

VINÍCIUS DE MORAIS BARROSO

**MICROBIOTA E OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS
EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE
MILHO TRANSGÊNICO (Bt)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

VINÍCIUS DE MORAIS BARROSO

**MICROBIOTA E OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS
EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE
MILHO TRANSGÊNICO (Bt)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Barroso, Vinícius de Moraes.

Micobiota e ocorrência de fumonisinas em diferentes genótipos de milho transgênico (Bt) / Vinícius de Moraes Barroso. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micotoxinas.

Versão do título para o inglês: Mycobiota and occurrence of fumonisins in different genotypes of transgenic corn (Bt).

1. Atividade de água 2. *Fusarium verticillioides* 3. Híbridos
4. Micoflora 5. Micotoxinas 6. Milho I. Corrêa, Prof. Dr. Benedito
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB07/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vinícius de Moraes Barroso.

Título da Dissertação: Micobiota e ocorrência de fumonisinas em diferentes genótipos de milho transgênico (Bt).

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

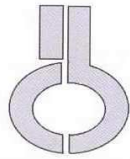
Aprovado(a)

Reprovado(a)

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° 439/11 referente ao projeto intitulado: “*Micobiota e ocorrência de fumonisinas em diferentes genótipos de milho transgênico (Bt)*” sob a responsabilidade de **Vinícius de Moraes Barroso**, 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 envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2011.

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

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

Aos meus pais, pelo amor incondicional,
incentivo e exemplos de vida.

Aos meus irmãos, pelo
companheirismo, amizade e carinho.

A minha noiva, pelo amor, apoio e
dedicação.

Sem vocês eu não sou nada,

Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedito Corrêa, pela orientação, amizade, respeito e exemplo de dedicação ao ensino. Obrigado pela oportunidade e por contribuir com meu crescimento profissional.

À Universidade de São Paulo e aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos valiosos ensinamentos.

À Tatiana Alves dos Reis, pela amizade, compreensão e apoio técnico, obrigado pelos ensinamentos que foram importantes para o meu trabalho

À Dra. Arianne Costa Baquião, pela amizade, e pelos valiosos ensinamentos no período de estágio dentro do laboratório

À Dra. Liliana Rocha, pelos ensinamentos durante o trabalho.

Aos meus amigos, Ednei Assunção, Mariana Sconza, Maitê Oliveira, Danielle Atayde, Ludmila Jalaim, Patrícia Zorzete, Tainah Drumond, Gabriela Reis, pelos momentos descontraídos.

Aos companheiros do Laboratório de Micotoxinas, pela parceria durante o estágio e trabalho.

A todos aqueles que tenham contribuído direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

A fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A Deus, por tudo.

A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.

Marcel Proust

RESUMO

BARROSO, V. M. **Micobiota e ocorrência de fumonisinas em diferentes genótipos de milho transgênico (Bt)**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os principais fungos que acometem o milho (*Zea mays* L.) são *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. No Brasil, o gênero *Fusarium* é comumente associado aos grãos de milho sendo algumas espécies capazes de produzir elevados níveis de fumonisinas. Estudos têm demonstrado diminuição na contaminação por fumonisinas em milho transgênico (utilização do gene *cry*), devido à queda da infestação dos insetos nos grãos e, conseqüentemente, dificultando a entrada de fungos toxigênicos. O presente trabalho teve como objetivo pesquisar a micobiota e a presença de fumonisinas em diferentes genótipos de milho transgênico (Bt) e seus respectivos híbridos controle. Foram analisadas 240 amostras dos genótipos: 2B710 (Controle) e 2B710 Herculex (Hx); AG8088 (Controle) e AG8088 VT PRO; 30F35(Controle) e 30F35 YieldGard (YG). A micobiota dos grãos, realizada pela técnica da semeadura direta em superfície em meio de Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), revelou a presença dos seguintes gêneros em ordem decrescente de freqüência: *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Acremonium* e *Alternaria*. As espécies do gênero *Fusarium*, após serem identificadas por método morfológico clássico, foram também submetidas à identificação molecular, através do sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1- α . A atividade de água média nas amostras variou de 0,90 (2B710) a 0,96 (2B710 Hx). Comparando a micobiota entre os híbridos controle e transgênico, observou-se maior contaminação nas amostras controle com exceção do híbrido 2B710, que apresentou um leve aumento na contaminação na tecnologia transgênica Herculex. A freqüência relativa do gênero *Fusarium* nos diferentes híbridos revelou menor contaminação nos transgênicos, com exceção do híbrido AG8088 VT PRO. *Fusarium verticillioides* foi o fungo mais frequente tanto nos transgênicos como nos controles. Análise de fumonisinas dos grãos, realizada por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE), revelou a presença de fumonisina B₁ (FB₁) em 222 (92,5%) das amostras analisadas e fumonisina B₂ (FB₂) em 113 (47,1%) delas. Do total de amostras analisadas, 71 (29,6%) apresentaram níveis de contaminação acima 2000 μ g/Kg, limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para a somatória das fumonisinas B₁ + B₂. Estatisticamente, não se constatou nos genótipos 2B710 e 30F35 indícios de variação na produção de fumonisina B₁, B₂ e total nas variedades transgênica e não transgênica. Já para o genótipo AG8088 houve indícios de menor produção de fumonisina B₁ e menor produção de fumonisina total na variedade transgênica.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*. Micoflora. Híbridos. Milho. Atividade de água. Transgênicos.

ABSTRACT

BARROSO, V. M. **Mycobiota and occurrence of fumonisins in different genotypes of transgenic corn (Bt)**. 2013. 87p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The main fungi that attack corn (*Zea mays* L.) are *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. In Brazil, the genus *Fusarium* is commonly associated with corn kernels and some species are able to produce high levels of fumonisins. Studies have shown decreased contamination by fumonisins in transgenic maize (using *cry* gene) due to fall of infestation of insects in seeds, and therefore hindering the entry of toxigenic fungi. The present study aimed to investigate the presence of mycobiota and fumonisins in different genotypes of transgenic corn (Bt) hybrids and their respective control. We analyzed 240 samples of genotypes: 2B710 (Control) and 2B710 Herculex (Hx), AG8088 (Control) and AG8088 VTPRO, 30F35 (Control) and 30F35 YieldGard (YG). The mycobiota of grain, using the technique of direct plating on surface through the middle of Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar, revealed the presence of the following genres in decreasing order of frequency: *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Curvularia*, *Alternaria* and *Acremonium*. Species of the genus *Fusarium*, after being identified by classical morphological method, were also subjected to molecular identification by partial sequencing of the gene elongation factor 1- α . The average water activity in the samples ranged from 0.90 (2B710) to 0.96 (2B710Hx). Comparing the mycobiota between control and transgenic hybrids, we observed a higher contamination in control samples except 2B710 hybrid, which showed a slight increase in contamination in transgenic Herculex technology. The relative frequency of *Fusarium* in different hybrids revealed lower in transgenic contamination, with the exception of the hybrid AG8088 VTPRO. The fungus *Fusarium verticillioides* were more frequent in both transgenic and controls. Analysis of fumonisins grain held by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) revealed the presence of fumonisin B₁ (FB₁) in 222 (92.5%) of the samples and fumonisin B₂ (FB₂) in 113 (47.1%) them. The total samples analyzed, 71 (29.6%) had contamination levels above 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, maximum limit established by brazilian legislation for the amount of fumonisin B₁ + B₂. Statistically, it was found in genotypes 2B710 and 30F35 evidence of variation in the production of fumonisin B₁, B₂ and total in transgenic and non-transgenic varieties. As for the genotype AG8088 was no evidence of lower production of fumonisin B₁ and lower production of fumonisin total in transgenic variety.

