas florais e o número de flores férteis (virtualmente o número de grãos). A última fase é definida pelo enchimento dos grãos e vai da fase da antese até a maturação, definido pela massa final de cada grão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2002).

O período da semeadura a colheita leva em torno de 120 dias. Porém tem-se investido em cultivares de ciclo precoce (em torno de 110) para evitar intempéries como também antecipar a safra de verão (SCHEEREN et al., 2007).

No processo de colheita o ideal é coletar os grãos com umidade em torno de 13%. Entretanto para se evitar mau tempo lavouras podem ser colhidas antecipadamente. Nesses casos, ocorre o processo de secagem para reduzir a umidade. Na última etapa, a de armazenamento, vários cuidados são tomados para evitar a perda de qualidade dos grãos ou deterioração: o teor de umidade não deve ultrapassar os 13%, tanto os silos como equipamentos devem ser higienizados e o local de armazenamento bem areado (EMBRAPA, 2002).

Desde 2010 novas regras normativas foram realizadas para determinação da qualidade do trigo. De maneira geral, o grão é avaliado tanto por sua aparência (coloração, defeitos, não germinados), presença de doença (giberela, ferrugem,

brunose) e limpeza. Como também por suas características físico-químicas como estabilidade (tempo que uma massa mantém estável suas características viscoelásticas), força do glúten (trabalho mecânico necessário para expandir a massa até sua ruptura) e peso hectolitro (a massa de 100 litros de trigo expressa em quilograma) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2010).

3.1.4 Giberela

As plantações de grãos podem ser acometidas por várias doenças e muitas são ocasionadas por fungos, sobretudo quando não é realizado um manejo adequado. Dentre os fatores que afetam a transmissão de patógenos a partir da semente e que podem afetar o estabelecimento do patógeno em uma cultura, destacam-se: a espécie cultivada, condições do solo, temperatura, vento, chuva, inóculo, práticas culturais, microflora do solo e da semente (BARBA et al., 2002).

A giberela é uma doença de infecção floral causada principalmente pelos membros do Complexo de espécie *Fusarium graminearum*, e em menor frequência por espécies como *F. culmorum* e *F. avenaceum*. Ela afeta diversos cereais em todo mundo (CHAMPEIL; DORÈ; FOURBET, 2004; PARRY; JENKINSON; McLEOD, 1995) e foi descrita pela primeira vez no Reino Unido no fim do século 19 (SMITH, 1884 apud CHAMPEIL; DORÈ; FOURBET, 2004).

A via inicial de infecção é no período de extrusão das anteras (floração) da planta (LACEY; BATEMAN; MIROCHA, 1999; STRANGE; SMITH, 1971). O fungo sobrevive entre as estações de cultivo como saprófito na superfície do solo em resíduos de culturas anteriores. Sob condições ótimas de umidade (elevada) e temperatura (20-30 °C), produz peritécios que liberam seus esporos sexuais (BAI, 1994). Esses esporos juntamente com esporos assexuais (macroconídeos) podem ser carregados a longas distâncias através do vento e da chuva. A partir da infecção na etapa de floração, o fungo se propaga para o resto do tecido vegetal. Os danos causados pela doença são qualitativos como quantitativos. A doença torna as espigas de trigo rosadas, acarretando em grãos ardidos com aspecto enrugado e chocho (DILL-MACKY; JONES, 2000; GARCIA JÚNIOR, et al., 2008; ROSSI et al., 2001). Ela também reduz a qualidade nutritiva e tecnológica dos grãos (teor de

proteínas, valores nutricionais e vigor de sementes (HORVAT et al., 2014; SIUDA et al., 2010).

Na Argentina, nosso maior exportador de trigo, surtos da doença foram relatados em 1978, 1985, 1993 e 2001, com perdas variando entre 20% a 50% (BAINOTTI et al., 2013). Estudos no Brasil mostram que a presença de giberela nas lavouras do RS é persistente e sua incidência vem aumentando ao longo dos anos (CASA et al., 2004; EMBRAPA, 2014; PANISSON; REIS; BOLLER, 2003)

3.2 Fungos micotoxigênicos

Além causar giberela, as espécies de *Fusarium* também são potencialmente produtoras de micotoxinas, principalmente zearalenona e tricotecenos. Metabólitos que causam sério prejuízo econômico no setor de grãos e cereais. Estes metabólitos recebem a denominação genérica de “micotoxinas” e correspondem a produtos metabólitos secundários que, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto no homem quanto outros animais (CAST, 2003).

O alto potencial toxigênico e fitopatológico revela a necessidade de estudar profundamente a taxonomia do gênero *Fusarium*. Entretanto, a identificação e classificação do gênero *Fusarium* foi sempre complexa e controversa, diferindo entre si principalmente pelas metodologias adotadas. (NELSON; DIGNANI; ANAISSIE, 1994).

3.3 O gênero *Fusarium*

O fungo *Fusarium* foi primeiramente descrito por Link em 1809 e na época denominado *Fusisporium*. Com mais de 1000 indivíduos descritos, o gênero foi dividido pela primeira vez por Wollenweber e Reinking (1935). Os autores separaram o grupo em 16 seções que incluíam 65 espécies, 55 variedades e 22 formas, utilizando critérios morfológicos como tamanho e forma de macroconídeos, presença de clamidósporos como também crescimento em diferentes meios. Entretanto, ao longo dos anos diversas divisões foram criadas para o gênero

(NELSON, 1991). Em 1940 Snyder e Hansens diminuíram severamente o número de espécies para somente nove. Décadas depois, Nirenberg em 1982, categorizou o gênero em aproximadamente 90 espécies e Nelson um ano depois, destacou 30 espécies oficiais e classificou outras 16 como prováveis espécies. (BROWN; PROCTOR, 2013).

Contudo, com o tempo diferentes definições de espécies começaram a surgir. O uso do cruzamento sexual entre diferentes espécies fúngicas (mating type) definiu um novo conceito: o conceito biológico de espécie. Este conceito é definido por: indivíduos capazes de cruzar entre si, combinar informação genética e passar para progênie. Essa técnica permitiu a identificação de novas espécies antes crípticas como, por exemplo, *F. thapsinum* (KLITTICH et al., 1997).

O uso de marcadores bioquímicos tem sido outra importante ferramenta para a identificação na micologia. Um perfil de metabólitos secundários pode incluir toxinas, antibióticos e outros componentes. Eles são produzidos por um número limitado de espécies dentro de um gênero, ordem ou ainda filo e possuem um alto poder de diferenciação (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008). Zain (2010) definiu o perfil bioquímico de diferentes isolados de *Fusarium*, analisando ácidos graxos, aminoácidos e metabólitos secundários e observou que o último obteve maior diversidade e possuía potencial como uma ferramenta para identificação do gênero.

Atualmente para descrição de novas espécies do gênero *Fusarium* ou para solução de antigos problemas taxonômicos, o conceito de espécie filogenética tem sido o mais empregado. As técnicas moleculares permitiram identificar espécies através de suas sequências parciais de DNA de um ou mais genes e relaciona-las evolutivamente. As descrições mais recentes de novas espécies como nos casos dos complexos de espécies de *F. graminearum*, *G. fujikuroi* e *F. solani* foram definidas, sobretudo através de suas filogenias (BROWN; PROCTOR, 2013).

Com o advento da filogenia, as informações sobre o grupo *Fusarium* se tornaram mais robustas, porém intrincadas. Os tipos e número de genes estudados, como a qualidade da análise, podem afetar severamente o resultado final.

Assim, diante das limitações de cada conceito, a abordagem polifásica, agregando informações filogenéticas, biológicas, morfológicas e bioquímicas, tem sido empregada para resolver questões taxonômicas de maneira mais robusta no gênero *Fusarium* (BROWN; PROCTOR, 2013).

3.3.1 *Fusarium graminearum*

F. graminearum (Schawabe) Petch, (1936) (forma teleomórfica *Giberella zeae* Schwein) por muitos anos foi considerado uma única espécie. Inicialmente a espécie foi dividida em dois grupos: grupo I é caracterizado por isolados heterotáticos (requer dois organismos com mating type diferentes para reprodução) e quando cultivados em meio CLA não desenvolvem peritécio e grupo II é definido por isolados homotáticos (organismo apresenta ambos mating types necessários para reprodução) e com alta formação de peritécios em meio CLA (FRANCIS; BURGESS, 1977). Em 1999, a espécie foi redefinida. A classificação por grupos foi extinta através do estudo das estruturas morfológicas, como também análise do gene β -tubulina e o então grupo II foi mantido como *F. graminearum* e o grupo I foi redefinido como a nova espécie *F. pseudograminearum* (AOKI; O'DONNEL, 1999).

Uma investigação em 2000, por análise filogenética de seis genes nucleares determinou que a espécie pandêmica *F. graminearum* na realidade era formada por um clado monofilético que continha sete linhagens estruturadas geograficamente. Contudo, somente em 2004 após a análise de 11 genes nucleares e características morfológicas, o complexo de espécie *Fusarium graminearum* (CEFG) foi definido e dividido em 9 espécies filogenéticas (O'DONNEL et al., 2004). Acredita-se que eventos de separação geográfica levaram às diferenças gênicas entre as espécies como também ao isolamento reprodutivo entre a maioria dos membros.

CEFG são morfologicamente semelhantes entre si, sendo que a maioria não pode ser identificada por suas características fenotípicas. Todos os membros estudados são potenciais produtores de ao menos uma forma de tricoteceno tipo B (O'DONNEL et al., 2004). Evidências recentes mostraram a existência de isolados da espécie *F. graminearum* s.s (linhagem 7) que não são produtores de tricotecenos tipo B no entanto são produtores de duas recém descobertas - toxinas NX-2 e NX-3 - do grupo de tricotecenos tipo A (VARGA et al., 2014). Entretanto, essa descoberta é nova e precisa ser mais bem esclarecida. Após a formação do clado, novas espécies foram incluídas e até o momento 16 espécies fazem parte do complexo.

3.4 Genótipo de tricotecenos

A determinação do potencial toxigênico do fungo pela sua sequência gênica é denominada genótipo. Na literatura, também é possível encontrar o termo quimiotipo (JENNINGS et al., 2004; LEE et al., 2001; STEPIEN et al., 2008) porém, quimiotipo deve ser utilizado somente quando for realizada a determinação química das toxinas (DESJARDINS, 2006).

Os isolados produtores de tricotecenos tipo B normalmente apresentam um dos três perfis de genótipo: NIV - nivalenol e seus derivados acetilados; 3-ADON – desoxinivalenol e o derivado 3-acetildesoxinivalenol; 15-ADON – desoxinivalenol e o derivado 15-acetildesoxinivalenol (WARD et al., 2002). Com o sequenciamento e compreensão das funções dos genes TRI envolvidos na via biossintética de tricotecenos, foram desenvolvidos iniciadores específicos para determinação do genótipo. Iniciadores baseados nas sequências dos genes TRI3 e TRI12 (WARD et al., 2002) foram desenvolvidos para diferenciar três genótipos toxigênicos (3-ADON, 15-ADON e NIV) e os genes TRI7 e TRI13 (CHANDLER et al., 2003) para distinguir os genótipos DON e NIV.

A capacidade de predição utilizando o perfil genotípico é normalmente consistente com o real potencial toxigênico dos isolados (QUARTA et al., 2006; REYNOSO et al., 2011; WARD et al., 2002) contudo, há relatos onde foram encontradas algumas inconsistências (ALVAREZ et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2008).

O uso da técnica de genótipo permite definir a distribuição geográfica do perfil toxigênico e prever o impacto desses patógenos na segurança alimentar, de maneira mais acessível que a determinação do conteúdo toxigênico por análises químicas.

3.5 Tricotecenos

Os tricotecenos são caracterizados pela presença do esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricoteno (GUTLEB; MORRISON; MURK; 2002) e podem ser divididos em quatro tipos (A-D) de acordo com seus grupos funcionais característicos. Tipo A possui um grupo isovaleril ao C-8 e membros desse grupo incluem toxina HT-2,

toxina T-2 e diacetoxiscirpenol (DAS). Tipo B possui no C-8 um grupo carbonil e incluem desoxinivalenol (DON), seus derivados (3-ADON e 15-ADON), nivalenol (NIV) e seu derivado (4-ANIV). Tipo C e D são menos frequentes e suas diferenças ocorrem devido a presença de um segundo grupo epoxi no C- 7, 8 ou C-9,10 e a presença de um anel macrocíclico entre C-4,5 e C-5, respectivamente (GUTLEB; MORRISON; MURK, 2002; UENO, 1983). Em geral, os tricotecenos do tipo D e C são os mais tóxicos, seguido pelo tipo A e B (UENO, 1984). Contudo, a elevada frequência de tipo B encontrados em cereais ocasionou um maior impulso de estudos nesta área (DESJARDINS, 2009). Em 2013, membros da Autoridade de Segurança Europeia realizaram uma avaliação toxicológica com mais de 26 mil cereais e produtos derivados de cereais e constataram a presença de DON em 44,6%, 43,5% e 75,2% em grãos pré-processados, alimentos e rações animais, respectivamente (EFSA, 2013).

3.5.1 Efeitos nocivos dos tricotecenos

O número de trabalhos documentando os efeitos prejudiciais devido a ingestão de tricotecenos vem aumentando. Tricotecenos de maneira geral inibem a síntese de proteínas *in vivo* e *in vitro* (AZCONA et al., 1995; UENO, 1983). Estudos já mostraram que a ingestão de DON e NIV pode induzir a vômitos, deficiências nutricionais, perda de peso e anorexia em animais (PESTKA; AMOLINSKI, 2005; SMITH; HEMILLAN; CASTILLO, 1997; TAKAHASHI et al., 2008; UENO, 1983), também ambos possuem efeitos imunotóxicos. Pesquisadores mostram que a dose, frequência e tempo de exposição podem estimular ou suprimir o sistema imune do organismo. Alterações nos anticorpos IgA IgG e IgM como também interleucinas e células MPKs já foram relatadas (GOUZE et al., 2007; PESTKA, 2004). Outro efeito bem descrito são as alterações no sistema reprodutivo. Pesquisadores apontam que a ingestão de DON e NIV em camundongos grávidas causa diminuição do tamanho e peso do útero, redução fetal e aumento no número de mortes fetais (COLLINS et al., 2006; ITO, 1986). A toxina T-2 também demonstrou causar efeitos citotóxicos como apoptose celular (KONIGS et al., 2009), levar a alterações do sistema reprodutivo de camundongos (YANG et al., 2010) e deficiência nutricionais (FRANKIC; SALOBIR; REZA, 2008).