Keywords: *Fusarium verticillioides*. Mycoflora. Hibrids. Maize. Water activity. Transgenic.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Avaliação da recuperação para FB ₁	51
Quadro 2 - Avaliação da recuperação para FB ₂	51
Quadro B.1 - Produtos derivados do milho ou que contêm seus componentes isolados ou transformados industrialmente	75
Quadro B.2 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 2B710 Controle	77
Quadro B.3 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 2B710 Hx	78
Quadro B.4 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 30F35 Controle.....	79
Quadro B.5 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 30F35YG	81
Quadro B.6 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido AG8088 Controle	82
Quadro B.7 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido AG8088 VTPRO	83
Quadro B.8 - Incidência de fumonisina B ₁ e B ₂ no híbrido 30F35 (YG e Controle).....	85
Quadro B.9 - Incidência de fumonisina B ₁ e B ₂ no híbrido AG8088 (VTPRO e Controle)...	86
Quadro B.10 - Incidência de fumonisina B ₁ e B ₂ no híbrido 2B710 (Hx e Controle)	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional (modelo teórico) para a proteína Cry1Ia.....	24
Figura 2 - Estrutura tridimensional da proteína Cry3Aa.....	26
Figura 3 - Receptores moleculares da proteína Cry1A.....	28
Figura 4 - Modo de ação das proteínas Cry proposto por Knowles e Ellar.....	29
Figura 5 - Modelo proposto para a ação da proteína Cry por Zhang e colaboradores	30
Figura 6 - Principais regiões no plasmídeo nativo de <i>Agrobacterium</i>	34
Figura 7 - Transformação genética via <i>Agrobacterium</i>	35
Figura 8 - Porcentagem de contaminação fúngica nos híbridos 2B710, 2B710 Hx, 30F35, 30F35 YG, AG8088 e AG808 VTPRO.....	48
Figura 9 - Porcentagem de contaminação por <i>Fusarium</i> spp. nos híbridos 2B710, 2B710 Hx, 30F35, 30F35 YG, AG8088 e AG8088 VTPRO	48
Figura 10 - Porcentagem de contaminação por <i>Aspergillus</i> spp. nos híbridos 2B710, 2B710 Hx, 30F35, 30F35 YG, AG8088 e AG8088 VTPRO.....	49
Figura 11 - Porcentagem de contaminação por <i>Penicillium</i> spp. nos híbridos 30F35, 30F35YG, AG8088, AG8088 VTPRO, 2B710 e 2B710 Hx	49
Figura A.1 - Mapa da Mesoamérica	73
Figura A.2 - Lagarta-do-cartucho	73
Figura A.3 - Lagarta-da-espiga	73
Figura A.4 - Broca-do-colmo	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Eventos de milho transgênico Bt liberados no Brasil, suas características e respectivas datas de aprovação pela CTNBio.....	31
Tabela 2 - Concentração das soluções para a curva de calibração – Curva de calibração 1 ...	42
Tabela 3 - Concentração das soluções para a curva de calibração – Curva de calibração 2 ...	42
Tabela A.1 – Estatísticas descritivas para atividade de água	70
Tabela A.2 - Estatísticas descritivas o crescimento de <i>Fusarium</i> em porcentagem de grãos contaminados	70
Tabela A.3 – Estatísticas descritivas para a produção de fumonisina B ₁ (µg/kg)	70
Tabela A.4 – Estatísticas descritivas para a produção de fumonisina B ₂ (µg/kg).....	71
Tabela A.5 – Estatísticas descritivas para a produção de fumonisina (B ₁ + B ₂) em µg/kg.....	71
Tabela A.6 – Distribuição de frequências para a produção de fumonisina (B ₁ + B ₂) dentro ou acima do permitido pela legislação brasileira.....	71
Tabela A.7 – Correlação de <i>Spearman</i> entre a atividade de água, crescimento de <i>Fusarium</i> e produção de fumonisina B ₁ e B ₂	72
Tabela A.8 – Valores-p dos testes para comparação entre os milhos transgênicos e não transgênicos em relação ao crescimento de <i>Fusarium</i> e a produção de fumonisina.....	72
Tabela A.9 - Valores-p dos testes para comparação entre os milhos transgênicos e não transgênicos em relação à proporção de amostras que não atendem a legislação.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Milho	15
1.2 Micobiota do milho	16
1.3 <i>Fusarium verticillioides</i>	18
1.4 Fumonisinias	19
1.5 Pragas relacionadas ao milho	21
<u>1.5.1 Lagarta-do-cartucho, <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith, 1797) – Lepidoptera: Noctuidae</u>	21
<u>1.5.2 Lagarta-da-espiga, <i>Helicoverpa zea</i> (Boddie, 1850)-Lepidoptera: Noctuidae</u>	22
<u>1.5.3 Broca-do-colmo, <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794) - Lepidoptera: Pyralidae</u>	23
1.6 <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
<u>1.6.1 As δ-endoproteínas (proteínas Cry e Cyt)</u>	25
<u>1.6.2 Modo de ação das proteínas Cry</u>	27
1.7 Milho transgênico (milho Bt)	30
<u>1.7.1 Produção de milho Bt</u>	33
<u>1.7.2 Efeito do milho Bt sobre as fumonisinias</u>	35
2 PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Implantação, colheita e análise do experimento	38
3.2 Micobiota das amostras de milho	38
<u>3.2.1 Técnica da semeadura direta para o isolamento da micobiota das amostras de grãos de milho e verificação da atividade de água dos grãos</u>	38
3.3 Identificação das espécies de <i>Fusarium</i> através do sequenciamento parcial do gene do Fator de Elongação 1 Alfa (TEF-1α)	39
<u>3.3.1 Extração do DNA</u>	39
<u>3.3.2 Amplificação do fragmento parcial do gene TEF-1α</u>	40
<u>3.3.3 Purificação do fragmento</u>	40
<u>3.3.4 Reação de sequenciamento</u>	40
3.4 Avaliação da metodologia analítica para as fumonisinias B₁ e B₂	41

<u>3.4.1 Construção da curva de calibração</u>	41
<u>3.4.2 Avaliação da recuperação</u>	42
<u>3.4.3 Determinação de Fumonisinias das Amostras de Milho</u>	43
3.4.3.1 Extração das fumonisinias das amostras de milho	43
3.4.3.2 Purificação do extrato.....	43
3.4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43
3.4.3.4 Determinação dos limites de quantificação para fumonisinias FB ₁ e FB ₂	44
3.5 Análise estatística	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Microbiota fúngica do milho	45
4.2 Avaliação da metodologia analítica para determinação das fumonisinias B₁ e B₂	50
4.3 Determinação das fumonisinias nos grãos de milho	51
4.4 Análise estatística dos resultados	52
<u>4.4.1 Análise exploratória</u>	52
<u>4.4.2 Análise inferencial</u>	53
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A – Tabelas	70
ANEXOS	73
ANEXO A – Figuras	73
ANEXO B – Quadros	75

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Milho

O milho também conhecido como *abati*, *auati* e *avati* (HOUAISS, 2009), é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L. Para o seu desenvolvimento necessita de luz, temperatura entre 25°C a 30°C e precipitação pluvial mínima de 400 mm (BENSON; PEARCE, 1987).

Essa planta teve sua origem na mesoamérica (Fig. A.1), um dos mais importantes centros de domesticação de vegetais, a região compreende do Tampico, no Golfo do México, até a parte meridional de Sinaloa, no Pacífico, limitada ao sul com Honduras e Nicarágua (MACHADO; MAGNAVACA, 1991).

Segundo Pohl (2007), o início da cultura do milho data cerca de 7000 anos atrás na região do Golfo do México, sendo descendente da planta Teosinto Mexicana (*Zea mays* subsp. *Iltis* e *DoebBley*). Com o descobrimento da América, o milho foi levado para a Espanha, França e Itália, onde, a princípio, era cultivado em jardins como planta exótica e ornamental. Uma vez conhecido seu valor alimentício, passou a ser difundido por toda a Europa, Ásia e pelo Norte da África. Atualmente, é produzido praticamente em todo o mundo, exceto nas regiões que apresentam limitações climáticas (MOURA; OLIVEIRA, 1980).