Em humanos a avaliação dos efeitos é principalmente evidenciada por estudos *in vitro*. Trabalhos utilizando linhagens celulares humanas como células leucêmicas (HL60) mostram que DON e NIV atuam na diminuição da proliferação celular, sendo NIV mais potente que DON. Resultados similares também foram registrados com outra linhagem semelhante à MOLT-4 (NAGASHIMA et al., 2006, 2012). Outro estudo utilizando linhagem humana intestinal Caco-2, indicam que DON também apresenta potencial genotóxico (BONY et al., 2006). Aumento na permeabilidade da barreira paracelular epitelial também foi documentado como um dos efeitos de DON, 3-ADON e 15-ADON na mesma linhagem celular (KADOTA et al., 2013).

Mesmo diante de tantos estudos demonstrando os diversos efeitos nocivos que os tricotecenos podem causar em animais e humanos, identificar os casos de contaminação dessas toxinas continua sendo um desafio. Peraica et al. (1999), relatam prováveis eventos de micotoxicoses em humanos envolvendo tricotecenos. A primeira grande manifestação reconhecida foi de aleukia (ausência ou extrema redução de glóbulos brancos na circulação sanguínea), ocorrida em 1932 na União Soviética, onde houve uma taxa de mortalidade de cerca de 60%. Um caso mais recente ocorreu na Índia em 1987, onde aproximadamente 100 pessoas foram afetadas por irritação na garganta, dor abdominal e diarreia, e acredita-se que as toxinas NIV, T-2 e DON foram responsáveis pelo surto. Casos isolados também já foram relatados. Etzel et al. (1998) associaram um surto de intensa hemorragia pulmonária aguda em crianças com a inalação de *Stachybotrys atra*, espécie também produtora de tricotecenos. Os pesquisadores isolaram uma quantidade significativa do fungo nas residências dos pacientes quando comparado ao grupo controle, porém a responsabilidade não foi oficialmente confirmada.

Comprovar surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas é uma tarefa desafiadora, principalmente em humanos onde os casos são normalmente de intoxicações agudas com sintomas similares a várias patologias. A falta de informação e investigação acaba levando a diagnósticos equivocados ou a carência de registros.

3.5.2 Tricotecenos tipo B

3.5.2.1 Metabolismo dos tricotecenos tipo B

Uma extensa revisão por Maresca (2013) agrega de maneira clara o que possivelmente ocorre no processo de ingestão de desoxinivalenol. Após a ingestão oral de DON ou de seus derivados (3-ADON, 15ADON), a primeira fase de intoxicação ocorre na passagem da parede intestinal. Porém a eficiência de absorção e metabolização de DON varia muito de acordo com a espécie animal. A microbiota intestinal que vive em simbiose com o hospedeiro é fortemente responsável por essa variação (BARNETT et al., 2012; CHOW et al., 2010).

Em aves ou animais poligástricos (mais de uma cavidade digestiva) como os ruminantes, elevadas populações bacterianas ocorrem tanto antes do intestino delgado (ex: rúmen) como depois (ex: cólon) (FREY, et al., 2010). A presença dessa população no rúmen reduz extensivamente a quantidade de DON que irá atingir o intestino delgado para absorção, levando esses animais a serem quase insensíveis à intoxicação oral por DON. Isso ocorre porque parte da população bacteriana desses animais é capaz de converter DON em DOM-1, metabólito não tóxico devido à retirada do grupo epóxi responsável pela principal toxicidade do metabólito.

Já animais monogástricos (uma cavidade digestiva) como humanos, porcos e roedores, o maior conteúdo bacteriano se encontra no cólon, após o intestino delgado (WALTER; LEY, 2001). Assim, elevadas quantidades de DON conseguem cruzar o epitélio intestinal e alcançar o compartimento sanguíneo. Estudos mostram que porcos que ingeriram DON de forma aguda ou crônica, tiveram 54% e 89% da toxina absorvida, respectivamente (GOYARTS; DÄNICKE et al., 2006). Ao contrário de vacas que somente 16% da toxina ingerida atingem o intestino delgado e apenas 1% é encontrado no sangue (PRELUSKY et al., 1984). Após a intoxicação oral em porcos, DON é detectado no plasma em até 30 minutos e atinge sua maior concentração após 2-3 horas de exposição, sugerindo uma rápida absorção através do intestino delgado, principalmente no jejuno (DANICKE; VALENTA; DOLL, 2004; GOYARTS; DÄNICKE et al., 2006)

Diferentemente de aves e ruminantes, a transformação de DON em DOM-1 em animais monogástricos ocorre essencialmente pela população bacteriana no cólon. Por isso somente uma pequena porcentagem de DON ingerido é encontrado

em fezes desses animais, pois a maior parte já foi absorvida no intestino delgado. A eliminação de DON e metabólitos derivados ocorrem principalmente pela urina em forma de DON, glucoronado-DON (D3GA e D15GA), glucoronado-DOM-1 e DOM-1 (ERIKSEN et al., 2002; ERIKSEN; PETTERSSON; LINDBERG, 2003). As formas glucoronadas são uma maneira de o próprio organismo diminuir a toxicidade do metabólito. Essa estratégia ocorre tanto em animais (D3GA e D15GA) como em plantas (D3G). As enzimas glicoronil transferases inserem um ácido glicorônico no substrato (DON), elevando a polaridade do metabólito e dificultando o seu transporte pela membrana celular. Também a adição do ácido confere ao metabólito um aumento em sua solubilidade e consequente aumento na velocidade de sua eliminação pela urina e fezes (WU et al., 2007).

Além da barreira intestinal, estudos mostram que DON também é capaz de ultrapassar a barreira sanguínea e chegar às células cerebrais. A barreira é formada por deposição de células endoteliais e gliais que permite uma seleção na passagem de moléculas do plasma para o fluido cerebrospinal (FCS) (NICO; RIBATTI, 2012). Estudos *in vivo* apontam que DON consegue ultrapassar a barreira de maneira rápida, sendo detectado até 60 minutos após exposição de acordo com a espécie (PRELUSKY; HARTIN; TRENHOLM, 1990). Em porcos, 25-30% do DON plasmático é encontrado no FCS. Em ovelhas esse valor cai para 5% (PESTKA; ISLAM; AMUZIE, 2008). O mecanismo de absorção ainda não está esclarecido, porém DON é detectado unicamente em sua forma original, indicando que seus derivados são incapazes de ultrapassar a barreira (PRELUSKY; HARTIN; TRENHOLM, 1990).

3.5.2.2 Via de biossíntese e aspectos moleculares dos tricotecenos tipo B

Os genes regulatórios e de biossíntese de tricotecenos tipo B foram mapeados em 4 diferentes loci dentro de *F. graminearum*. A via biossintética de tricotecenos das espécies de *Fusarium* envolve uma série de ciclizações, acetilações e oxigenações e até o momento foram identificados 16 genes com funções definidas envolvidos na via, sendo 13 indispensáveis para garantir a produção de tricotecenos. (DESJARDINS; PROCTOR, 2007).

O gene TRI5 foi o primeiro gene a ser descoberto na via de biossíntese de tricotecenos. Ele codifica a enzima tricodieno sintetase, que forma tricodieno,

precursor de todos os tricotecenos. Por ser o primeiro gene identificado e estar inserido no cerne, TRI5 também é o nome do maior cluster da via, compreendendo 12 genes (DESJARDINS, 2006). Em outro locus estão os genes TRI1 e TRI16 que codificam para enzimas que catalisam a oxigenação de C-8 e O- acetiltransferase, respectivamente. Em dois outros loci estão TRI101 que codifica uma C-3 O-acetiltransferase e TRI15 que forma um fator de transcrição dedo de zinco e é possivelmente um regulador da via (ALEXANDER et al., 2004).

Após catalisar a reação de formação de tricodieno (Tri5), o gene TRI 4 é responsável por várias oxigenações formando o metabólito intermediário isotricotiol. Este é convertido em isotricodermina pela acetiltransferase codificado pelo gene TRI101. Essa reação reduz a toxicidade do tricoteceno, um mecanismo de autoproteção do fungo contra os metabólitos tóxicos. Após este evento ocorre adição de grupo hidroxil controlado por TRI11 que em seguida é acetilado por TRI3 levando a formação de calonectrina. Essas etapas são comuns a ambos os tricotecenos tipo A (T-2) e tipo B (DON). Depois, ocorrem reações que irão resultar nos diferentes quimiotipos (DON, 3-ADON, 15-ADON e NIV). Em *F. graminearum* os genes TRI7 e TRI13 são funcionais somente em isolados produtores de NIV. Sua continuação da via gera o produto 4-acetilnivalenol (TRI1) e uma última etapa gera a formação de NIV pelo transcrito do gene TRI8. Em isolados produtores de DON, os genes TRI7 e TRI13 não são funcionais. Após a formação de calonectrina, o produto de TRI8 é responsável por remover o grupo C-3 acetil ou C-15 acetil, resultando em um dos derivados 15-ADON e 3-ADON. A formação de 3ADON ou 15ADON é específica do isolado, dependendo da sequência de TRI8 que codifica a esterase (MERHEJ; FORGET; BARREAU, 2011). Após os derivados ocorre a formação de DON. Entretanto, muitos mecanismos de síntese ainda não estão completamente elucidados. Por exemplo, sabe-se que o gene TRI12 tem como função bomba de efluxo para retirada dos metabólitos (ALEXANDER et al., 1999), porém não há informação concreta do momento que ele ocorre na via.

Outros três genes importantes para síntese são os reguladores TRI6, TRI10 e TRI15. O gene TRI6 é um forte regulador positivo da via de biossíntese. Ele codifica um fator de transcrição zinco de dedo Cys₂His₂ que atua nos demais genes da via. Seu silenciamento diminui drasticamente a produção de tricotecenos dentro do fungo (DESJARDINS, 2006; MCCORMICK et al., 2011). O gene TRI10 aparenta co-regular com TRI6 diversos genes da via, contudo ele parece regular o próprio

TRI6 (PEPLOW et al., 2003; TAG et al., 2001). O gene TRI15, também codifica um fator de transcrição dedo de zinco, porém acredita-se que ele possua o papel inverso e regule negativamente a via de biossíntese (ALEXANDER, et al., 2004). Mesmo bem caracterizada a via de biossíntese ainda não esta completamente esclarecida, estudos já demonstraram que genes globais, que atuam em diferentes locais dentro do fungo também regulam a expressão de tricotecenos.

3.5.2.3 Reguladores globais de tricotecenos

A produção de tricotecenos é impactada por vários reguladores fora da via principal de biossíntese. Esses reguladores atuam de forma global, principalmente sob mudança de fatores abióticos como pH, luz e perfil nutricional.

O pH é possivelmente o fator que mais afeta a biossíntese de tricotecenos. Estudos já demonstraram que em culturas *in vitro* de *F. graminearum* em meio mínimo, o fungo acidifica o substrato e ambos, produção de tricotecenos e expressão dos genes TRI, aumentam diante da redução de pH (GARDINER et al., 2009; MERHEJ et al., 2010).

Outro fator abiótico importante na regulação é a luz. A ativação ou modificações de vias de biossíntese em fungos ocorrem em contato com a luz. A proteína regulatória de luz é a VeA, codificada pelo gene Velvet. A proteína VeA faz parte do complexo proteico VelB/VeA/LaeA localizado dentro do núcleo em condições de escuro (BAYRAM, et al., 2008). Além de atuarem no processo de frutificação e metabolismo de carotenoides, polissacarídeos e ácidos graxos, estudos já demonstraram que diversas micotoxinas são reguladas pela ação da luz. As proteínas VeA e LaeA parece possuir papel central na regulação mediada pela luminosidade. VeA é uma proteína conservada e seus ortólogos foram encontrados em diversos fungos micotoxigênicos. A deleção de *FvVE1* em *F. verticillioides* suprimiu completamente a produção de fumonisina (MYUNG et al., 2009). Em *F. graminearum* a desrupção do gene *FgVe1D* afetou a capacidade do fungo de expressar diversos genes TRI e produzir tricotecenos. O crescimento do fungo, o desenvolvimento dos conídeos e biossíntese anormal de aurofusarina também foi afetado (MERHEJ; FORGET; BARREAU, 2012).

Fontes nutricionais também apresentam um papel regulatório importante na produção de micotoxinas. A fonte de carbono parece influenciar os níveis de tricotecenos em culturas de *F. graminearum*. Os dados mostram que *F. graminearum* produz mais tricoteceno em substrato com sacarose que com glicose, indicando a preferência por fontes mais simples de metabolizar que fontes mais complexas (JIAO et al., 2008). Comportamentos similares também foram descritos nas espécies *F. asiaticum* e *F. avenaceum* (AKIRA et al., 2014; SORENSEN; GIESE, 2013). O mecanismo é conhecido como "repressão de carbono" e implica que a proteína repressora CreA na presença de glicose inibe a transcrição de diversos genes quando se liga a sequências específicas na região promotora dos genes alvo (RONNE, 1995). A sequência consenso de ligação de CreA foi encontrada numa região intergênica entre TRI4 e TRI6 em *F. graminearum*, indicando que a repressão de genes por CreA também deve ocorrer em tricotecenos (MERHEJ; FORGET; BARREAU, 2012).

3.6 Zearalenona

Zearalenona é uma lactona de ácido resorcíclico, estrogênica não esteroide, biosintetizada por cepas do complexo *F. graminearum*, e espécies próximas como *F. crookwellense* e *F. culmorum* (DESJARDINS, 2006). Seu nome é originado da combinação de *G.zeae* (espécie fúngica onde a toxina foi primeiramente isolada em 1966) e sua estrutura química – lactona de ácido resorcíclico. É estável e dificilmente degradada no processo de fabricação de alimentos e rações (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES - JECFA, 2000). ZEA é o metabólito mais encontrado do grupo, porém α - zearalenol (α -ZEA), β - zearalenol (β -ZEA) e 4-acetilzearalenona também podem ser encontrados naturalmente em cereais (DESJARDINS, 2006). O metabólito α -zearalanol é também comercializado como estimulante de gado, porém está banido da União Europeia desde 1985 (JECFA, 2000).

3.6.1 Efeitos nocivos da zearalenona

Sua relevância tem sido apontada por possuir forte efeito estrogênico devido sua alta afinidade com os receptores de estrogênio de animais e humanos (KUIPER et al., 1998). Todos seus metabólitos têm semelhanças estruturais suficientes com o estrogênio natural de humanos e animais. Isso garante sua capacidade de ativar os receptores levando a alterações de genes ligados ao estrogênio (PARVEEN et al., 2009). Diversos efeitos nocivos são atribuídos a ingestão de ZEA principalmente após exposição crônica. Ela está associada principalmente a alterações nos órgãos envolvidos com a reprodução, e já foi associada a carcinomas, hiperplasia do útero, diminuição de fertilidade, e modificação da próstata em animais (COLDHAM, et al 1997; ZINEDINE, et al., 2007). Também há relatos de seu efeito genotóxico em culturas de linfócito bovino *in vitro* (LIOI et al., 2004) como também fragmentação de DNA e produção de micronúcleo em células Caco-2 e VERO (rim de macaco) (ABID-ESSEFI et al., 2003). Estudos também indicam que ZEA pode apresentar um papel importante em tumores dependentes de hormônios (TOMASZEWSKI et al., 1998; WITHANAGE et al., 2001). Ela foi detectada no tecido de mulheres com hiperplasia e adenocarcinoma endometrial (TOMASZEWSKI et al., 1998) como também foi associada ao desenvolvimento sexual precoce de meninas na região da Toscana, Itália (MASSART et al., 2008). Seu metabólito α -ZEA já foi associado ao desenvolvimento de câncer de mama (BELHASSEN et al., 2015).

3.6.2 Metabolismo de zearalenona

Pouco se sabe sobre como a toxina é metabolizada no organismo. Acredita-se que após a ingestão oral, ZEA é rapidamente absorvida pelas células intestinais e metabolizada no fígado. ZEA então pode ser transformada em α -ZEA, β -ZEA, α -ZAL (α -zearalanol) e β -ZAL (β -zearalenol) (MILES et al., 1996). Entretanto os metabólitos encontrados no tecido hepático e na bile diferem em proporção de acordo com a espécie estudada. Humanos e porcos convertem a maioria de ZEA em α -ZEA, já em gados o metabólito predominante é β -ZEA (MALEKINEJAD; MASS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006; PILLAY et al., 2002; VIDEMANN et al., 2008). Parte dos metabólitos é então conjugada com ácido sulfônico ou glucorônico, diminuindo significativamente a capacidade estrogênica dos mesmos, possivelmente

uma forma do organismo de evitar a interação desses compostos com seus receptores (FRIZZELL et al., 2015). A conjugação também garante um aumento na solubilidade o que os leva a serem excretados mais facilmente pela urina (ZINEDINE et al., 2007).

3.6.3 Biossíntese e aspectos moleculares de zearalenona

A síntese de ZEA ainda não foi bem definida, mas sabe-se que é formada por um cluster que envolve ao menos quatro genes: ZEB1, ZEB2 e dois genes PKSs (policetídeos sintetase) - PKS13 e PKS4. PKSs são conhecidos por catalisarem a biossíntese de policetídeos, que são uma classe abundante e variada de compostos naturais como antibióticos, toxinas e pigmentos (KELLER; HOHN, 1997).

A via biossintética de ZEA começa por PKS4 que catalisa a condensação de acetil-coA e cinco unidades de malonyl-CoA formando um hexacetídeo. O produto do gene PKS13 estende o hexacetídeo resultando num nonacetídeo. Este passa por duas reações de ciclizações que leva a formação de um anel aromático e depois a formação de um anel macrolídeo gerando o composto zearalenol (ZOL). A última etapa converte o recém-formado ZOL em ZEA e é catalisada por ZEB1 que por oxidação converte hidroxila em cetona. A proteína ZEB2 é um fator de transcrição que contém um domínio zipper leucina e parece funcionar como um regulador da expressão dos genes do cluster (KIM et al., 2005).

3.7 Legislação para desoxinivalenol e zearalenona

Como um dos maiores produtores e exportadores de grãos do mundo, o Brasil teve que se adequar as exigências e normas envolvendo níveis de micotoxinas em alimentos e rações.

Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou no Diário da União a portaria RDCn7 regulamentando o limite máximo tolerado (LMT) de diversas micotoxinas (aflatoxina, fumonisina, patulina, etc) presentes em diferentes alimentos, limites estes, que não havia anteriormente. O quadro 1 mostra os LMT das toxinas DON e ZEA em vigor desde 2012. Entretanto, a partir de 2017, os limites serão mais rigorosos como também será incluído a análise de grãos de

trigo e milho pré-processados. Originalmente, a data para inclusão de grãos e novos limites de micotoxinas seria em 2014, porém, os novos limites foram postergados para o ano 2017 na resolução RDC n59 (ANVISA, 2013).

Quadro 1 - Limites máximos tolerados de acordo com a resolução RDCn7 estipulada pela ANVISA com aplicação a partir de 2012 e 2017.

Micotoxinas	Alimentos	2012 LMT($\mu\text{g/kg}$)	2017 LMT($\mu\text{g/kg}$)
DON	Trigo em grãos e milho para posterior processamento	nr	3000
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	2000	1000
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada maltada.	1750	750
ZEA	Trigo em grão e milho para posterior processamento	nr	400
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	400	200
	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	200	100
	Arroz beneficiado e derivados	200	100
	Arroz integral	800	400
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	300	150
	Farelo de arroz	1000	500

nr- não regulamentado

Para grãos de trigo o LMT a partir de 2017 será de 3000 e 400 $\mu\text{g/kg}$ para DON e ZEA, respectivamente. Em trigo integral e farinhas, o limite máximo será de 1000 $\mu\text{g/kg}$ para DON e 200 $\mu\text{g/kg}$ para ZEA (Quadro 1). É importante destacar que em outros países os LMT tendem a ser mais rigorosos. Na União Europeia, para grãos de trigo o máximo permitido é de 1750 $\mu\text{g/kg}$ para DON e 100 $\mu\text{g/kg}$ para ZEA (EC, 2006). No Canadá e China o LMT para grãos de DON é de 2000 e 1000 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente (CANADIAN FOOD INSPECTION - CFIA, 2012; USDA, 2011).

Mesmo com níveis mais flexíveis, a regulamentação dos LMT para micotoxinas foi um grande avanço para os consumidores como para a indústria brasileira.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Amostragem do trigo

Foram utilizados grãos de trigo recém-colhidos provenientes de três regiões produtoras: Rio Grande do Sul (50), Paraná (50) e São Paulo (50) totalizando 150 amostras de 1 kg cada. As coletas foram realizadas durante os meses de setembro (Nova Itacolomi – PR), outubro (Campo Bonito- SP) e novembro (Passo Fundo – Rio Grande do Sul) de 2012. Essa variação ocorreu devido às variedades específicas de trigo plantadas em cada região, como também variações climáticas de cada estado.

4.2 Atividade de Água (Aa)

A atividade de água das 150 amostras de grãos de trigo foram medidas no equipamento CX-2 AquaLAB.

4.3 Isolamento e identificação da microbiota de amostras de grãos de trigo

Os isolamentos foram realizados dentro do período de uma semana a partir da coleta dos grãos pela técnica de semeadura direta (BERJAK, 1984). Os grãos foram desinfectados em solução de hipoclorito de sódio (1%) por 1 minuto e enxaguados com água destilada. Tal procedimento foi utilizado para eliminação dos contaminantes externos. Por amostra, 100 grãos foram selecionados ao acaso e semeados diretamente em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), meio este, indicado pelo *The Fusarium Laboratory Manual* para o isolamento de *Fusarium* em trigo (LESLIE; SUMMEREL, 2006). Foram utilizadas, para cada uma das amostras, 10 placas contendo 10 grãos cada, totalizando 500 placas por região produtora (Figura 1). Todas as placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias. Para a manutenção, as cepas foram liofilizadas e também mantidas em meio BDA. As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas e submetidas à identificação através da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950).

Figura 1 - Isolamento fúngico de grãos de trigo.

4.4 Identificação dos fungos não esporulados (FNE)

4.4.1 Extração do DNA genômico

Para a obtenção da biomassa fúngica, as cepas selecionadas foram semeadas em meio de cultura YES – Extrato de levedura, Sacarose e Ágar (*Oxoid*) e incubadas em placa de Petri por três dias a 25 °C. Após esse período, o micélio foi macerado e o DNA extraído conforme o manual de instruções do *kit EasyDNA* (*Invitrogen*).

4.4.2 Identificação dos gêneros FNE pelo sequenciamento parcial da região espaçadora interna transcrita (ITS)

A identificação foi realizada através do sequenciamento utilizando os iniciadores ITS1 – TCCGTAGGTGAACCTGCG e ITS 4 – TCCTCCGCTTATTGATAT (WHITE et al., 1990). Os fragmentos foram amplificados em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmp R9700*. O volume

total da reação foi de 25 µl, utilizando-se *buffer* 1 x, 2,5 mM de MgCl₂, dNTP a 0,2 mM, iniciadores a 0,3 mM, Taq DNA polimerase a 0,04 U/µl e 3 µl do DNA concentrado (90ng/µL). Os parâmetros da amplificação foram: 94 °C (3 minutos) para a desnaturação inicial, 25 ciclos a 94 °C (1 minuto), 56 °C (1 minuto), 72°C (1 minuto) e um ciclo adicional de 72 °C (7 minutos) para extensão final. Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1,2%) com TBE 0,5x e corados com *safe DNA* (Invitrogen). O marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb DNA *ladder* (Invitrogen).

4.4.3 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmp R9700*, utilizando 0,8 µL do BigDyeTerminator v3.3. (Applied Biosystems), 3 µL do tampão para BigDye, 1 µL do iniciador (4 µM), 10 µL de água MilliQ esterilizada e 1 µL de DNA (10 a 20 ng). As condições da reação foram: 95 °C (2 minutos), 25 ciclos de 96 °C (20 segundos), 55 °C (20 segundos) e 60 °C (4 minutos). Após a reação, as amostras foram purificadas utilizando 60 µL de isopropanol 100% e 30 µL de água MilliQ, em seguida, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 14000 rpm (25 minutos), o sobrenadante foi descartado e 150 µL de isopropanol 75% adicionados. O material foi centrifugado novamente a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o tubo seco em *Speed Vacuum*. As amostras foram ressuspendidas em formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems), desnaturadas a 95°C (2 minutos) e incubadas em gelo (1 minuto). Em seguida foram aplicadas as colunas capilares contendo o polímero POP6 no sequenciador automático *Abi Prism R Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As sequências foram editadas utilizando o software BioEdit v7.0.9.0 e posteriormente alinhadas com o Blast dos bancos de dados, GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.5 Identificação dos isolados de *Microdochium* spp

Para a identificação foram utilizados os iniciadores específicos para as espécies *Microdochium nivale*: Y13NF- ACCAGCCGATTTGTGGTTATG; Y13NR- GGTCACGAGGCAGAGTTTCG (310 pb) e *M. majus*: Mnm2F- TGCAACGTGCCAGAAGCT ; Mnm2R- AATCGGCGCTGTCTACTAAAAGC (750 pb) (NICHOLSON et al., 1996). Os parâmetros de amplificação foram: 94 °C (5 minutos), ciclo de 35 vezes de 94 °C (30 segundos), 60 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto) e ciclo final de 72 °C (7 minutos). O volume total da reação foi de 25 µL, utilizando-se *buffer* 1 x, 2,5 mM de MgCl₂, dNTP a 0,31 mM, iniciadores a 0,63 mM , Taq DNA polimerase a 0,04 U/µL e 2,5 µL do DNA concentrado (90 ng/µL).

4.6 Identificação dos isolados de *Fusarium* spp

Para a identificação foram utilizados os iniciadores EF-1α F - ATGGGTAAGGARGACAAGAC e EF-1α R – GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'DONNELL et al., 1997). Os parâmetros de amplificação foram: 94 °C (5 minutos), ciclo de 35 vezes de 94 °C (30 segundos), 56 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto) e ciclo final de 72 °C (7 minutos). A etapa de extração, purificação e reação de sequenciamento foram idênticas às descritas nos itens 4.4.

4.7 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B dos isolados do Complexo de espécie de *F. graminearum*

4.7.1 Reação de PCR

Após a extração do DNA genômico como descrito no item 4.4.1, foram realizados as análises dos genótipos de tricotecenos. Os parâmetros de amplificação foram: 95 °C (1 minuto), ciclo de 25 vezes de 95 °C (30 segundos), 52 °C (30 segundos), 72 °C (30 segundos) e ciclo final de 72 °C (7 minutos). O volume total da reação foi de 25 µL, utilizando-se *buffer* 1 x, 2,5 mM de MgCl₂, dNTP a 0,31

mM, iniciadores a 0,56 mM , Taq DNA polimerase a 0,04 U/ μ L e 2,5 μ L do DNA concentrado (90 ng/ μ L). A quadro 2 mostra os iniciadores utilizados.

Quadro 2 - Iniciadores utilizados para identificação dos genótipos de tricotecenos.

Reação	Iniciador	Sequência 5'--3'	Genótipo	Fragmento (pb)	Referência
Multiplex TRI12	12con	CATGAGCATGGTGATGTC	NIV	840	Ward et al., 2002
	12nf	TCTCCTCGTTGTATCTGG			
	12-15f	TACAGCGGTCGCAACTTC	15-ADON	670	
	12-3f	CTTTGGCAAGCCCGTGCA	3-ADON	410	
TRI13-DON	tri13-f	CATCATGAGACTTGTGTCAG AGTTTGGG	DON	282	Chandler et al., 2003
	tri13don-r	GCTAGATCGATTGTTGCATT GAG			
TRI13-NIV	triniv-f tri13-r	CCAAATCCGAAAACCGCAG TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	NIV	312	Chandler et al., 2003

4.8 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B de grãos de trigo

4.8.1 Amostragem de grãos de trigo

Das 150 amostras de grãos de trigo utilizadas no isolamento fúngico e análise de tricotecenos, foram escolhidas aleatoriamente 75 amostras (25 por região) para análise dos genótipos.

4.8.2 Extração de DNA genômico

Para a análise de cada amostra foi utilizado 100 g de trigo moído. Depois de homogeneizado, uma alíquota de 0,5 mg de cada amostra foi separada para extração de DNA. Para maior maceração e quebra de parede, os grãos já moídos foram colocados em microtubo de 2 mL juntamente com uma pérola de 3 mm de aço e agitadas a 50 rpm por 3 minutos no equipamento TissueLyser LT (Qiagen) .

Após esse período, o DNA foi extraído conforme o manual de instruções do *kit EasyDNA (Invitrogen)*.

4.8.3 Reação de amplificação por PCR quantitativa (qPCR)

As condições para a termociclagem foram: 50 °C (2 minutos), 95 °C (2 minutos), 40 ciclos a 95 °C (15 segundos), e 60 °C por (30 segundos). O reagente *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix - UDG* (Invitrogen) foi utilizado na reação, adicionando 250nM de cada iniciador, 6,25 µL do reagente *Sybr*, 0.1 µg/µL de BSA e 0.25 µL de ROX e 2,5 µL da fita de cDNA (40 ng/µL) totalizando um volume de 13 µL. Os iniciadores foram analisados em duplicata no equipamento *Step One Plus Real – Time PCR Systems (Applied Biosystems)*. Para a exclusão de possíveis contaminações, em todas as reações, foi utilizado um controle negativo apropriado.