Os grãos de milho são geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. O peso individual do grão varia, em média, de 250 a 300 mg e sua composição média em base seca é 72% amido, 9,5% proteínas, 9% fibra (a maioria detergente neutro) e 4% óleo. Conhecido botanicamente como uma cariopse, o grão de milho é formado por quatro principais estruturas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (PAES, 2006).

A importância econômica desse cereal caracteriza-se pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, como a produção de biofilmes e embalagens biodegradáveis (Quadro B.1). Cerca de 70% da produção mundial de milho é destinado a alimentação animal, podendo este percentual chegar a 85%, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES, 2006).

A cultura do milho pode ser considerada como uma das mais importantes no cenário agrícola brasileiro. É fundamental para as cadeias produtivas de aves, suínos e bovinocultura

leiteira, uma vez que é o principal insumo da ração animal (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011).

Na alimentação humana é utilizado *in natura* e na forma de subprodutos como pão, farinha e massas (CANTARELLA, 1993). O Brasil é considerado o terceiro maior produtor desse grão no cenário mundial, ficando atrás somente dos Estados Unidos e China, chegando a atingir produção de 57,5 milhões de toneladas na safra 2010/2011. (CONAB, 2011) e a produção de 72,8 milhões de toneladas na safra 2011/2012 (CONAB, 2012).

A cultura do milho pode ser afetada por muitos problemas destacando-se: fertilidade do solo, época de semeadura, potencial produtivo do híbrido e ataque de agentes nocivos como plantas daninhas, insetos e doenças. As principais doenças associadas ao milho, no Brasil, são causadas por vírus, bactérias e fungos. Os efeitos do crescimento fúngico incluem: diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais, perda de qualidade e produção de compostos tóxicos, micotoxinas (POMERANZ, 1982). Essas micotoxinas são normalmente produzidas pelos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (CASA; REIS, 2003).

Os principais insetos-praga que atacam esta cultura são: *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) e *Helicoverpa zea* (lagarta-da-espiga), e *Diatraea saccharalis* (broca-do-colmo) (DUARTE et al., 2007).

Diante das vias de contaminação do milho, o controle da contaminação por fungos no campo pode ser feito por melhoramento genético, pela seleção de plantas resistentes, dispensando-se o emprego de defensivos agrícolas e contribuindo para a preservação do meio ambiente (COSTA et al., 2003).

1.2 Micobiota do milho

Os grãos de milho são colonizados por uma ampla variedade de fungos pré e pós-colheita. A espécie predominante dependerá de fatores abióticos e bióticos. O milho é particularmente susceptível à colonização fúngica, após ocorrer à emergência do tecido (MILLER et al., 1994).

A contaminação pode ocorrer desde o cultivo até a colheita, podendo ocorrer no transporte, armazenamento e nas diferentes fases de produção, existindo maior intensidade sobre condições de temperatura e umidade favoráveis (FRISVAD; SAMSON, 1991). Após a

colheita, o crescimento fúngico depende da ação de muitos fatores como: Atividade de água (Aa) da semente, da temperatura, da umidade, da aeração, da interação microbiológica, da ação de insetos, da contaminação interna das sementes, de tratamentos químicos e da exposição à umidade (HESSELTINE, 1976).

O gênero *Fusarium* é o principal gênero fúngico que causa deterioração no milho, sendo as espécies de *F. graminearum*, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* as mais frequentes (MARASAS; NELSON; TOUSSON, 1984). As espécies, *F. graminearum*. e *F. verticillioides*, são consideradas os principais patógenos do milho, invadindo através dos sítios de danos causados por insetos (MILLER; REID; HARRIS, 2007). No entanto, *F. verticillioides* e espécies afins, incluindo *F. proliferatum*, parecem ser comensais e endêmicas no milho, na maior parte do mundo (LESLIE; SUMMERELL, 2006). O *F. verticillioides* predomina em regiões tropicais e áreas temperadas úmidas, mas é pouco freqüente em zonas temperadas frias. Por sua vez, *F. graminearum* predomina em regiões de clima tropical a temperado (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Além do gênero *Fusarium*, outros fungos são também encontrados no milho, como o *Aspergillus flavus* e o gênero *Penicillium* (PITT; HOCKING, 2009). A espécie fúngica mais comumente associada à semente de milho no Brasil é *F. verticillioides* (CASA; REIS, 2003).

Lillehoj e Zuber (1988), analisando grãos de milho submetidos à secagem logo após a colheita provenientes de diversos países, verificaram que 92% das amostras provenientes do Brasil estavam contaminadas com *Fusarium* spp., 25% por *Penicillium* spp. e 8% por *Aspergillus* spp.

Em pesquisa realizada por Castro, Soares e Furlani. (1995), com milho recém-colhido no Brasil, foram isolados os seguintes fungos: *Aspergillus* spp., *A. flavus*, *A. niger*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *F. verticillioides* e *A. ochraceus*, com maior incidência nos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*.

Almeida et al. (2000), estudando 66 amostras de três híbridos de milho (BR-201, C-91, CX-322) recém-colhidos, provenientes de três regiões do estado de São Paulo (Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto). Em Assis, o gênero *Fusarium* foi o mais frequente (80%), seguido pelo *Penicillium* (40%) e *Aspergillus* (23,3%); na região do Capão Bonito, *Fusarium* spp. (55%), *Penicillium* spp. (50%) e *Aspergillus* (22,2%), e em Ribeirão Preto, *Fusarium* (77,8%), *Penicillium* (50%). Do gênero *Fusarium*, o *F. verticillioides* foi a mais isolada (60%).

Ono et al. (2002) analisaram 57 amostras de grãos de milho no estágio de maturação fisiológica (híbrido XL-251), sendo 26 provenientes de Capão Bonito e 31 de Ribeirão Preto. Em Capão Bonito, foram encontradas *F. verticillioides* (35%), levedura (32%), *Penicillium* spp. (27%), *A. flavus* (1%), *Acremonium* spp. (1%), *Nigrospora* spp. (1%) e *Mucor* spp. (0,5%). Em Ribeirão Preto, foram detectados *F. verticillioides* (49%), *Penicillium* spp. (21%), levedura (10%), *A. flavus* (5%), *Acremonium* spp. (4%), *Cladosporium* spp. (0,8%), *Mucor* spp. (0,7%), *Trichoderma* spp. (0,7%), *Nigrospora* spp. (0,6%), fungos não esporulados (0,5%), *Alternaria* spp. (0,2%), *F. proliferatum* (0,1%) e *Rhizopus* spp. (0,1%).

1.3 *Fusarium verticillioides*

O *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg é o estágio anamorfo (assexuado) da *Gibberella moniliformis* Wineland. Ele é considerado um patógeno do milho, sendo encontrado no mundo inteiro, onde esse cereal é cultivado (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A contaminação no milho ocorre durante o seu ciclo vegetativo no campo, sendo capaz de sintetizar fumonisina até a época da colheita. Essa síntese ocorre de forma rápida e abundante, em milho submetido a alto índice de Aa (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995).

O fungo pode infectar os grãos fazendo uso de três vias: invasão sistêmica, mediante contaminação das sementes, uma vez que é considerado um fungo endofítico; por fissuras na planta já desenvolvida; ou através do “cabelo do milho” (MUNKVOLD; MCGEE; CARLTON, 1997). Dentre essas rotas de contaminação, a infecção nos grãos ocorre de forma mais eficiente quando as cepas de *F. verticillioides* são inoculadas nos “cabelos do milho”, proporcionando rompimento da casca e maior severidade no apodrecimento da espiga (WARFIELD; DAVIS, 1996).

A prevalência de *F. verticillioides* no teosinto, considerado ancestral do milho, demonstra que essa associação é longínqua, sugerindo importância evolucionária. Além disso, *F. verticillioides* pode degradar proteínas benzoxazinóides (glicosídeos ativados após dano tecidual) produzidas por gramíneas, garantindo êxito como fitopatógeno (DESJARDINS; PLATTNER; GORDON, 2000; GLENN; GOLD; BACON, 2002).