4.8.4 Validação da técnica

A metodologia utilizada foi desenvolvida por Nielsen et al. (2012). Para validação da técnica foi realizado as curvas de eficiência dos iniciadores utilizados (Quadro 3). O cálculo da eficiência foi realizado pelo fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. O slope é o resultado da relação linear entre as concentrações em $\log_{10}$ de DNA e o número de ciclos do ensaio (Ct). Depois, foram realizadas curvas padrão com cinco pontos de diluição. As concentrações variaram entre 150 a 10 ng/µL. O DNA utilizado para a curva padrão foi previamente quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 UV-VIS (Thermo Fisher, USA). Os genótipos (3-ADON, 15-ADON e NIV) das cepas utilizadas para validação foram determinados previamente como descritos no item 4.7

Para o cálculo da concentração de DNA alvo encontrado nos grãos de trigo foram utilizadas as curvas padrão como referência. Com intuito de evitar erros de quantificação devido à degradação do DNA no trigo, todas as quantificações do DNA fúngico foram normalizadas utilizando o gene Fator de alongação- 1α de planta (Hor1/Hor2) (Quadro 3). As análises estatísticas foram realizadas no software InStat (GraphPad, 2009, v. 3.10) pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Quadro 3 - Iniciadores utilizados para detecção dos genótipos de tricotecenos em grãos de trigo

Iniciador	Sequência 5`-3`	Alvo	Tm (°C)	Referência
3ADONf	AACATGATCGGTGAGGTATCGA	3ADON	80	Nielsen, et al., 2012
3ADONr	CCATGGCGCTGGGAGTT			
15ADONf	GTTTCGATATTCATTGGAAAGCTAC	15ADON	70	
15ADONr	CAAATAAGTATCGTCTGAAATTGGAAA			
NIVf	GCCCATATTCGCGACAATGT	NIV	78.7	Nicolaisen, et al., 2009
NIVr	GGCGAACTGATGAGTAACAAAACC			
Hor1f	TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC	HOR	78.5	
Hor2r	GGCCCTTGTACCAGTCAAGGT			

Tm – temperatura de melting.

4.9 Expressão gênica de tricotecenos por PCR quantitativa (qPCR)

4.9.1 Cultivo e isolamento de RNA

Foram cultivadas 42 cepas do CEFG - 19 *F. graminearum*, 17 cepas de *F. meridionale*, 3 *F. cortaderiae* e 3 de *F. austroamericanum* – em meio de ágar YES (extrato de levedura, sacarose e). O RNA total foi isolado utilizando o *Kit RNeasy* (Qiagen), de acordo com o manual de instruções, em seguida, o cDNA foi sintetizado utilizando o *Kit Sensiscript RT* (Qiagen). Cada 20 µL de reação possuem 10 µL do produto de extração de RNA total, 2 µL de *Random primers* (3 µg/µL - *Invitrogen*), 2 µL de 10X RT-PCR *buffer*, 2 µL de dNTP *mix*, 1 µL de inibidor de RNase (40 U/µL - *Invitrogen*), 1 µL de *Sensiscript Reverse Transcriptase*. A síntese do cDNA foi realizada no *Step One Plus Real – Time PCR Systems (Applied Biosystems)* por 2 h a 37 °C. As amostras foram mantidas a – 20 °C.

4.9.2 Reação de amplificação dos genes *TRI* envolvidos na via biossintética de tricotecenos

Foram escolhidos 5 genes, com função conhecida, responsáveis pela produção de tricotecenos em *F. graminearum*: *TRI4*, *TRI5*, *TRI6*, *TRI12* e *TRI101*. Os iniciadores foram obtidos a partir do programa *Primer 3* (Quadro 4). As condições para a termociclagem foram: 50 °C (2 minutos), 95 °C (2 minutos), 40 ciclos a 95 °C (15 segundos), e 60 °C por (30 segundos). O reagente *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix - UDG* (Invitrogen) foi utilizado na reação, adicionando 250nM de cada iniciador e 2,5 µL da fita de cDNA (concentração de 20 ng/mL), 6,25 µL do reagente *Sybr* e 0,25 µL de ROX, totalizando um volume de 12,5 µL. Os iniciadores foram analisados em duplicata no equipamento *Step One Plus Real – Time PCR Systems* (*Applied Biosystems*). Para a exclusão de possíveis contaminações, em todas as reações, foi utilizado um controle negativo apropriado. A expressão relativa de cDNA foi normalizada utilizando o gene de referência Fator de elongação 1 α (EF-1 α) de fungo.

Quadro 4 - Iniciadores utilizados para análise da expressão gênica de tricotecenos

Iniciador	Sequência (5´-3´)
TRI4 – F	CCTTGGGGTAGCCAACAATA
TRI4 – R	GGCCTTTGCTGAGATGTACC
TRI5- F	GGAGCGTATCGAGAATTTGC
TRI5- R	TGCCCAACTGTATACGACCA
TRI6-F	CGGTGGATTCAACCAAGACT
TRI6-R	AGTCCCGACGATGTGGTTAT
TRI12-F	ATAAAGCTGATGCGGGACAT
TRI12-R	CATGGCACTGGGAGTCATT
TRI101-F	CGCATCAACAAAGTTCTGT
TRI101-R	GCAGAGCCATCGATTCTTTC

4.9.3 Análise da expressão gênica

A quantificação relativa baseada nos valores de $\Delta\Delta C_t$ foi a metodologia analítica de escolha para esse estudo. Neste método, fez-se uma comparação entre

o gene alvo e o gene de referência (EF-1 α). A quantificação foi realizada pela subtração do Ct alvo (ciclo em que a amostra ultrapassa o *threshold*) e o Ct do gene de referência, obtendo-se o Δ Ct. Em seguida, obteve-se o $\Delta\Delta$ Ct, pela subtração do Δ Ct da amostra calibradora em relação à outra amostra. Para a validação do método, foram feitas diluições seriadas em triplicata do gene alvo e do gene de referência (EF-1 α). A partir da curva gerada pelo *software*, foi calculada a eficiência do ensaio através da fórmula: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ para cada gene. Em seguida, foi verificada a compatibilidade das eficiências geradas para os ensaios do gene alvo e do gene de referência. Após a realização das curvas de diluição, a média do Ct para as triplicatas de cada ponto da curva foi calculada, e posteriormente, o Δ Ct foi calculado utilizando as médias de cada ponto e o log dos valores de diluição. Esses dados foram plotados em um gráfico para a verificação do slope da reta gerada (PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson utilizando o software Expression Suite v. 1.0.3 (Applied Technologies, USA).

4.10 Detecção e quantificação de desoxinivalenol e zearalenona nos grãos de trigo

4.10.1 Solventes e reagentes utilizados

Os padrões de micotoxinas (ZEA e DON) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). O solvente acetonitrila (grau HPLC) foi adquirido na J.T Baker (Phillisburg, NJ, USA) e a água utilizada foi purificada a partir do sistema Direct-Q-System® UV3 (Millipore, Bedford, USA).

4.10.2 Extração das micotoxinas

As extrações foram realizadas de acordo com Heidtmann-Bemvenuti et al. (2012). Foram pesados 10 g de amostra em um erlenmeyer (8 g em peneira Mesh 32 e 2 g em peneira Mesh 60) de 250 mL e adicionados 20 mL de água destilada e 20 mL de acetonitrila acidificada com 0,2 mL de ácido acético glacial. A mistura foi

levada ao agitador horizontal (5 min/800 g) e após foram adicionados os sais (1,5 g de sulfato de magnésio e 0,85 g de acetato de sódio) e agitada por 5 minutos. O extrato foi centrifugado (10 min/1400 g) e foram adicionados sais (0,3 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de celite) em 6 mL do sobrenadante, o qual foi agitado manualmente por 1 minuto. Foram coletados 3 mL do sobrenadante, que foi seco sob fluxo de nitrogênio. Para a quantificação, o resíduo seco foi ressuspense em 1 mL da fase móvel e centrifugado a 1200 g (Eppendorf Centrifuge 5410, Hamburg, Germany).

4.10.3 Instrumentação e condições cromatográficas de análise

A técnica foi desenvolvida por Seus (2014) pelo Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) Shimadzu (Quioto, Japão) constituído por um sistema de bombas (modelo LC-AT), desgaseificador da fase móvel (modelo DGU), controlador (modelo CBM-20A), injetor manual com alça de amostragem de 20 µL (modelo 7725i) e com dois sistemas de detecção espectrofotométrico, UV (modelo SPD-20A) e por fluorescência (modelo FL-10AXL). O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo *software* LC Solution. As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna cromatográfica C-18 Phenomenex (250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm), mantida em forno a 40°C. A fase móvel utilizada foi constituída por água: acetonitrila (30:70, v/v), com eluição no modo isocrático e vazão de 0,5 mL min⁻¹. O comprimento de onda para detecção de DON em UV foi de 220nm e para detecção de fluorescência de ZEA foi escolhido excitação e emissão a 350 e 450 nm, respectivamente. Uma curva analítica foi construída entre as concentrações de 1 a 10 µg/mL para DON e 0,2 a 2 µg/mL para ZEA. A recuperação do método foi realizada em triplicata utilizando amostras contaminadas com diferentes concentrações de toxinas (3x, 5x e 7x os valores do Limite de Detecção) e posteriormente extraídas como descrito no item 4.10.1. As recuperações médias foram de 89% e 78% para DON e ZEA, respectivamente. Os resultados nas análises de micotoxinas foram confirmados através de co-cromatografia utilizando as mesmas condições cromatográficas.

4.11 Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas no software Prism 6 (GraphPad, 2014, v. 6.05). O método de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para os resultados de contaminação fúngica e atividade de água. O teste Kruskal-Wallis foi escolhido para avaliar as diferenças nos níveis de concentração entre DON e ZEA nas regiões estudadas. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento fúngico de grãos de trigo

Na técnica de isolamento, foi constatado contaminação fúngica em 100 % das 150 amostras de trigo provenientes das três regiões analisadas (Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo). A identificação dos fungos foi realizada, ao nível de gênero, utilizando morfológica clássica, porém, os fungos não esporulados (FNE) foram classificados pelo sequenciamento parcial da região ITS. A figura 2 mostra o perfil dos fungos isolados em cada região estudada. É possível observar que as amostras oriundas do RS e PR apresentam semelhança maior de perfil fúngico que a amostra do Estado de SP.

Figura 2 - Perfil de isolamento fúngico nos grãos de trigo provenientes dos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo

Nota: A – Paraná; B- Rio Grande do Sul; C- São Paulo.

Nossos resultados mostraram que no Rio Grande do Sul (RS), os gêneros mais frequentes foram *Alternaria* (49,7%), *Fusarium* (42,8%), *Epicoccum* (8.2%) e *Cladosporium* (1.1%) (Gráfico 1). Os valores de Aa dos grãos variaram entre 0.454 e 0.493, e a Aa média foi de 0,473.

Gráfico 1 - Frequência de fungos isolados de grãos de trigo, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo.

No Paraná (PR) as maiores contaminações encontradas foram por *Fusarium* (39%), *Epicoccum* (36,4%), *Drechslera* (10%), *Cladosporium* (8.4%) e *Alternaria* (6.5%). Também foi observada a presença dos gêneros *Nigrospora* e *Microdochium*, com frequência abaixo de 1% (Gráfico 1). Os valores de Aa variaram entre 0.638 e 0.731, e a Aa média foi de 0,682.

Já no Estado de São Paulo (SP) foram isolados *Alternaria* (27,5%), *Microdochium* (23,8%), *Epicoccum* (19,7%), *Nigrospora* (17.2%), *Fusarium* (7.1%), *Drechslera* (2,4%). Os gêneros *Aspergillus*, *Chaetominum*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Phoma* e *Trichoderma* foram detectados em menos de 1% dos grãos (Gráfico 1). Seus valores de Aa variaram entre 0.566 e 0.587, e a Aa média foi de 0,581.

Nossos resultados revelaram alta diversidade de fungos nas amostras analisadas, entretanto os gêneros *Fusarium*, *Alternaria* e *Epicoccum* se destacaram em todas as três localidades. Não foi encontrada correlação entre a atividade de água dos grãos com a frequência de fungos ou micotoxinas. Contudo, os valores

encontrados estavam dentro dos parâmetros estabelecidos para evitar desenvolvimento fúngico durante o armazenamento e comercialização do trigo (RAHMAN, 2007).

Furlong et al. (1995a) analisando amostras recém-colhidas de trigo em SP encontraram perfil semelhante de fungos, com predominância dos gêneros *Alternaria*, *Epicoccum* e *Drechslera*. Tais resultados sinalizam uma população fúngica bem estabelecida na cultura de trigo. A micobiota isolada no presente trabalho também foi consistente com outros estudos sobre população fúngica em grãos de trigo no Brasil (BARBOSA, 2013), Argentina (BASÍLICO et al., 2010; ROIGE et al., 2009) e Tunísia (BENSASSI; MAHDI; HAJLAOUI, 2011)

Um dos gêneros predominantes, *Alternaria*, é um conhecido fungo de campo, com espécies produtoras de diversas fitotoxinas e responsáveis por perdas em plantações. Atualmente vem recebendo devida atenção pelo seu potencial toxigênico. Sabe-se que espécies como *A. alternata* e *A. brassica*, são capazes de produzir ácido tenuazônico (TA), alternariol (AOH) e alternariol monometil éter (AME) (BOTALLICO; LOGRIECO, 1998). Pesquisadores alemães trabalhando com isolados de *Alternaria* de grãos de trigo observaram que 99% das linhagens produziram ao menos uma das três toxinas: TA, AOH e AME (PATRIARCA, AZCARATE, PINTO, 2007). Barbosa (2013) analisando AOH em grãos de trigo beneficiados provenientes de São Paulo não encontrou níveis detectáveis nas amostras. Contudo, na presente investigação, a elevada frequência de isolados do gênero *Alternaria* indicam a necessidade de investigar mais profundamente as três principais toxinas produzidas por esse grupo nos grãos nacionais.

Outra contaminação significativa nas amostras foi de isolados do gênero *Fusarium* nos Estados do PR (39%) e do RS (42,3%). Em SP esta contaminação foi relativamente baixa (7.1%). A alta frequência de *Fusarium* nas amostras do PR e RS pode ser atribuída aos elevados índices pluviométricos registrados nas citadas regiões durante o período de cultivo do trigo (CONAB, 2012). A predominância de *Fusarium* spp. em substratos com maior umidade foi constatada por diversos autores (LESLIE; SUMMERELL, 2006; NELSON et al., 1994). Já a baixa frequência encontrada nas amostras de SP pode estar relacionada com a elevada contaminação de isolados do gênero *Microdochium*. Essa elevada contaminação pode ser atribuída a um processo de antagonismo passivo envolvendo competição por espaço ou nutrientes no substrato (DEACON, 1980).

5.2 Gênero *Microdochium*

Diante da elevada frequência, foram investigados ao nível de espécie, os isolados do gênero *Microdochium*. Inicialmente, foram empregados o sequenciamento parcial dos genes ITS1, ITS4, ITS5 e EF-1 para identificação, porém não houve sucesso. Desta forma, foi realizado PCR com iniciadores específicos desenvolvidos para as espécies *M. nivale* e *M. majus*, comumente encontradas em grãos trigos plantados em áreas frias como Europa e América do Norte (IOOS; BALHADJ; MENEZ, 2004, KOHL et al., 2007).

Todos os isolados estudados foram identificados como *M. nivale* (Figura 3). Ambas as espécies *M. nivale* e *M. majus*, em regiões com precipitação de neve, podem causar a doença “pinkmold” que acarreta sério prejuízo em plantações de trigo de inverno, como também em gramados. O fungo cresce e se desenvolve como um tapete rosado sobre as plantações em virtude de sua colônia de morfologia rosada e algodonosa (Figura 4). Em regiões de clima temperado os mesmos fungos são capazes de causar giberela assim como as espécies de *Fusarium* (TROSMO et al., 2001). Contudo, diferentemente de *Fusarium* esses fungos não são capazes de produzir micotoxinas.

Figura 3 - Identificação dos isolados de *Microdochium nivale* com iniciadores espécie-específicos para *M. nivale* e *M. majus*.

Nota: M.n – *M. nivale*; M.j – *M. majus*; B – Controle negativo; M- marcador

Figura 4 - Morfologia da colônia de *Microdochium nivale*.

Nota: Colônia cultivada em meio BDA por 5 dias a 25°C.

É importante destacar que este é o primeiro trabalho demonstrando a alta frequência da espécie *M. nivale* no trigo nacional. Em 1983, Diehl et al. isolaram *M. nivale* (anteriormente denominado *Fusarium nivale* var. *nivale*) em grãos de trigo coletados no RS porém citaram como sendo um patógeno de baixa relevância (DIEHL et al., 1983).

5.3 Identificação dos isolados do gênero *Fusarium*

Devido sua habilidade de causar sérias doenças em cereais e produzir diversas micotoxinas, os membros do gênero *Fusarium* foram identificados ao nível de espécie. Atualmente, 16 espécies estão incluídas no CEFG (AOKI et al., 2012) e destas, quatro foram isoladas e identificadas no trabalho: *F. graminearum*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*. Esses resultados corroboram com O'Donnel et al. (2004) que relatou essas espécies como endêmicas da América do Sul, com exceção de *F. graminearum* s.s. que pode ser encontrado em diversas regiões do mundo.

Na figura 5 (A-D) é possível observar a morfologia das colônias das espécies identificadas. Inicialmente todos os isolados apresentaram micélio algodonofo raso de coloração bordo/rosada e verso coloração vinho. Porém ao longo do crescimento foram observadas variações na intensidade das cores, presença de micélio aéreo

algodonoso de cor branca e desenvolvimento de micélio de cor amarelada. Essas variações não foram específicas por espécie, impossibilitando sua identificação por características morfológicas.

Para analisar as características dos macroconídeos de cada espécie, os isolados foram cultivados em meio SNA em luz branca para induzir a produção de esporos assexuais. Na figura 5 (E-H) através de microscopia óptica é possível observar diferenças sutis entre os esporos, como tamanho da estrutura e curvatura.

Os isolados de *F. graminearum* apresentaram macroconídeos mais curvados que as outras espécies (Fig. 5F). Entretanto também é possível observar estruturas curvadas tanto em *F. meridionale* e *F. cortaderiae* (Fig. 5E, G). A espécie *F. austroamericanum* apresentou esporos tipicamente retos (Fig. 5H). Essas características corroboram com a descrição de AOKI et al., (2012) das espécies analisadas. O comprimento dos esporos variou bastante, em geral *F. austroamericanum* e *F. meridionale* apresentaram estruturas maiores como também conídeos mais septados.

Figura 5 - Morfologia dos membros do Complexo de espécie *Fusarium graminearum*.

Nota: *F. meridionale* (A, E), *F. graminearum* s.s (B, F), *F. austroamericanum* (C, G) e *F. cortaderiae* (D, H) cultivados em meio BDA e SNA, respectivamente incubados a 25°C por cinco dias. Estruturas de E-H estão com aumento de 600X.

A distribuição das espécies isoladas variou entre as regiões. Porém, de maneira geral as espécies *F. meridionale* e *F. graminearum* s.s foram predominantes nas três regiões estudadas. Os isolados *F. meridionale* foram mais

frequentes em SP (56%) e RS (47%) enquanto *F. graminearum* s.s foi o membro do CEFG mais predominante no PR (54%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência dos membros do Complexo de espécie *Fusarium graminearum* isolados de grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Região	PR	RS	SP
Espécies do CEFG (%)			
<i>F. graminearum</i> s.s	54	25	34
<i>F. meridionale</i>	36	47	56
<i>F. cortaderiae</i>	8	25	6
<i>F. austroamericanum</i>	2	3	4

Esse é o primeiro estudo demonstrando alta frequência de *F. meridionale* no trigo brasileiro. Estudos anteriores relataram frequência muito maior de *F. graminearum* s.s (ASTOLFI et al., 2012; DEL PONTE et al., 2015; SCOZ et al., 2009). Esses resultados divergentes podem ser explicados em parte pela diferença na seleção de grãos. Os estudos citados utilizaram espigas danificadas e com sintomas de giberela enquanto o presente estudo trabalhou com grãos aparentemente saudáveis. O uso exclusivo de espigas gibereladas pode levar a uma seleção de espécies mais agressivas e adaptadas. Diferenças em produção de esporos, velocidade de crescimento e agressividade entre membros do CEFG já foram relatadas (SPOLTI et al., 2012; TÓTH et al., 2008).

5.4 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B dos isolados do Complexo de espécie de *F. graminearum*

Embora os isolados do CEFG exibam alta semelhança morfológica, seus membros podem produzir variados tipos de micotoxinas. Sabe-se que *F. graminearum* s.s é capaz de produzir DON, seus derivados acetilados (3-ADON e 15-ADON), como também NIV. A espécie *F. meridionale*, limita-se a produção de

NIV. Já *F. austroamericanum* e *F. cortaderiae* são capazes de produzir tanto NIV quanto o derivado 3-ADON (AOKI et al., 2012).

Um total de 100 isolados foi analisado pela técnica de PCR para a identificação de seus perfis de produção de tricotecenos (genótipo). No gráfico 2 é possível observar a frequência do genótipo de cada espécie isolada. As cepas de *F. graminearum* s.s foram predominantemente 15-ADON (95,5%), seguido por NIV (3%) e 3-ADON (1,5%). Já 100% das cepas de *F. meridionale* apresentaram genótipo NIV. Os isolados pertencentes a espécie *F. cortaderiae* foram caracterizados como 3-ADON (14. 3%), mas na sua maioria identificados como NIV (85.7%). Já *F. austroamericanum* obteve 50% dos isolados 3-ADON e o restante genótipo NIV.

Gráfico 2 - Frequência dos genótipos encontrados nas diferentes espécies do Complexo de espécie *F. graminearum*

O perfil de genótipo também diferiu de acordo com os Estados analisados (Gráfico 3). Os isolados provenientes de grãos de trigo colhidos no Estado do Paraná foram identificados principalmente como 15-ADON (59%) seguido por NIV (35.8%) e 3-ADON (5.2%). Já os isolados de São Paulo e Rio Grande do Sul

apresentaram perfis semelhante sendo o genótipo mais frequente NIV (61.2 e 67.8%) seguido por 15-ADON (32.3 e 32.2%). O genótipo 3-ADON foi identificado no Estado de São Paulo (6.5%) em baixa frequência e ausente no Rio Grande do Sul.

Gráfico 3 - Frequência dos genótipos dos isolados provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo.

Na América do Sul encontramos diferentes perfis genotípicos. Pan et al. (2013) realizando um estudo em trigo no Uruguai, demonstraram que a maioria dos isolados são 15-ADON com baixa ocorrência de NIV. Já na Argentina, pesquisadores encontraram em sua grande maioria genótipo NIV, seguido por 15-ADON e 3-ADON (SAMPIETRO et al., 2012).

Nossos resultados mostram predominância do genótipo NIV nos Estados de SP e RS e perfil 15-ADON no PR, contudo a alta frequência de NIV e 15-ADON e baixa expressividade de 3-ADON foi comum a todas as regiões. No Brasil, estudos anteriores relataram perfis com predomínio de 15-ADON, presença mediana de NIV e ausência ou frequências abaixo de 1% de isolados 3-ADON (ASTOFOLI et al., 2012; DEL PONTE et al., 2015; SCOZ et al., 2009). É importante destacar que nossos resultados foram divergentes com estudos anteriores, pois os genótipos encontrados estão diretamente correlacionados com as duas espécies mais isoladas no trabalho: *F. meridionale* e *F. graminearum* s.s. Afinal, a vasta maioria

dos isolados de *F. graminearum* s.s foram determinados como produtores de 15-ADON e indivíduos *F. meridionale* apresentam exclusivamente genótipo NIV.

É essencial avaliar os perfis genotípicos de tricotecenos. Além de indicar potenciais micotoxinas produzidas nos cereais, a técnica permite também investigar possíveis mudanças de perfis. Os isolados fúngicos encontrados na América do Norte tem sofrido uma alteração gradual de perfil toxigênico durante as últimas décadas. A ocorrência de isolados de genótipo 3-ADON tem aumentado significativamente e substituindo os isolados 15-ADON, genótipo anteriormente predominante, em plantações de trigo (SCHMALE et al., 2011; WARD, et al., 2008). Puri e Zhong (2010) relataram que fungos de genótipo 3-ADON são mais agressivos e produzem maiores níveis de DON, o que explicaria a mudança. Em estudo similar, Zhang et al. (2012) também observaram maior acúmulo de tricotecenos, de produção conidial e de resistência a antifúngicos em isolados *F. asiaticum* com perfil 3-ADON que com perfil NIV. Entretanto, Spolti et al. (2012) não encontraram diferenças significativas em agressividade, produção de tricotecenos e poder de infecção no trigo entre os genótipos 3-ADON e 15-ADON. As razões para a contínua alteração de perfis ainda não está bem esclarecida.

5.5 Identificação dos genótipos de tricotecenos tipo B em grãos de trigo

A identificação dos genótipos nos grão de trigo permitiu analisar a frequência de cada genótipo, mas também quantificar essa frequência utilizando a concentração de DNA dos isolados de acordo com seu genótipo. O uso dessa técnica foi inédito no Brasil e possibilitou analisar o perfil genotípico de maneira mais robusta e sensível que a técnica de isolamento das cepas e identificação do genótipo por PCR convencional (ver item 5.4).

Nossos resultados mostraram que 100% dos grãos analisados apresentaram isolados com genótipo 15-ADON. A frequência dos perfis NIV e 3-ADON variaram de acordo com a região (Tabela 2). Em São Paulo, NIV esteve presente em 68% das amostras e 3-ADON somente 12%. No Paraná foram detectados isolados NIV em 72% das amostras e isolados 3-ADON em 36%. No Estado do RS, foram encontradas as maiores frequências, 100% para NIV e 52% para 3-ADON. Diferentemente da PCR convencional, a qPCR permite quantificar de maneira

confiável a concentração de DNA dos isolados, permitindo avaliar a relevância de cada genótipo encontrado.

Tabela 2 - Frequência de genótipo de tricotecenos em grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Estado	Frequência %		
	15-ADON	3-ADON	NIV
SP	100	12	68
RS	100	52	100
PR	100	36	72

Gráfico 4 - Proporção média da concentração de DNA de fungos produtores de tricotecenos em grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Além de estar presente em todos os grãos analisados, a concentração média de DNA pertencente ao genótipo 15-ADON foi muito maior que os outros genótipos. De todo DNA fúngico quantificado, 96% foi atribuído ao genótipo 15-ADON, 3,4% ao NIV e somente 0.06% ao genótipo 3-ADON (Gráfico 4). No gráfico 5 estão destacados as concentrações médias de cada isolado por região estudada. Novamente ficam evidentes que as maiores concentrações de DNA pertencem aos

isolados 15-ADON (graf. 5A). Nivalenol mesmo frequente obteve uma concentração muito menor que 15-ADON, principalmente em SP e PR (graf. 5B). Já o genótipo 3-ADON, com baixa frequência em geral, não apresentou concentrações relevantes de DNA (graf. 5C).

Gráfico 5 - Concentração média de DNA de fungos produtores de tricotecenos em grãos de trigo dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Nota: A: 15-ADON; B: NIV; C: 3-ADON. Barras – desvio padrão. Concentração de pg de DNA de fungo/ ng de DNA de planta.

Todos os produtores de 15-ADON e 3-ADON também produzem DON. No gráfico 6 é possível perceber uma tendência de correlação positiva entre produção de DON nos grãos e a concentração de DNA dos genótipos 15ADON+3-ADON. Para avaliar essa tendência, foi utilizado o rank de Spearman, onde o valor 0 é considerado sem correlação entre as variáveis e os valores de -1 ou 1, 100% de correlação negativa ou positiva, respectivamente.

Gráfico 6 - Concentração de desoxinivalenol e de DNA dos isolados fúngicos (15ADON+3-ADON) em grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Nota: Barras cinzas- log [DON µg/kg]; Barras pretas – log [pg de DNA de fungo/ ng de DNA de planta]; S- São Paulo; R – Rio Grande do Sul; P- Paraná.

Foi encontrado correlação de 0.58 ($p < 0,001$) entre a concentração de DNA dos genótipos (15-ADON + 3-ADON) e a quantidade de DON nos grãos (Gráfico 7), demonstrando a correlação positiva da carga fúngica dos genótipos e a produção de DON presente nos grãos. É importante destacar que a correlação foi testada com a soma de DNA de 15-ADON e 3-ADON como também com a concentração de 15-ADON sozinha, e em ambos a correlação obteve o mesmo rank (r_s - 0.58) indicando que mesmo presente em algumas amostras, os isolados de genótipo 3-ADON não foram relevantes na produção de DON nos grãos de trigo analisados.

Gráfico 7 - Correlação entre produção de desoxinivalenol e concentração de DNA dos isolados (15ADON+3-ADON) em grãos de trigo.

Nilsen et al. (2012) encontraram boa correlação entre genótipo 15-ADON e DON e entre genótipo NIV de *F. graminearum* e produção de nivalenol. Outro estudo encontrou boa correlação ($r= 0.82$) relacionando a biomassa de *F. graminearum* através do gene TRI6 e a produção de DON em grãos artificialmente contaminados (HOREVAJ; MILUS; BLUHM, 2011).