A espécie *F. verticillioides*, taxonomicamente, faz parte de um complexo de espécies denominado *Gibberella fujikuroi*, anteriormente agrupado na seção *Liseola*. Este complexo é composto por nove espécies biológicas ou populações *mating*, designadas pelas letras de “A”

a “T”. *F. verticillioides* corresponde à população *mating* “A”, mais frequentemente isolada do milho e capaz de produzir elevados níveis de fumonisinas. As espécies biológicas “D” (*F. proliferatum*) e “E” (*F. subglutinans*) também são isoladas do milho, sendo que a primeira produz quantidades significativas de fumonisinas e a segunda, níveis baixos ou não são capazes de sintetizá-las (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

A temperatura máxima de crescimento de *F. verticillioides* tem sido relatada como sendo 32-37 °C, o mínimo como 2,5-5 °C, e o ótimo próximo de 25 °C (NIRENBERG, 1976). A Aa mínima para o crescimento foi de 0,87 a 25 °C, após um tempo de germinação de quatro meses (ARMOLIK; DICKSON, 1956). A redução da quantidade de oxigênio 20-2% não teve qualquer efeito sobre o crescimento de *F. verticillioides*, mas com sacos de embalagem a vácuo inibiram totalmente o crescimento (SAMAPUNDO et al., 2007).

Fusarium verticillioides é a principal espécie produtora de fumonisinas, grupo de micotoxinas que ocorre naturalmente no milho e em produtos a base de milho. Para a produção de fumonisinas a Aa mínima é 0,90 (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995).

1.4 Fumonisinas

As fumonisinas são metabólitos secundários produzidos, principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (GELDERBLOM et al., 1988; SCOTT, 1993). Além dessas duas principais espécies existem no mínimo mais 13 espécies do gênero produtoras de micotoxinas, tais como: *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. thapsinum*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. subglutinans*, *F. globosum*, *F. pseudonygamai*, *F. oxysporum*, *F. andiyazi* e *F. polyphialidicum* (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

Recentemente, descobriu-se que *Aspergillus niger* é capaz de produzir FB₂ e FB₄, porém, apresenta regulação da produção e perfil quantitativo das fumonisinas diferentes de *F. verticillioides* (KNUDSEN et al., 2011; MOGENSEN, 2010). Sabe-se também, que compostos semelhantes às fumonisinas são produzidos por espécies de *Alternaria* (BOTTINI; GILCHRIST, 1981).

As fumonisinas são moléculas polares, solúveis em água e em acetronitrila-água e insolúveis em solventes orgânicos. A hidrólise das fumonisinas, por aquecimento com ácido hidrolórico 6 M ou hidróxido de potássio 0,05 M e 2 M, produz ácido tricarbóxico e o aminopoliol correspondente (SCOTT, 1993).

Estruturalmente, as fumonisinas constituem de 19 ou 20 carbonos lineares com hidroxil, ácido tricarbóxico, ligadas em várias posições ao longo da cadeia. Desde 1988 foram caracterizados 28 fumonisinas (RHEDER; MARASAS; VISMER, 2002; SEO; LEE, 1999). Entretanto, as formas mais presentes em quantidades significativas como contaminantes naturais de milho e derivados são as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) (RHEDER MARASAS; VISMER, 2002; VISCONTI et al., 1995). A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo, aproximadamente, 70% do total das fumonisinas estudadas. As concentrações de FB₂ e FB₃ observadas representam cerca de 15 a 30% das proteínas do grupo (MUSSER; PLATTNER, 1997; SYDENHAM et al., 1991).

As fumonisinas são elaboradas a partir de uma estrutura que é característica da esfinganina, um composto intermediário da biossíntese dos esfingolípídios. Essa semelhança das fumonisinas com a molécula de esfinganina leva alguns autores a acreditar que o seu mecanismo de ação esteja relacionado com a inibição do metabolismo dos esfingolípídios, pela potente inibição de ceramida sintetase (WANG et al., 1991), uma enzima chave na biossíntese dos esfingolípídios (RILEY et al., 1993).

Os esfingolípídios estão relacionados com diversas funções da célula, tais como: comunicação célula-célula, crescimento, diferenciação e transformação. Assim, a inibição da biossíntese dos esfingolípídeos pode trazer graves conseqüências (SWEETLEY, 1991; WANG et al., 1991). Nas fumonisinas, a alanina substitui a serina, enquanto o carbono 18 do acetil-CoA substitui o palmitoil-CoA. (DESJARDINS et al., 1995).

As análises de ressonância nuclear magnética e de espectrometria de massa revelaram que a fumonisina B₁ é um diéster de propano 1,2,3- ácido tricarbóxico e 2- amino-12, 16 dimetil – 3,5,10,14,15 – pentahidroxiicosano (C₃₄H₅₉NO₁₅), no qual o C₁₄ e C₁₅ dos grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1,2,3 – ácido tricarbóxico (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

A FB₁ pode ocasionar leucoencefalomalácia em equinos (LEME), edema pulmonar em suínos, câncer hepático em ratos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002), redução do desenvolvimento, imunossupressão, problemas cardíacos, degeneração e necrose hepática em aves, além de estar associada ao câncer esofágico em humanos e defeitos congênitos do tubo neural (MARASAS et al., 2004). A citotoxicidade dessa micotoxina foi explicada pela peroxidação de lípidios e pela inibição da síntese celular de macromoléculas, de proteínas e de DNA (ABADO-BECOGNEE et al., 1998; SAHU et al., 1998). A FB₁ causou a apoptose em vários tipos de células e tecidos. (TOLLESON et al.,

1999; ZHANG; DICKMAN; JONES, 1999), devido as alterações na produção dos esfingolipídios.

A frequente ocorrência de fumonisinas no milho como também as implicações na saúde humana e animal, tem influenciado no desenvolvimento de diversas técnicas de separação para esta micotoxina, destacando-se a cromatografia líquida de alta eficiência, técnica que se destaca pela alta resolução, alta sensibilidade e versatilidade (DILKIN et al., 2001). O uso de colunas de imunoafinidade para extração e limpeza, tem possibilitado maior especificidade permitindo limites de detecção mais baixos com menor volume de solvente (SHUNDO; SABINO, 2006).

1.5 Pragas relacionadas ao milho

1.5.1 Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797)–Lepidoptera:

Noctuidae

Spodoptera frugiperda é nativa das zonas tropical e subtropical das Américas, sua distribuição abrange desde o sul do Canadá até a Argentina (LEIDERMAN; SAUER, 1953).

Os adultos são mariposas (Fig. A.2), com as asas anteriores pardo-escuras e as posteriores branco-acinzentadas (BIANCO, 2005). As fêmeas colocam seus ovos na face superior das folhas (SILVA, 2000), formando massas com média de aproximadamente 200 ovos, com período de incubação de aproximadamente três dias (LUCCHINI, 1977); logo após a eclosão, as lagartas alimentam-se do cório do ovo, entrando em período de repouso por 10 horas (SILVA, 2000).

A *S. frugiperda* é uma espécie polífaga. As lagartas alimentam-se de uma série de plantas cultivadas, alimentando-se de arroz, milho, soja, amendoim, sorgo e trigo. A alimentação das lagartas inicia raspando os tecidos verdes de um lado da folha, deixando a epiderme membranosa, do outro lado intacto. Lagartas maiores, em geral, dirigem-se para o interior do cartucho, começam a fazer buracos na folha e, quando estão entre o quarto e o sexto instares (oito a 14 dias), podem destruir completamente pequenas plantas ou causar severos danos em plantas maiores (OLIVEIRA; PINTO; FERNANDES, 2009).

Quando falta alimento, elas migram em grupos, sendo por isso, denominadas de lagartas militares (GASSEN, 1996).

As plantas de milho prejudicadas pela destruição do cartucho apresentam área fotossintética reduzida, comprometendo a produção. A lagarta-do-cartucho pode ainda atacar a base da espiga, destruindo os grãos ou abrindo caminho para micro-organismos, podendo provocar queda da espiga (CRUZ, 1999).

Wiseman, Painter e Wassom (1966) consideram-na como a mais importante entre as pragas do milho nas Américas, com ampla destruição. Atualmente, é encontrada em todos os estados do Brasil, favorecida pelas condições climáticas e pela disponibilidade e diversificação de plantas hospedeiras o ano todo (CRUZ, 1995).

No Brasil, as perdas causadas por este inseto-praga variam de 17% a 38,7% (CRUZ et al., 1999). Sua importância deve-se não somente aos danos provocados, mas especialmente à dificuldade de seu controle, segundo Melo et al. (2006).

1.5.2 Lagarta-da-espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850)-Lepidoptera: Noctuidae

A lagarta-da-espiga do milho, *Helicoverpa zea* (Boddie)-Lepidoptera: Noctuidae está distribuída ao longo de regiões temperadas e tropicais em todo o mundo. Esse inseto ocasiona danos significativos às culturas do milho, algodão, sorgo, tomate e girassol (SILVA et al., 1968).

O adulto de *H. zea* é uma mariposa com cerca de 40 mm de envergadura, com as asas anteriores de coloração amarelo-parda, com uma faixa transversal mais escura, apresentando também manchas escuras dispersas sobre as asas. As asas posteriores são mais claras, com uma faixa nas bordas externas (Fig. A.3). A fêmea fecundada põe o ovo de preferência nos estilos-estigma (cabelos do milho). Os ovos, esféricos e com saliências laterais (1 mm de diâmetro) são depositados individualmente (até 15 por espiga). Durante o verão, num período de três a quatro dias dá-se a eclosão das lagartas que se alimentam do estilo-estigma e dos grãos em formação (OLIVEIRA; PINTO; FERNANDES, 2009).

Segundo pesquisa de Gassen (1996) a lagarta-da-espiga prejudica a cultura de três formas: atacando os estigmas (impedindo a fertilização), alimentando-se de grãos leitosos, os destruindo e; finalmente, os orifícios deixados pelas lagartas nas espigas, por ocasião da fase de pupa, facilitam a penetração de micro-organismos que podem causar podridões.

No Brasil, Carvalho (1980) constatou que as infestações de *H. zea* são de até 96,3%, causando danos de até 8,4%, com 2,1% em consequência de grãos comidos, 2,0% de grãos podres e 4,3% de falhas.

1.5.3 Broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 19740) - Lepidoptera: Pyralidae

Segundo Cruz (2007), *D. saccharalis*, vem sendo apontada como um sério problema à cultura do milho, no Brasil, especialmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste.

As perdas quantitativas em rendimentos de grãos de milho foram ao redor de 27% em experimentos conduzidos nos Estados Unidos. Na Argentina, os prejuízos ocasionados pelo ataque da broca foram estimados em 170 milhões de dólares por ano, com oscilações entre 150 e 300 milhões de dólares (CRUZ, 2009).

Os adultos são mariposas de coloração amarelo-palha (GASSEN, 1996). A asa anterior possui numerosas linhas de coloração marrom, que se estendem ao longo da mesma (Fig. A.4). Esta coloca seus ovos nas folhas e no colmo do milho e num intervalo de quatro a nove dias, dá-se a eclosão das lagartas, seu período larval médio é de 44 dias (OLIVEIRA; PINTO; FERNANDES, 2009). O comportamento dos adultos é noturno, permanecendo escondidos durante o dia. A longevidade dos adultos é de três e oito dias (CRUZ, 2007).

Inicialmente, as lagartas raspam a superfície da folha (PINTO; PARRA; OLIVEIRA, 2004) e/ou constroem uma galeria na nervura principal desta. Na fase vegetativa da cultura perfuram as folhas ainda enroladas, causando dano característico (CRUZ, 2009).

Estudos realizados por Cruz (2007) constatou que após a primeira ou segunda ecdise, as lagartas de *D. saccharalis*, penetram no colmo, abrindo galerias longitudinais. Esse inseto-praga apresenta grande potencial de causar prejuízos ao milho, em função de ocorrer em todas as fases do desenvolvimento da gramínea, desde a emergência da planta até o milho já desenvolvido. O aparecimento de população desse inseto, no início do florescimento ou na fase de enchimento dos grãos, pode causar elevados prejuízos, em função das galerias formadas nos entrenós, logo abaixo da espiga (CRUZ, 2009).

1.6 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria de solo, gram-positiva, aeróbica da família *Bacillaceae*, pertencente ao complexo *B. cereus*. Essa bactéria é caracterizada pela produção de inclusões protéicas cristalinas no momento de sua esporulação. É uma bactéria de ocorrência ubiqüitária (KRYWUNCZYK; FAST, 1980), em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (BRAVO et al., 1998). O número de células de Bt obtidas varia entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de

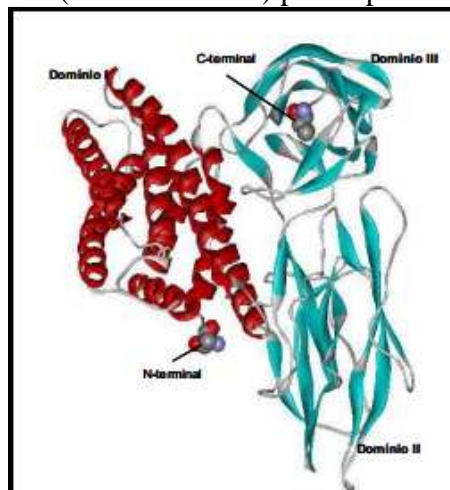
colônias (UFC) por grama de solo, já em plantas este número varia entre 0 e 100 UFC cm⁻² (DAMGAARD, 2000).

O *B. thuringiensis* foi, inicialmente, isolado de larvas mortas do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) e descrito pelo bacterologista Ishiwata. Uma década depois, foi isolado um organismo similar, na Alemanha, batizando-o de Bt (AGUIAR, 2007).

Durante a fase de esporulação (mecanismo de resposta das células as condições desfavoráveis do ambiente) ocorre o acúmulo de proteínas nas células, originando um corpo de inclusão cristalina, razão pelas quais são denominadas proteínas Cry (YAMAMOTO; DEAN, 2000).

As proteínas são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto na porção C-terminal (Fig. 1) determina a forma da estrutura do cristal (LI; CARREL; ELLAR, 1991)

Figura 1 - Estrutura tridimensional (modelo teórico) para a proteína Cry1Ia.



Produzida por modelagem molecular por homologia a partir da δ -endotoxina Cry3A código PDB 1DLC. Visualizada através do programa WebLab ViewerLite 3.7 da Molecular Simulations Inc.

Fonte: (MARTINS et al., 2005).

Além das proteínas Cry, *B. thuringiensis* pode produzir várias outras proteínas, incluindo proteínas com atividade inseticida como a α -exoproteínas, β -exoproteínas, hemolisinas, enteroproteínas, quinases e proteínas VIP (HANSEN; SALAMITOU, 2000), podendo apresentar sinergia com as proteínas Cry ou não.

1.6.1 As δ -endoproteínas (proteínas Cry e Cyt)

As proteínas Cry estão classificadas em 70 grupos baseados em função da identidade e homologia das sequências de aminoácidos. Atualmente, mais de 350 genes de proteínas Cry foram clonados e sequenciados nos últimos anos, a partir de diferentes estirpes de Bt (CRICKMORE et al., 2006). Cada proteína Cry é ativa contra alvos específicos, capazes de matar insetos de diferentes ordens, como: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera e também alguns nematóides. Em contraste, as proteínas citolíticas (Cyt) foram classificadas em dois grupos, que mostram especificidade principalmente para dípteros, sendo capazes de matar diferentes espécies de mosquitos tais como *Aedes* spp., *Culex* spp. e *Anopheles* spp. (BRAVO et al, 2011).

Segundo pesquisas de Bravo, Gill e Soberón (2007) as proteínas Cry e Cyt pertencem a classe de proteínas bacterianas conhecidas como proteínas formadoras de poros (TFP). Estas podem sofrer modificações conformacionais, permitindo a sua inserção ou translocamento na membrana celular do hospedeiro. Segundo Parker e Feil (2005) existem dois grupos de TFP: (1) α -hélice proteínas, no qual a região de α -hélice forma um poro através da membrana e (2) β -barril proteínas, que se inserem na membrana formando um β -barril composto de monômeros de grampos de folhas β -pregueadas .