5.6 Comparação entre a detecção dos genótipos dos isolados e a dos genótipos em grãos de trigo

Dois métodos foram utilizados para avaliar o perfil genotípico dos isolados: PCR convencional identificando os genótipos dos fungos isolados (ver item 5.4) e qPCR (ver item 5.4) identificando os genótipos do DNA fúngico dentro do grão de trigo. Em ambos foram encontrados tanto semelhanças quanto incongruências.

Ambas as técnicas demonstraram que 3-ADON não é um genótipo frequente ou relevante no trigo nacional. Sua frequência foi maior por qPCR porém a quantificação de DNA demonstrou que a quantidade de isolados é muito pequena para influenciar a produção de DON.

Já os perfis 15-ADON e NIV apresentaram resultados um pouco contraditórios entre as duas técnicas. A frequência de 15-ADON e NIV por PCR

convencional não está de acordo com o que foi encontrado por qPCR. A técnica de qPCR demonstrou que 15-ADON foi predominante em todas as amostras, que apresenta maior quantidade de DNA que os outros genótipos e esta diretamente correlacionado com a produção de DON. Já nivalenol, mesmo presente em todas as amostras do RS e na maioria de SP e PR, exibiu concentrações muito abaixo dos isolados de 15-ADON.

A PCR convencional não é capaz de quantificar a concentração de cada genótipo, mas era esperado que a frequência de isolamento seguisse um caminho proporcional a concentração encontrada por qPCR. Contudo, os resultados obtidos a partir da PCR convencional exibiram maior frequência de NIV que 15-DON em SP e RS, dados inversos aos obtidos por qPCR nos grãos de trigo.

Para explicar essa discrepância algumas hipóteses foram levantadas. No caso das espécies analisadas (PCR convencional), o genótipo encontrado está fortemente relacionado com a espécie isolada. Isso porque quase todos os isolados *F. graminearum* s.s são 15-ADON e todos os isolados *F. meridionale* são NIV. Além disso, *F. cortaderiae* em sua maioria também são genótipo NIV. Então é possível concluir que a alta proporção de genótipo NIV encontrado por PCR convencional ocorreu principalmente porque houve elevado número de *F. meridionale* isolados do trigo.

Partindo desse princípio, o principal questionamento é: porque foram isolados tantos *F. meridionale* quando a concentração fúngica dentro do grão foi principalmente de *F. graminearum* s.s (genótipo 15-ADON)?

Inicialmente foi cogitado que fora isolado um número insuficiente de isolados (n=150) o que poderia acarretar em um falso resultado. Entretanto a alta frequência de NIV ocorreu nas três regiões (SP, PR e RS) sendo que cada isolamento ocorreu em épocas diferentes. Assim, parece improvável a ocorrência de erro amostral em três momentos diferentes de isolamento. Também a possibilidade de ter sido realizado um isolamento seletivo não parece provável, pois como já foi descrito, os membros do CEFV são extremamente semelhantes e seleção por aspectos morfológicos seria inviável. Foi também cogitado a possibilidade de identificação molecular incorreta, contudo essa hipótese também foi descartada, pois EF-1 α é um gene bem definido para identificação do gênero *Fusarium* e parâmetros para garantir uma identificação confiável foram tomados (sequenciamento da fita

“forward” e “reverse”, confirmação com dois bancos de dados diferentes – National Center for Biotechnology Information (NCBI) e *FusariumID*, entre outros).

Mesmo com níveis de concentração de DNA menores que 15-ADON, o genótipo NIV apresentou elevada frequência nos grãos de trigo (Tabela 2) dessa forma, um elevado isolamento de *F. meridionale* não poderia ser descartado, a questão é porque ele se desenvolveu melhor que isolados 15-ADON, que apresentaram uma carga fúngica muito maior?

Como citado anteriormente (ver item 5.3), o uso de grãos sadios frente a grãos giberelados, pode ter colaborado com a alta frequência de *F. meridionale* isolados. Outro fator que pode ter contribuído é a mudança de substrato (saída da planta para meio de cultura). Estudos já demonstraram que *F. graminearum* s.s apresenta um comportamento mais agressivo dentro da planta que *F. meridionale*, sinalizando ser mais adaptado para a infecção e sintomas de giberela (GOSWAMI; KISTLER, 2005; SPOLTI et al., 2012). Contudo, o isolamento dos grãos em meio de cultura, onde a umidade e temperatura são controladas, pode ter diminuído a vantagem dos isolados de *F. graminearum* s.s, e dado oportunidade para *F. meridionale* emergir e ser selecionado.

Contudo a causa para essa diferença permanece desconhecida, sujeita somente a hipóteses. Futuramente seria interessante avaliar a concentração de carga fúngica dos isolados em grãos giberelados e sadios por qPCR como também investigar a capacidade de germinação e desenvolvimento frente a diferentes meios de cultura, umidade e temperatura das espécies *F. meridionale* e *F. graminearum* s.s..

5.7 Expressão dos genes envolvidos na via biossintética de tricotecenos

5.7.1 Validação do método

Para a validação do método $\Delta\Delta C_t$ foram realizados ensaios de curva padrão para avaliar a eficiência (E) de amplificação dos iniciadores dos genes alvos e de referência. Todos os genes apresentaram eficiência dentro dos parâmetros estabelecidos, entre 90-110% (Apêndice A). Também foi realizada em todos os ensaios, a análise do ponto de “melting”. Essa análise indica a temperatura que o

DNA se encontra 50% dissociado. Dessa forma é possível observar se a amplificação é específica (somente um pico) ou se existe amplificações inespecíficas (mais de um pico) ocasionadas pela formação de “primer-dimer”, entre outros. Os resultados podem ser observados no apêndice B.

5.7.2 Resultados

Diante da recente divisão da espécie *F. graminearum* em um Complexo de espécie filogenético, grande parte dos estudos focam apenas na espécie filogenética *F. graminearum* s.s e raramente abordam outros membros do complexo. Por isso tivemos como objetivo comparar a expressão gênica de quatro espécies – *F. graminearum sensu stricto*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum* – e investigar o comportamento gênico entre as espécies como também pesquisar possíveis correlações gênicas.

Para fins comparativos separamos as análises em grupos biológicos de acordo com a espécie. A metodologia escolhida ($\Delta\Delta C_t$) é estritamente comparativa e requer um grupo calibrador que será base para todas as comparações. Para este estudo foi escolhido o grupo *F. austroamericanum*.

Nossos resultados revelaram que os genes diferiram de acordo com a espécie estudada (grupo biológico) como também de acordo com o comportamento de outros genes. As maiores diferenças de níveis de expressão relativa foram TRI5 e TRI12. O gene TRI5, que codifica a proteína precursora de tricoteceno, foi o gene menos expresso nos isolados da espécie de *F. graminearum* s.s. Já os grupos *F. meridionale* e *F. cortaderiae* obtiveram maior expressão comparado ao grupo calibrador (*F. austroamericanum*). O gene TRI12, com função de bomba de efluxo dos metabólitos, foi o mais expresso nos três grupos, em média 1.4 vezes mais que *F. austroamericanum* (Gráfico 8). Esses resultados indicaram que os genes TRI5 e TRI12 foram afetados principalmente de acordo com a espécie analisada.

Gráfico 8 - Expressão relativa dos genes TRI4, TRI5, TRI6, TRI12 E TRI101 dos grupos biológicos *F. graminearum* s.s, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*.

Nota: Grupo *F. austroamericanum* é o calibrador assim não aparece no gráfico.

Comparativamente aos isolados da espécie *F. austroamericanum*, os genes TRI6, TRI101 e TRI4 foram menos expressos nos outros três grupos, porém as variações encontradas não foram elevadas (Gráfico 8). Já os genes TRI4, TRI6 e TRI101 parecem apresentar comportamento diferente. No gráfico 9 é possível observar que estes genes possuem uma correlação positiva entre si na maioria das cepas estudadas.

Essa correlação está possivelmente relacionada com o comportamento de TRI6. O gene TRI6 codifica um fator de transcrição dedo de zinco e é considerado o maior regulador da via biossintética (PROCTOR et al., 1995). Os genes TRI6 e TRI101 estão em diferentes clusters e cromossomos (KIMURA et al., 1998) porém juntamente com outros genes, TRI101 e TRI4 possuem dentro de sua região promotora uma sequência de ligação do fator de transcrição codificado por TRI6 (YNAGGCC) (HOHN, et al., 1999). Essa sequência permite que o fator de TRI6 atue em diferentes genes e cromossomos, corroborando com nossos resultados.

Gráfico 9 - Expressão relativa dos genes TRI6, TRI101 e TRI4 dos isolados do Complexo de espécie *Fusarium graminearum*.

O estudo de expressão gênica das diferentes espécies demonstrou que parte dos genes (TRI6, TRI4 e TRI101) possui comportamento similar nas quatro espécies analisadas, indicando serem ideais para estudos futuros envolvendo membros do CEFG em diferentes tratamentos.

5.8 Detecção e quantificação de desoxinivalenol em grãos de trigo

As análises por UPLC confirmaram a presença de DON e ZEA nas amostras de trigo estudadas. Contaminação por DON foi predominante e observada em 100% das amostras. Entretanto os níveis de DON diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre as regiões variando entre 126 a 5.393 $\mu\text{g/kg}$. As concentrações medianas foram de 323, 466 e 783 $\mu\text{g/kg}$ em SP, PR e RS, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Determinação de desoxinivalenol em grãos de trigo naturalmente contaminado provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Estado	DON		
	Amostras positivas (%)	Concentração (µg/kg)	
		Variação	Mediana
PR	100	280-1513	466
SP	100	126-606	323
RS	100	140-5393	783

Limite de detecção: 16.7 µg/kg.

Empregando o LMT da ANVISA de 2017 (Quadro 1) de grãos pré-processados, todas as amostras estariam dentro do LMT estipulado (acima de 3000 µg/kg) exceto uma pertencente ao Estado do RS que revelou nível de 5393 µg/kg de DON. A mediana nas amostras do RS foi de 783 µg/kg, porém 11 amostras obtiveram níveis acima de 1000 µg/kg. Já nos outros Estados a maioria das amostras apresentaram níveis inferiores a 750 µg/kg de DON (Tabela 4). Embora apenas uma amostra tenha detectado nível acima do LMT (3000 µg/kg) permitido pela ANVISA, o grau de contaminação (100%) é um forte indicativo de futuros prejuízos que DON pode causar na agricultura brasileira.

Tabela 4 - Concentrações de desoxinivalenol encontradas nos grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Níveis (µg/kg)	nº de amostras
Paraná	DON
>3000	0
>1000	4
>750	1
Rio Grande do Sul	
>3000	1
>1000	11
>750	16
São Paulo	
>3000	0
>1000	0
>750	0

Os primeiros estudos envolvendo DON no trigo nacional realizados por Sabino et al. (1989) e Furlong et al. (1995a, b) relataram baixa incidência da toxina (1- 20%), porém, com médias similares às detectadas no presente trabalho. Estudo realizado por Calori-Dominguez et al. (2007) avaliando a contaminação por DON no trigo nacional e uruguaio revelou a presença da toxina em 94% das amostras nacionais, com média de 332 µg/kg. Em 2012, Del Ponte, Garda-Buffon e Furlong (2012) pesquisando a ocorrência de DON em três safras consecutivas de trigo no Estado do RS, detectaram a toxina em aproximadamente, 99% de espigas de trigo gibereladas, frequência esta, similar a nossa investigação. Estudo analisando a ocorrência de DON no Estado do PR, empregando o ensaio imunoenzimático (ELISA) detectou níveis médios de 1.894 µg/kg e frequência de 64,4% (SANTOS et al., 2013). Barbosa (2013) trabalhando com amostras oriundas de São Paulo, obteve média de 1255 µg/kg de DON em trigo recém-colhido.

Apesar dos poucos estudos realizados no Brasil, constata-se um aumento significativo na frequência de DON ao longo dos anos no trigo brasileiro, coincidindo com os achados em outros países da América do Sul (GONZÁLES et al., 2008; PAN; GRANERI; BETTUCI, 2009). Esses resultados corroboram a ideia que mesmo não sendo o tricoteceno mais tóxico, a elevada frequência faz de DON um das toxinas mais relevantes na atualidade.

5.9 Detecção e quantificação de zearalenona em grãos de trigo

ZEA, uma toxina estrogênica e recentemente incluída na legislação brasileira, (ANVISA, 2011) foi detectada nos três Estados estudados, porém sua incidência variou significativamente ($p < 0,001$) entre as regiões.

A tabela 5 sumariza as concentrações de ZEA encontradas nos grãos. A frequência de amostras positivas para ZEA foram de 100%, 80% e 48% no RS, PR e SP, respectivamente.

Tabela 5 - Determinação de zearalenona em grãos de trigo naturalmente contaminado provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Estado	ZEA		
	Amostras positivas (%)	Concentração ($\mu\text{g/kg}$)	
		Variação	Mediana
PR	80	nd-260	100
SP	48	nd-93	14
RS	100	133-2706	843

Limite de detecção: 1.3 $\mu\text{g/kg}$; nd: abaixo do limite de detecção.

Segundo regulamentações definidas pela ANVISA, a partir de 2017, grãos de trigo pré-processados não podem ultrapassar 400 $\mu\text{g/kg}$ de ZEA (quadro 1). Em SP, apenas uma amostra apresentou contaminação de ZEA acima de 400 $\mu\text{g/kg}$. Já no PR, nenhuma amostra estava acima do LMT, entretanto três amostras estavam acima de 200 $\mu\text{g/kg}$ e 24 acima de 100 $\mu\text{g/kg}$. Os níveis de ZEA detectados no Estado do RS foram os mais elevados, 82% das amostras exibiram níveis superiores a 400 $\mu\text{g/kg}$ (Tabela 6). A concentração mediana encontrada nas amostras provenientes do RS (843 $\mu\text{g/kg}$) foi cerca de oito vezes maior que às outras regiões, o dobro do valor permitido pela ANVISA (400 $\mu\text{g/kg}$).

Tabela 6 - Concentrações de zearalenona encontradas nos grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Níveis ($\mu\text{g/kg}$)	nº de amostras
Paraná	ZEA
>400	0
>200	3
>100	24
Rio Grande do Sul	
>400	41
>200	6
>100	3
São Paulo	
>400	1
>200	0
>100	0

Visando um possível mercado externo e aplicando como referência o LMT da União Europeia (EC, 2006), onde o máximo permitido para grãos pré-processados é de 100 $\mu\text{g/kg}$, todas as amostras do Estado do RS e 54% das amostras do PR estariam acima do LMT estipulado. A concentração mediana de ZEA encontrada nos grãos do RS (843 $\mu\text{g/kg}$) seria aproximadamente oito vezes o LMT pela União Europeia para grãos de trigo (EC, 2006).

A literatura sobre ZEA no trigo nacional é ainda muito escassa. Estudos realizados no Estado de São Paulo, por Furlong et al. (1995a, b) e Barbosa (2013) detectaram ZEA em 15 e 4% das amostras analisadas, respectivamente. Outras pesquisas destacaram a presença de ZEA em arroz e milho (ALMEIDA et al., 2012; POZZI et al., 1995).

É relevante apontar que tanto as concentrações de DON quanto de ZEA foram maiores no RS, seguido por PR e SP. Esse fato não pode ser descartado e parece estar intimamente ligado a micobiota das regiões. O gráfico 10 demonstra a relação de contaminação pelos membros do CEFG e os níveis de DON e ZEA encontrados nos grãos de trigo. O Estado do RS, afetado pela maior quantidade de fungos, indicado pela concentração de DNA do CEFG, também foi o mais abundante na presença de toxinas. Já SP, onde a contaminação pelo gênero

Fusarium foi menor, a contaminação de DON e ZEA nos grãos também foi mais branda.

Gráfico 10 - Comparação entre as médias de produção de desoxinivalenol, zearalenona e as médias da concentração de DNA fúngico dos genótipos de tricotecenos nos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Nota: As concentrações de DNA estão em pg de fungo/ng de planta. As concentrações das toxinas estão em µg/kg. Todos valores foram transformados para log.

Como citado anteriormente (ver item 5.1) os registros de precipitação excessiva nos Estados do RS e PR possivelmente facilitaram o maior desenvolvimento dos isolados do CEFG nessas plantações. Também, a forte presença de *M. nivale* em SP e menor frequência de CEFG, indica uma competição entre os dois fungos, compatível com a baixa produção de toxinas encontrada na região. Esses dados demonstram claramente a relação da frequência da microbiota toxigênica com a contaminação de toxinas nos grãos.

5.10 Co-ocorrência de DON e ZEA

Nos últimos anos tem se estudado efeitos sinérgicos e/ou aditivos entre duas ou mais micotoxinas. A co-ocorrência de DON e ZEA nos grãos foram de 42%, 80% e 100% nos Estados de SP, PR e RS, respectivamente (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Porcentagem de co-ocorrência de DON e ZEA nos grãos de trigo provenientes dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul.

Segundo Kouadio et al. (2007) trabalhando com células epiteliais intestinais humanas Caco-2, a mistura binária ZEA/DON causa efeitos sinérgicos nocivos na viabilidade celular e na síntese de DNA. Aumento de citotoxicidade entre as misturas de NIV/DON e NIV/ZEA também foram relatadas por Tajima et al. (2002) em células de fibroblastos.

Os efeitos da co-ocorrência de micotoxinas é também dependente das doses adotadas. Pesquisas realizadas por Alassane-Kapembi et al. (2013) também utilizando linhagem Caco-2, relataram efeitos sinérgicos em baixas doses da mistura ternária DON/3-ADON/15-ADON, contudo em altas doses, a mesma mistura provocou efeitos aditivos.

Estudos *in vivo* ainda são escassos, porém já foram relatados casos de disfunção no baço (TIEMANN, et al., 2006) como também de degeneração de ovócitos de porcos (ALM et al., 2005) após ingestão de ração contendo altas concentrações de DON e ZEA.

6 CONCLUSÃO

O estudo polifásico da micobiota presente nos grãos de trigo como sua produção de toxinas realizados neste trabalho agregaram novas e importantes informações sobre o trigo no Brasil:

- O estudo da micobiota confirmou o predomínio dos gêneros *Alternaria*, *Fusarium* e *Epicoccum*, perfil que já foi descrito em trabalhos anteriores, indicando uma população bem estabelecida no trigo nacional;
- A elevada frequência da espécie não toxigênica *Microdochium nivale*, embora causadora de giberela, nas amostras do Estado de São Paulo foi inédita no trigo brasileiro;
- O complexo de espécie *Fusarium graminearum* (CEFG) foi dominante no isolamento do gênero *Fusarium*, e quatro membros foram identificados: *F. graminearum* s.s, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum*;
- Os membros do CEFG mais relevantes foram *F. meridionale* e *F. graminearum* s.s nas três regiões estudadas;
- Os genótipos dos isolados foram em sua maioria NIV para as espécies *F. meridionale*, *F. cortaderiae* e *F. austroamericanum* e 15-ADON para *F. graminearum* s.s
- O perfil genotípico em grãos de trigo demonstrou que o genótipo 15-ADON esteve presente em 100% das amostras. Já NIV em 80% e 3-ADON em somente 33,3% das amostras.
- A quantificação de DNA dos isolados de acordo com seu genótipo por qPCR demonstrou que 15-ADON contribuiu em aproximadamente 96% de todo DNA quantificado, seguido por NIV com 3.84% e 3-ADON, com somente 0.06%, indicando que 3-ADON não é um perfil relevante e que 15-ADON, é o principal genótipo nos grãos de trigo nacional.
- Houve discordância entre as frequências de genótipo dos isolados e o genótipo diretamente dos grãos e acredita-se a mudança de substrato pode ter influenciado a seleção de isolamento;
- Foi encontrada correlação positiva entre a concentração de DNA dos isolados 15-ADON com a produção de DON, outro indicativo do papel desses isolados no perfil toxigênico dos grãos;

- Os resultados de expressão gênica indicaram que há genes da via biossintética de tricotecenos que apresentam comportamento de acordo com a espécie filogenética analisada (TRI5 e TRI12) e genes que não são influenciados pela espécie, mas pelo comportamento de outros genes (TRI4, TRI6 e TRI101);
- A toxina desoxinivalenol (DON) foi detectada em todas as amostras analisadas, embora apenas uma do Estado do RS estava com níveis acima do permitido;
- Considerando o LMT de ZEA estipulado pela ANVISA para grãos pré-processados, a vigorar a partir de 2017, 82% das amostras do RS estariam acima do limite permitido de 400ug/kg;
- Os dados de contaminação pelo CEFG através de qPCR e as concentrações de DON e ZEA encontradas demonstram claramente correlação entre níveis de contaminação fúngica e de toxinas;
- A co-ocorrência de DON e ZEA no trigo nacional foi de 100%, 80% e 42% nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo.

REFERÊNCIAS*

ABID-ESSEFI, S. et al. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. **Toxicology**, v. 192, p. 237–248, 2003..

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10269e8043ec6fc2af60ef6b7f09096f/rdc0007_18_02_2011.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 2 mar. 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) 2013. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2014-01/diario-oficial---rdc-59.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2015

ALASSANE-KPEMBI, I. et al. New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 727, p. 191-198, 2013.

ALEXANDER, N. J. et al. Expression of Tri15 in *Fusarium sporotrichioides*. **Curr. Genet.**, v. 45, p. 157-162, 2004.

ALEXANDER, N. J.; MCCORMICK, S. P.; HOHN, T. M. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 261, p. 977-984, 1999.

ALM, H. et al. Influence of *Fusarium*-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. **Reprod. Toxicol.**, v. 22, p. 44-50, 2006.

ALMEIDA, M. et al. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. **Food Addit. Contam. Part A**, v. 29, p. 694–703, 2012.

ALVAREZ, C. L; AZCARATE, M.P; PINTO, V.F. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. **Intr. J. Food Microbiol.**, v. 135, p. 131-135, 2009.

AOKI, T. et al. Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. **Mycotoxins**, v. 62, p. 91-102, 2012.

*De acordo com:

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

AOKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the group 1 population of *F. graminearum*. **Mycologia**, v. 91, p. 597-609, 1999.

ASTOLFI, P. et al. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathol.**, v. 61, p. 289-295, 2012.

AZCONA O. J. et al. Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 133, p. 109-120, 1995.

BAI, G. SHANER, G. Scab of wheat: prospects for control. **Plant Dis.**, v. 78, p. 760-766, 1994.

BAINOTTI, C. et al. Genetic Resistance to *Fusarium* Head Blight in Wheat (*Triticum aestivum* L.). In: MAGLIANO, T. M. A.; CHULZE, S. N. **Fusarium Head Blight in Latin America**, Holanda: Springer, 2013, p. 231-240.

BARBA J.T.; REIS E. M.; FORCELINI, C. A. Efeito da temperatura e de fungicida na transmissão de *Bipolaris sorokiniana* da semente para plântulas de cevada. **Fitopatol. Bras.**, v.27, p. 500-507, 2002.

BARBOSA B.C. **Micoflora e ocorrência de micotoxinas em grãos de trigo recém-colhidos e armazenados**. 2013, 140 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, 2013.

BARNETT, A. M. et al. The interactions between endogenous bacteria, dietary components and the mucus layer of the large bowel. **Food Funct.**, v. 3, p. 690-699, 2012.

BASÍLICO, M. L. Z. et al. Fungal diversity and natural occurrence of fusaproliferin, beauvericin, deoxynivalenol and nivalenol in wheat cultivated in Santa Fe Province, Argentina. **Mycotoxin Res.**, v. 26, 85-91, 2010.

BAYRAM O. et al. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. **Science**, v. 320, p. 1504-1506, 2008.

BELHASSEN, H. et al. Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. **Chemosphere**, v. 128, p. 1-6, 2015.

BENSASSI, F. et al. Survey of the mycobiota of freshly harvested wheat grains in the main production areas of Tunisia. **Afr. J. Food Sci.**, v. 5, p. 292-298, 2011.

BERJAK, P. Report of seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability. 1980-1983. **Seed Sci. Technol.**, v. 12, p. 233-253, 1984.

BONY, S.; CARCELEN, M.; DEVAX, A. Genotoxicity assesment of deoxynivalenol in Caco-2 cell line model using the Comet assay. **Toxicol. Lett.**, v. 166, p. 67-76, 2006.

BOTTALICO, A.; LOGRIECO, A. Toxigenic *Alternaria* species from economic importance. In **Micotoxins in Agriculture and Food Safety**. New York: Ed. Dekker, 1998, p. 65- 107.

BROWN, D. W.; PROCTOR, R. A. **Fusarium**: genomics, molecular and cellular biology. Caister: Academic Press, 2013, 194 p.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY (CFIA) 2012. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/regulatory-guidance/rg-8/eng/1347383943203/1347384015909?chap=1#s1c1>> Acesso em: 2 fev. 2015.

CASA, R. T. et al. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatol. Bras.**, v. 29, p. 289-293, 2004.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Ames, Iowa: Task Force Report, n. 139, 2003, 199 p.

CHAMPEIL, A.; DORÉ, T.; FOURBET, J. F. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. **Plant Sci.**, v. 166, p. 1389-1415, 2004..

CHANDLER, E. A.;SIMPSON, D. R.; NILCHOLSON, T. P. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, v. 62, p. 355-367, 2003.

CHOW, J. et al. Host-bacterial symbiosis in health and disease. **Adv. Immunol.**, v. 107, p. 243–274, 2010.

COLDHAM, N.G. et al. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. **Environ. Health Perspect.**, v. 105, p. 734- 742, 1997.

COLLINS, T.F.X. et al. Effects of deoxynivalenol (DON, vomitoxin) on in utero development in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44.6, p. 747-757, 2006.

COMPANHIA DE ABASTECIMENTO (CONAB). 2015. **Grãos Safras**. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_03_11_14_07_48_boletim_gaos_marco_2015.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) 2012. **Grãos Safra 2012/2013**. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_11_08_09_10_48_boletim_portugues_novembro_2012.pdf Acesso em: 20 mar. 2015.

DÄNICKE, S.; VALENTA, H.; DÖLL, S. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. **Arch. Anim. Nutr.**, v. 58, p. 169–180, 2004.

DEACON, J. W. **Introduction to modern mycology**. London, Blackwell Scientific Publication, 1980, 197 p.

DEL PONTE, E. et al. Regional and field-specific factors affect the composition of *Fusarium* head blight pathogens in subtropical no-till wheat agroecosystem of Brazil. **Phytopathology**, v. 105, p. 246-254, 2015.

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

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins **Int J Food Microbiol.**, v. 119, p. 47-50, 2007.

DESJARDINS, A. E. From yellow rain to green wheat: 25 years of trichothecene biosynthesis research. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 4478–84, 2009.

DESJARDINS, A. E. ***Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics, and Biology**. St. Paul, MN: APS Press, 2006, 260 p.

DIEHL J. A.; KOCHHANN, R. A.; TINLINE, R. D. Sistemas de cultivo sobre podridão comum de raízes e mal-do-pé do trigo. **Pes. Agrop. Bras.**, v. 18, p. 235-341, 1983.

DILL-MACKY, R.; JONES, R. K. The Effect of Previous Crop Residues and Tillage on *Fusarium* Head Blight of Wheat. **Plant Dis.**, v. 84, p. 71-76, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2002. Boletim de pesquisa e desenvolvimento n. 11. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_bp11.htm>. Acesso em: 4 fev. 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2014. **Nota técnica**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2157564/nota-tecnica-doencas-do-trigo---safra-2014>>. Acesso em 12 mar. 2015.

ERIKSEN, G. S. et al. Transformation of trichothecenes in ileal digesta and faeces from pigs. **Arch. Tierernahr.**, v. 56, p. 263–274, 2002.

ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J. E. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. **Arch. Tierernahr.**, v. 57, p. 335–345, 2003.

ETZEL, R. A., et al. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. **Arch. Pediatr. & Adolesc. Med.**, v. 152, p. 757-762, 1998.

EUROPEAN COMMISSION (EC) 2006. **Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20100701:EN:PDF>>. Acesso em: 10 mar. 2015

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. **EFSA Journal**, v. 11, 2013, 56 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2000. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 12 mar. 2015.

FRANCIS R. G.; BURGESS L. W. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'Graminearum' in eastern Australia. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 68, p. 421-427, 1977.

FRANKIC, T.; SALOBIR, J.; REZAR, V. The effect of vitamin E supplementation on reduction of lymphocyte DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in weaned pigs. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.141, p. 274-286, 2008.

FREY, J. C. et al. Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and feces of lactating dairy cows. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, p. 1982–1993, 2010.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycol. Res.**, v. 112, p. 231-240, 2008.

FRIZZELL, C. et al. Biotransformation of zearalenone and zearalenols to their major glucuronide metabolites reduces estrogenic activity. **Toxicol. in Vitro**, v. 29, p. 575-581, 2015.

FURLONG, E. B. et al. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 131, p. 185-190, 1995a.

FURLONG, E. B. et al. Mycotoxins and fungi in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Addit. Contam.**, v. 12, p.683-688, 1995b.