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal, formando até cinco proteínas Cry, com pesos moleculares variando entre 30 e 142 KDa (MONNERAT; BRAVO, 2000). Já as proteínas citolíticas apresentam peso molecular entre 25 e 28 KDa (GLARE; O' CALLAGHAM, 2000).O cristal pode apresentar forma piramidal, cúbico, romboide, ovóide, esférico ou sem forma definida (HABIB; ANDRADE, 1998).

Os genes *cry* podem ser localizados tanto no cromossomo como em plasmídeos de alta massa molecular e com alto nível de replicação (40- 200 MDa) ou em ambos (SANCHIS et al., 1998). O número de cópias de um mesmo gene, que pode coexistir em uma linhagem de Bt sem que altere a sua fisiologia pode ser de 5 a 15 (ARANTES; LERECLUS, 1991).

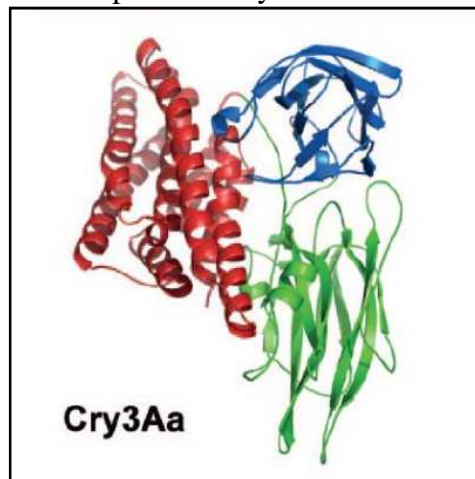
A expressão dos genes *cry* é regulada por dois mecanismos: o primeiro é dependente de fatores sigmas específicos da fase de esporulação (fase estacionária), onde está baseada a classificação da maioria dos genes *cry*, e outro independente do processo de esporulação, como o gene *vip3*, cujos fatores sigmas são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS; SOUZA; SHILER, 1998).

Existem seis fatores sigmas principais, o fator sigma σ^A está presente somente na fase vegetativa, enquanto outros fatores σ^E , σ^F , σ^G , σ^K , estão presentes durante a fase de esporulação. Já o fator sigma σ^H está presente durante a fase de transição, entre a fase vegetativa e o início da esporulação (AGUIAR, 2007).

Dentre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry. Outras estirpes apresentam cinco genes diferentes, como é o caso da subespécie *aizawai* HD-137 e subespécie *israelensis* (BOURGOUIN et al., 1988).

A primeira estrutura molecular de uma proteína Cry (Cry3A) foi determinada através de técnicas de cristalografia de raios X (LI; CARREL; ELLAR, 1991). A estrutura tridimensional das formas ativadas das proteínas Cry consiste de três domínios (Fig. 2).

Figura 2 - Estrutura tridimensional da proteína Cry3Aa.



Resolvida por cristalografia e difração de raios X. Os Domínios I, II e III estão representados em vermelho, azul e verde, respectivamente.

Fonte: (PIGGOT; ELLAR, 2007).

O domínio I é constituído por seis α -hélices anfipáticas (α -1, α -2, α -3, α -4, α -6 e α -7) circundando uma hélice central hidrofóbica (α -5). O domínio II possui α -hélices curtas e três folhas β -antiparalelas formando um β -prisma. O domínio III é formado por duas folhas β -antiparalelas, forma um β -sanduíche e possui similaridade a moléculas capazes de ligação a carboidratos (PIGGOT; ELLAR, 2007). O domínio I está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro, já os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. Acredita-se que o domínio III esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

1.6.2 Modo de ação das proteínas Cry

Os sintomas observados a partir da ingestão dos cristais e esporos de *B. thuringiensis* são: perda do apetite e do abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e morte (ARONSON; BECKMAN; DUNN, 1986). Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por esse micro-organismo (MONNERAT; BRAVO, 2000).

O mecanismo de ação das proteínas Cry pode ser dividido em três etapas: 1^a) solubilização e processamento das proteínas, 2^a) reconhecimento e ligação ao receptor e 3^a) inserção na membrana, agregação e formação do poro (MARTINS, 2009).

Na etapa de solubilização e processamento das proteínas, os cristais produzidos (Cry) são ingeridos pelas larvas de insetos susceptíveis, esses são solubilizados no intestino médio, cujo pH alcalino, promove a liberação de uma ou mais protoxinas. Essas protoxinas são, então, ativadas por proteases existentes no intestino médio dos insetos pela clivagem das porções N-terminal e C-terminal da proteína, liberando um monômero de aproximadamente 60-70 KDa (GROCHULSKI et al., 1995). Em Lepidópteros, as principais enzimas digestivas envolvidas na clivagem das proteínas Cry são as proteases serínicas, como a tripsina e a quimiotripsina (SCHNEPF et al., 1998) e em Coleópteros, as proteases cisteínicas e aspárticas (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

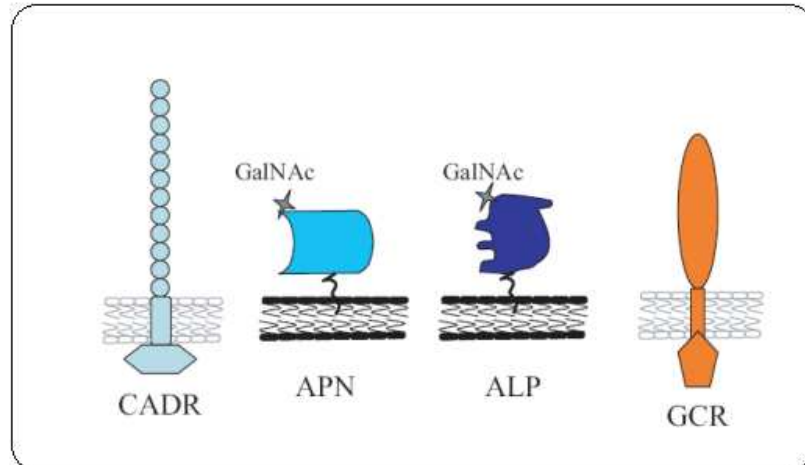
Na etapa de reconhecimento e ligação ao receptor, as proteínas Cry ativas ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades das membranas apicais das células colunares do intestino médio dos insetos susceptíveis das ordens Lepidoptera (HOFMANN et al., 1988), Diptera (HUGHES et al., 2005), Himenoptera, Homoptera, e Ortoptera (FEITELSON, 1994), Coleoptera (WEISER, 1986) e algumas espécies do Filo Nematoda (EDWARDS; PAYNE; SOARES, 1998).

A cinética de união das proteínas Cry às vesículas da membrana da microvilosidade apical dos insetos susceptíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro reversível (HOFMANN et al., 1988). O passo reversível envolve a interação entre a toxina e o seu sítio de união, o qual é um requisito básico para que ocorra a toxicidade, mas não suficiente (SCHNEPF et al., 1998). Entretanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligadas com a toxicidade (MONNERAT; BRAVO, 2000).

Segundo Gómez et al. (2007), há quatro receptores protéicos descritos como possíveis moléculas para a ligação das proteínas Cry nas células do epitélio intestinal dos insetos

susceptíveis: uma proteína do tipo caderina (CADR), uma aminopeptidase-N (APN) ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma fosfatase alcalina (ALP) ancorada com a licosilfosfatidil-inositol (GPI), e um glicoconjugado de 270Kda –GCR (Fig.3).

Figura 3 - Receptores moleculares da proteína Cry1A.