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Relação entre a incidência de *Fusarium graminearum* em sementes, emergência e ocorrência de giberela em plântulas de trigo. **Trop. Plant Pathol.**, v. 33, p. 302-308, 2008.

GARDINER D. M. et al. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. **Microbiology**, v. 155, p. 149–3156, 2009.

GONZÁLEZ, H. H. L. et al. (2008). Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina. **Mycopathologia**, v. 165, p. 105–14, 2008.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, C. H. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. **Phytopathology**, v. 95, p. 1397-1404, 2005.

GOUZE, M. E. et al. Effect of subacute oral doses of nivalenol on immune and metabolic defense systems in mice. **Vet. Res.**, v. 38, p. 635-646, 2007.

GOYARTS, T.; DÄNICKE, S. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. **Toxicol. Lett.** V. 163, p. 171–182, 2006.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E.; MURK, A. J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.11, p. 309-320, 2000.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R. et al. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parborizado e suas frações utilizando quechers e hplc/uv-fl. **Quim. Nova**, v. 35, p. 1244-1249, 2012.

HOHN, T. M.; KRISHNA, R.; PROCTOR, R. H. Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. **Fungal Genet. Biol.**, v. 26, p. 224–235, 1999.

HOREVAJ, P.; MILUS, E. A.; BLUHM, B. H. A real-time qPCR assay to quantify *Fusarium graminearum* biomass in wheat kernels. **J. Appl. Microbiol.**, v. 111, p. 396-406, 2011.

HORVAT, D. et al. The influence of *Fusarium* infection on wheat (*Triticum aestivum* L.) proteins distribution and baking quality. **Cereal Res Com.**, v. 43, p 61-71, 2014.

IOOS, R.; BELHADJ, A.; MENEZ, M. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. **Mycopathologia**, v. 158, p. 351-362, 2004.

ITO, Y. et al. Effects of nivalenol on pregnancy and fetal development of mice. **Mycotoxin Res.**, v. 2.2, p. 71-77, 2006.

JACOBSEN, L. A. **Trigo**. Porto Alegre: Série Realidade Rural, 2003, v. 32, 42 p.

JENNINGS, P. et al. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. **Plant Pathol.**, v. 53, p. 182-190, 2004.

JIAO, F.; KAWAKAMI, A.; NAKAJIMA, T. Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 285, p. 212-219, 2008.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). Geneva: World Health Organization, 2000. **WHO Food Additives** Series n. 44.

KADOTA, T. et al. Comparative study of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol on intestinal transport and IL-8 secretion in the human cell line Caco-2. **Toxicol. in Vitro**, v. 27, p. 1888-1895, 2013.

KAWAKAMI, A.; NAKAJIMA, T.; HIRAYAE, K. Effects of carbon sources and amines on induction of trichothecene production by *Fusarium asiaticum* in liquid culture. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 352, p. 204-212, 2014.

KELLER, N. P.; HOHN, T. M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 21, p. 17-29, 1997.

KIM, Y. et al. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. **Mol. Microbiol.**, v. 58, p. 1102-1113, 2005.

KLITTICH, C. J. R. et al. *Fusarium thapsinum* (*Gibberella thapsina*): A new species in sectin *Liseola* from sorghum. **Mycologia**, v. 89, p. 643- 652, 1997.

KÖHL, J.; DE HAAS, B. H.; KASTELEIN, K.; BURGERS, S. L. G. E.; WAALWIJK, C. Population dynamics of *Fusarium* spp. and *Microdochium nivale* in crops and crop residues of winter wheat. **Phytopathology**, v. 97, p. 971-978, 2007.

KONIGS, M. et al. Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. **Toxicology**, v. 258, p. 106-115, 2009.

KOUADIO, J. H., et al.. Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. **Toxicon**, v. 49, p. 306-317, 2007.

KUIPER, G. J. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, p. 4252–4263, 1998.

LACEY, J.; BATEMAN, G. L.; MIROCHA, C. J. Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. **Ann. Appl. Biol.**, v. 134, p. 277–283, 1999.

LEE, T, et al. Identification of deoxynivalenol-and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2966-2972, 2001.

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

LIOI, M. B. et al. Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 557, p. 19–24, 2004.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Vet. J.**, v. 172, p. 96-102, 2006.

MARESCA, M. From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. **Toxins**, vol. 5, p. 784-820, 2013.

MASSART, F. V. et al. High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins **J. Pediatr.**, v. 152, p. 690–695, 2008.

MCCORMICK, S. P. et al. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. **Toxins**, v. 3, p. 802-814, 2011.

MERHEJ J. et al. Acidic pH as a determinant of TRI gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*. **Food Addit. Contam. Part A**, v. 27, p. 710–717, 2010.

MERHEJ, J. M. et al. The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. **Mol. Plant Pathol.**, v. 13, p. 363-374, 2012.

MERHEJ, J.; FORGET F.; BARREAU C. Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 91, p. 519-528, 2011.

MILES, C. O. et al. Ovine metabolism of zearalenone to α -zearalanol (zeranol). **J. Agricul. Food Chem.**, v. 44, p. 3244-3250, 1996.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2010. **Instrução normativa MAPA 38/2010**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/sanidade-vegetal/legislacao>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

MYUNG K. et al. FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 5089–5094, 2009.

NAGASHIMA, H. et al. Comparison of antiproliferative effects of trichothecene mycotoxins, nivalenol and deoxynivalenol, in cultured cells. **Rep. Natl. Food Res. Inst.**, v. 76, p. 29-32, 2012.

NAGASHIMA, H. et al. Cytotoxic effects of nivalenol on HL60 cells. **Mycotoxins**, v. 56, p. 65-70, 2006.

NELSON, P. E. History of *Fusarium* Systematics. **Am. Phytopathol. Soc.**, v.81, p. 1045-1048, 1991.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAÏSSIE, E. J. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.7, p.479-504, 1994.

NICHOLSON, P. et al. Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *majus* in wheat. **Physiol. Mol. Plant. Pathol.**, v. 48, p.257-271, 1996.

NICO, B.; RIBATTI, D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. **Curr. Drug Metab.**, v. 13, p. 50–60, 2012.

NICOLAISEN, M., Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. **J. Microbiol. Methods**, v. 76, p. 234-240, 2009.

NIELSEN, L. K. et al. TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 157, p. 384-392, 2012.

O'DONNELL, K. et al. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetic distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genet. Biol.**, v. 41, p. 600-623, 2004.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.7, p. 103–116, 1997.

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

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de danos causados pela Giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatol. Bras.**, v. 28, p. 189-192, 2003.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; MCLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. **Plant. Pathol.**, v. 44, p. 207–238, 1995.

PARVEEN, M.; ZHU, Y.; KIYAMA, R. Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 2377–2384, 2009.

PATRIARCA, A. et al. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. **Int. J. Food Microbiol.**, v.119, p. 219-222, 2007.

PEPLOW, A. W. et al. Identification of new genes positively regulated by Tri10 and a regulatory network for trichothecene mycotoxin production. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2731-2736, 2003.

PERAICA, M.; RADIC, B.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bull. World Health Organ.**, v. 77, p. 754-766, 1999.

PESTKA, J. J. et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicol Lett.**, v. 153, p. 61-73, 2004.

PESTKA, J. J.; ISLAM, Z.; AMUZIE, C. J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. **Toxicol. Lett.**, v. 178, p. 83–87, 2008.

PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. **J. Toxicol. Health B. Crit. Rev.**, v.8, p. 39-69, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucl. Acids Res.** v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PILLAY, D. et al. The quantitative analysis of zearalenone and its derivatives in plasma of patients with breast and cervical cancer. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 40, p. 946–951, 2002.

PINTO, V. E., et al. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. **Braz. Microbiol.**, v.39, p. 157-162, 2008.

POZZI, C. R. et al. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Addit. Contam. Part A.** v. 12, p. 313-319, 1995.

PRELUSKY, D. B. et al. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. **J. Environ. Sci. Health B.**, v. 19, p. 593–609, 1984.

PRELUSKY, D. B.; HARTIN, K. E.; TRENHOLM, H. L. Distribution of deoxynivalenol in cerebral spinal fluid following administration to swine and sheep. **J. Environ. Sci. Health B.**, v. 25, p. 395–413, 1990.

PROCTOR, R. H. et al. Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1923–1930, 1995.

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

QUARTA, A. et al. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3-and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 259, p. 7-13, 2006.

RAHMAN, S. **Handbook of food preservation**. 2nd ed, Boca Raton: CRC Press, 2007, 1088 p.

REYNOSO, M. M. et al. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 145, p. 444-448, 2012.

RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycol. Soc. Am.**, v. 42, p. 265-270, 1950.

ROIGÉ, M.B. et al. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Rev. Iberoamericana Micol.**, v. 26, p. 233-237, 2009.

RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends Genet.**, v. 11, p. 12–17, 1995.

ROSSI, V. et al. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing *Fusarium* head blight. **J. Plant Pathol.**, v. 83, p. 189-198, 2001.

SABINO, M. et al. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 49, 155-159, 1989.

SAMPIETRO, D. A. et al. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* complex strains isolated from maize fields of northwest Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 153, p. 229–233, 2012.

SANTOS, J. S. et al. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chem.**, v. 138, p. 90-95, 2013.

SCHMALE, D. G. et al. Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. **Plant Pathol.** v. 60, p. 909-917, 2011.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Prot.**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SCOZ, L. B. et al. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. **Plant Pathol.**, v. 58, p. 344–351, 2009.

SEUS, E. R. **Otimização de método para a determinação de tricotecenos em amostras de trigo**. 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2014.

SIUDA, R. et al. Influence of the degree of fusariosis on technological traits of wheat grain. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 45, p. 2596–2604, 2010.

SMITH, T. K.; McMILLAN, G.; CASTILLO., J. B. Effect of feeding blends of *Fusarium* mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. **J. Anim Sci.**, v. 75, p. 2184-2191, 1997.

SMITH, W. G. **Diseases of Field and Garden Crops**, London, 1884, p. 208–213 apud CHAMPEIL, A.; DORÉ, T.; FOURBET, J. F. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and

the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains, **Plant Sci.**, v. 166, p. 1389-1415, 2004.

SØRENSEN, J. L.; GIESE, H. Influence of carbohydrates on secondary metabolism in *Fusarium avenaceum*. **Toxins**, v. 5.9, p. 1655-1663, 2013.

SPOLTI, P. et al. Phenotypic and pathogenic traits of two species of the *Fusarium graminearum* complex possessing either 15-ADON or NIV genotype. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 133, p. 621–629, 2012.

STĘPIEŃ, Ł. et al. "Wheat-infecting *Fusarium* species in Poland—their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay. **J. Appl. Genet.**, v. 49, p. 433-441, 2008.

STRANGE, R. N.; SMITH, H. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 1, p. 141–150, 1971.

TAG, A. G., et al. A novel regulatory gene, Tri10, controls trichothecene toxin production and gene expression. **Appl. Environ. Microbial.**, v. 67, p. 5294-5302, 2001.

TAJIMA, O., et al. Statistically designed experiments in tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, p. 685-695, 2002.

TAKAHASHI, M. et al. A 90-day subchronic toxicity study of nivalenol, a trichothecene mycotoxin, in F344 rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 125-135, 2008.

TIEMANN, U., et al. Effects of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two toxins on selected immunological and histological measurements in the spleen of gilts. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p. 236-245, 2006.

TOMASZEWSKI, J. et al. Zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium tissue. **Ginekol. Pol.**, v. 69, p. 363–366, 1998.

TÓTH, B. et al. Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. **Plant Breeding**, v. 127, p. 1-8, 2008.

TROSMO, A. M.; HSIANG, T.; OKUYAMA, H.; AND NAKAJIMA, T. 2001. Low temperature diseases caused by *Microdochium nivale*. In **Low temperature plant microbe interactions under snow**. Japan: Hokkaido National Agricultural Experiment Station, 2001, 75- 86.

UENO, Y. **Trichothecenes-** Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Kodansha/Elsevier, Tokyo/Amsterdam, 1983, 328 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) 2011. Global Agricultural Information Network. Disponível em: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Maximum%20Levels%20of%20Mycotoxins%20in%20Foods_Beijing_China%20-20Peoples%20Republic%20of_12-29-2014.pdf> Acesso em: 18 fev. 2015.

VARGA, E. et al. New tricks of an old enemy: Isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. **Environ. Microbiol.** (2014). doi: 10.1111/1462-2920.12718

VIDEMANN, B. et al. Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 3279–3286, 2008.

WALTER, J.; LEY, R. The human gut microbiome: Ecology and recent evolutionary changes. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 65, p. 411- 429, 2011.

WARD, T. J. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. **Fungal Genet. Biol.**, v. 45, p. 473- 484, 2008.

WARD, T. J. et al. Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 9278- 9283, 2002.

WHITE T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990, p. 315–322.

WITHANAGE, G. M.; KOYAMA, H.; ISHIWATA, I. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 43, p. 6-10, 2001.

WU, X. et al. Synthesis and characterization of deoxynivalenol glucuronide: Its comparative immunotoxicity with deoxynivalenol. **Food Chem. Toxicol.** v. 45, p. 1846–1855, 2007.

YANG, J. Y. Toxic effects of T-2 toxin on reproductive system in male mice. **Toxicol. Ind. Health**, v. 26, p. 25-31, 2010.

ZAIN, M. E. Biochemical Markers in Taxonomy of the Genus *Fusarium*. **Res. J. Agri. Biol. Sci.**, v. 6, p. 1-7, 2010.

ZHANG J. B. et al. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. **Mycol. Res.**, v. 111, p. 967–75, 2007.

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food Chem. Toxicol.**, v.45, p.1–18, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A - Curvas padrão referentes a eficiência dos iniciadores utilizados para análise de expressão gênica de tricotecenos

Gene TRI 4

Gene TRI 5

Gene TRI 6

Gene TRI 12

Gene EF-1 α

Apêndice B - Curva de melting indicando a especificidade dos iniciadores utilizados na técnica de expressão gênica de tricotecenos.

Gene TRI 4

Gene TRI 5

Gene TRI 6

Gene TRI 12

Gene EF-1 α

Apêndice C - Curvas padrão para quantificação de DNA dos genótipos nos grãos de trigo

NIV **HOR**

Apêndice D - Equações das curvas analíticas dos padrões de micotoxinas e suas linearidades.

Micotoxina	Detector	Faixa de concentração (µg/mL)	Curva analítica	Tempo de retenção (min)	r
DON	UV	1-10	$y = 24071,33x - 465,06$	4,9	0,9903
ZEA	FL	0,2-2	$y = 46778,41x - 498,54$	9,8	0,9977

UV=ultravioleta; FL=fluorescência; r = coeficiente de correlação.

Apêndice E - Cromatograma dos padrões de micotoxinas no detector A (ZEA) e B (DON).