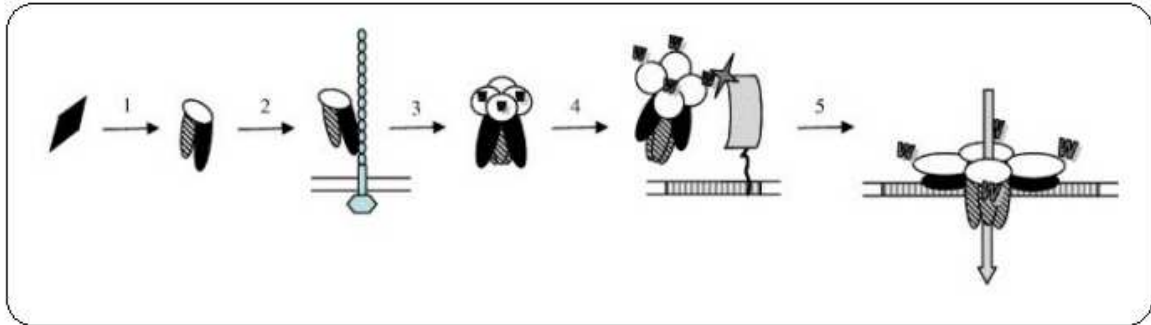
Fonte: (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Na terceira etapa os eventos não estão totalmente esclarecidos, existindo dois modelos propostos, o modelo da permeabilização da membrana induzida por inserção da toxina e a formação de poros levando a um efeito osmótico e conseqüentemente a morte do inseto (KNOWLES; ELLAR, 1987), modelo mais aceito em diversos trabalhos (BRAVO et al., 2004; SCHNEPF et al., 1998;) e o outro modelo, relata a morte celular promovido por sinalização celular (ZHANG et al., 2006).

Baseando-se no modelo de Knowles e Ellar (1987), atualizado por Bravo, Gill e Soberón (2007), propõe que ambos receptores (Caderina e APN) são necessários para a toxicidade da proteína Cry1A para *Manduca sexta* (Lepidoptera). O primeiro passo é a ligação do receptor Bt-R₁ (caderina), o qual promove uma clivagem proteolítica adicional da toxina no domínio I, na porção α -1, facilitando a formação da estrutura oligomérica, denominada pré-poro, importantíssimo para a inserção da proteína na membrana celular (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).O pré-poro liga-se ao segundo receptor do tipo APN. Neste receptor ocorre o direcionamento da estrutura do pré-poro para a plataforma de lipídios, que facilita a inserção e a formação do poro lítico na membrana celular (Fig. 4). Assim, as células epiteliais morrem por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e citólise osmótica (KNOWLES; ELLAR, 1987). O citoplasma adquire então um pH alcalino, interferindo no metabolismo celular normal e, conseqüentemente, destruindo o epitélio

intestinal. Uma vez destruídas as células colunares e caliciformes, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso a hemolinfa, causando a morte das larvas por inanição e septicemia

Figura 4 - Modo de ação das proteínas Cry proposto por Knowles e Ellar.

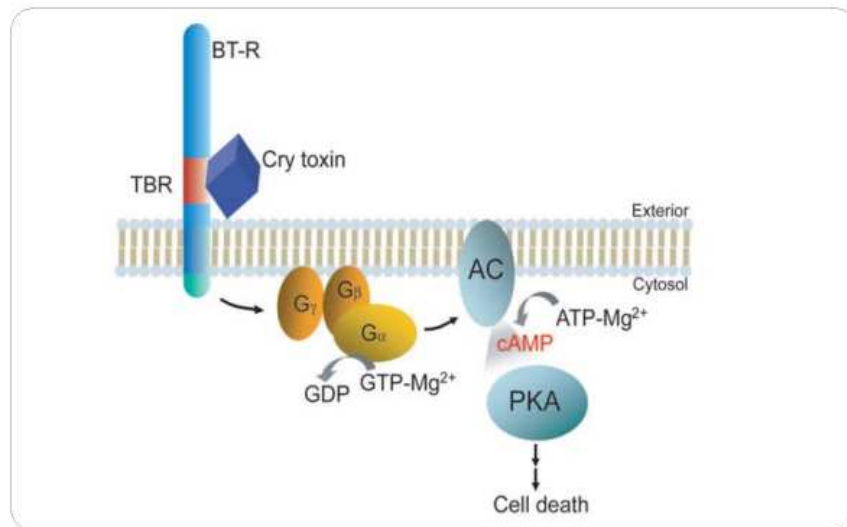


(1) Solubilização e ativação da toxina; (2) Ligação da toxina Cry monomérica no 1º receptor (Caderinas), mudança da conformação e clivagem da α -hélice 1; (3) Formação do oligômero; (4) Ligação da toxina oligomérica ao 2º receptor (ALP ou ANP). Ocorre uma mudança da conformação e a toxina assume um estágio globular; (5) Inserção da toxina na membrana e formação do poro.

Fonte: (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

O modelo proposto por Zhang et al.(2006) há a interação das formas monoméricas da Cry1Ab com o BT-R₁, desta forma, suficiente para ativação de um sinal para a morte celular via cascata de Mg²⁺ dependente. Esta interação (toxina-receptor) causa um estímulo à proteína G e a adenilato ciclase (AC), causando um aumento no AMP cíclico (AMPc) e a ativação da proteína quinase A (PKA). Essa reação em cadeia leva a desestabilização do citoesqueleto e dos canais iônicos e posterior morte celular (Fig.5). Este modelo foi validado com experimentos realizados por Zhang e colaboradores, demonstrando a correlação entre a quantidade do primeiro receptor (BT-R₁) com a toxicidade (ZHANG et al., 2008).

Figura 5 - Modelo proposto para a ação da proteína Cry por Zhang e colaboradores.



A toxina Cry interage com a região de ligação (TBR) do receptor (BT-R), estimulando a proteína G e adenilato ciclase, causando um aumento no AMP cíclico (AMPC) e a ativação da proteína quinase A (PKA), levando a desestabilização do citoesqueleto e dos canais iônicos e posterior morte celular.
 Fonte: (ZHANG et al., 2006).

1.7. Milho transgênico (milho Bt)

O milho Bt é um milho geneticamente modificado, cujo foram introduzidos genes específicos de *B. thuringiensis* no milho, levando à produção de proteínas tóxicas a determinadas ordens de insetos considerados pragas (insetos que causam danos econômicos) para a cultura.

Segundo pesquisas realizadas por Castro (2008) são atribuídas às variedades de milho Bt as seguintes vantagens: necessitam de menor quantidade de inseticidas, manejo integrado de pragas, ajudam a preservar a população de insetos benéficos na lavoura, oferecem menor risco de contaminação do lençol freático e dos rios; requerem menor consumo de água; maior produtividade e maior rentabilidade.

O primeiro milho Bt utilizado comercialmente ocorreu no ano de 1996 com a produção do milho MaximizerTM pela empresa Novartis no mercado norte americano (JOUANIN et al., 1998). Contudo os primeiros testes para o uso do milho Bt começou alguns anos atrás, segundo Koziel et al. (1993), através da inserção modificada do gene *cry1Ab*, conseguiram a expressão da proteína Cry1Ab em alto níveis em plantas de milho e, em testes de campo, foi verificada a proteção contra o consumo foliar e perfuração de colmos por *Ostrinia nubillalis*, uma importante praga da cultura do milho nos EUA.

No Brasil, em 1997, foram feitas, com o milho Bt11, as primeiras pesquisas com esse tipo de transgênico (SYNGENTA, 2010). Híbridos de milho, expressando a proteína Cry1Ab, foram liberados comercialmente (MON810 ou Milho *Guardian*), no ano de 2007 (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA, 2008).

No mundo, em 2010, foi plantado cerca de 19 milhões de hectares de milho transgênico em 16 países (JAMES, 2010). O Brasil assumiu a posição de terceiro maior produtor de transgênicos, sendo responsável por 12% da área total com transgênicos no mundo, depois dos EUA e da Argentina (JAMES, 2007).

A área estimada semeada com milhos transgênicos, em 2010/11, no Brasil, foi de 7,37 milhões de hectares ou 57,2% da área total, destacando-se um incremento do milho transgênico na safrinha (MENEZES et al., 2011).

Os cultivares transgênicos atualmente no mercado (safra 2011/2012) são resultantes de cinco eventos transgênicos para o controle de lagartas: o evento TC 1507, marca Herculex I®; o evento MON 810, marca registrada YieldGard®; o evento MON 89034 YieldGard VTPRO®; o Agrisure TL®, conhecido como Bt11; o evento MIR162, TL VIP® e dois eventos transgênicos que conferem resistência ao herbicida glifosato aplicado em pós emergência: o NK603, marca registrada Roundup Ready, e o GA 21 –TG. (LEITE et al., 2011). Na Tabela 1, encontra-se um histórico dos eventos de milho Bt, alguns também expressando genes para tolerância a herbicidas, liberados no Brasil até o ano de 2011.

Tabela 1 - Eventos de milho transgênico Bt liberados no Brasil, suas características e respectivas datas de aprovação pela CTNBio ⁽¹⁾.

(continua)

Evento	Características	Proteína(s)	Aprovação
MON810	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Cry1Ab	ago/07
BT11	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ab) e Tolerância ao glufosinato de amônio	Cry1Ab, PAT	set/07
TC1507	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e Tolerância ao glufosinato de amônio	Cry1F, PAT	dez/08
MIR162	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Vip3Aa20	set/09
MON810xNK603	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera Tolerância ao herbicida Glifosato	Cry1Ab CP4 EPSPS	set/09

Tabela 1 - Eventos de milho transgênico Bt liberados no Brasil, suas características e respectivas datas de aprovação pela CTNBio ⁽¹⁾.

	da ordem Lepidoptera e Tolerância ao glufosinato de amônio e glifosato	mEPSPS	(conclusão)
MON89034	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera	Cry1A.105 Cry2Ab2	out/09
TC1507xNK603	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera e Tolerância ao glufosinato de amônio e glifosato	Cry1F CP4 EPSPS PAT	out/09
MON89034xNK603	Resistência a insetos e tolerância ao glifosato	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4 EPSPS	nov/10
BT11xMIR162xGA21	Resistência a insetos e tolerância ao glifosato e glufosinato	Cry1Ab Vip3Aa20 PAT mEPSPS	nov/10
MON88017	Resistência a insetos da ordem Coleoptera Tolerância ao glifosato	Cry3Bb1 CP4 EPSPS	dez/10
MON89034xTC1507xNK 603	Resistência a insetos Tolerância ao glifosato e glufosinato de amônio	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4 EPSPS	dez/10
TC1507xMON810xNK60 3	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera Tolerância ao glifosato e glufosinato de amônio	Cry1F Cry1Ab PAT CP4 EPSPS	jun/11
TC1507xMON810	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera Tolerância ao glufosinato de amônio	Cry1Ab Cry1F PAT	ago/11
MON89034xMON88017	Resistência a insetos da ordem Coleoptera Tolerância ao glifosato	Cry1A.105 Cry1Ab2 Cry3Bb1 CP4 EPSPS	set/11

⁽¹⁾ Adaptado de CTNBio (2011)

Fonte: (LEITE et al, 2011)

Os primeiros milhos Bt não apresentavam resultados satisfatórios, pois os níveis de expressão dos genes nativos eram inferiores aos necessários para promover uma proteção adequada contra espécies-alvo no campo. Esta baixa concentração de proteínas Cry ocorreu

devido ao fato de existirem variações no códon para o mesmo aminoácido entre espécies, estas variações podem afetar negativamente a expressão gênica (GUSTAFSSON; GOVINDARAJAN, 2004).

Além disso, genes bacterianos possuem baixo conteúdo de C+G, contrastando com os genes de plantas (MURRAY; LOTZER; EBERLE, 1989). Por isso, para aumentar a expressão de um gene *cry* no organismo receptor, estes genes devem ser “recodificados” ao nível de nucleotídeos, não apenas aproximando o conteúdo de C+G do gene *cry* de Bt do milho, mas também mudando o códon preferencial dos aminoácidos, sendo assim, uma maior quantidade tRNAs e tRNA transferase estará disponível para ser acoplada às sequências nucleotídicas alvo (IKEMURA, 1985).

1.7.1 Produção de milho Bt

Para a produção do milho Bt, há três requisitos básicos: (1) regeneração *in vitro* do tecido vegetal que será transformado; (2) a metodologia para a inserção do gene *cry* no genoma do milho e (3) a construção gênica, dos genes *cry* e marcadores de seleção (CARNEIRO et al., 2009).

A metodologia mais usada na regeneração *in vitro* no milho é a embriogênese somática, a qual a vantagem é produzir uma estrutura bipolar que pode, teoricamente, ser germinada e regenerada em um só passo (CARNEIRO et al., 2009).

No milho, a regeneração somática pode ocorrer a partir de calos do Tipo I ou Tipo II (ARMSTRONG; GREEN, 1985). Os calos do Tipo I são compostos de dois tecidos distintos. Um tecido é duro, compacto, amarelo ou branco e normalmente capaz de regenerar plantas; o outro é granular, amarelo-pálido ou cinza-claro, translúcido e incapaz de regenerar plantas (VASIL; VASIL, 1981). Os calos descritos como do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (TOMES; SMITH, 1985). As culturas formadoras de calos do Tipo II crescem rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos facilmente regeneráveis (VASIL, 1987). Os calos do Tipo II são os mais utilizados na produção do milho transgênicos, contudo o do Tipo I também pode ser utilizado.

Existem duas metodologias diferentes para a inserção do gene *cry* no genoma do milho, a transformação genética indireta e a direta (CARNEIRO et al., 2009).

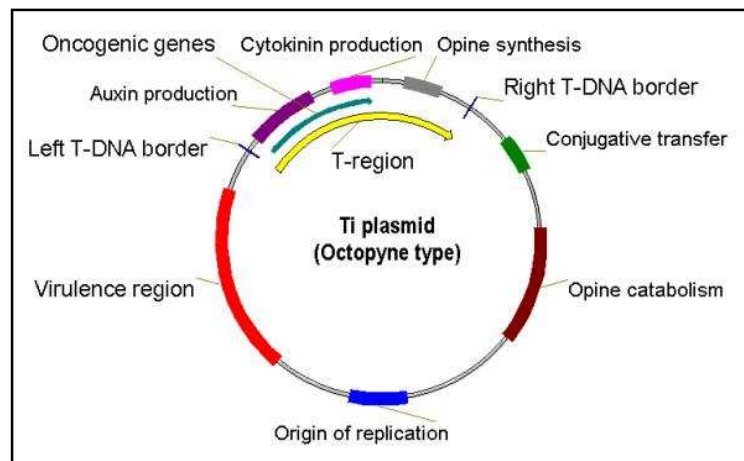
A metodologia direta envolve o bombardeamento de células vivas com o DNA de interesse. Na transformação via bombardeamento de partículas ou biobalística, micropartículas de metal (tungstênio ou ouro) cobertas com o gene de interesse são aceleradas em direção às células-alvo (aceleradas por uma faísca de alta tensão elétrica ou uma descarga de hélio), utilizando equipamentos conhecidos como “gen-gun” ou canhão genético (SANFORD et al., 1987). O DNA precipitado sobre as micropartículas é liberado gradualmente dentro da célula pós-bombardeamento e integrado no genoma (TAYLOR; FAUQUET, 2002).

As principais vantagens do bombardeamento estão relacionadas com a utilização de vetores simples e de fácil manipulação, além da possibilidade de inserção de mais de um gene de interesse nas células de maneira eficiente (WU et al., 2002).

A metodologia indireta é através da transformação via bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria possui o plasmídeo Ti, circular, dupla fita de DNA e que pode se replicar independentemente do genoma da bactéria (GELVIN, 2003).

Localizadas no plasmídeo Ti, encontram-se duas regiões importantes para a transferência de genes da bactéria para a planta: a região do T-DNA e a *vir* (Fig. 6).

Figura 6 - Principais regiões no plasmídeo nativo de *Agrobacterium*.

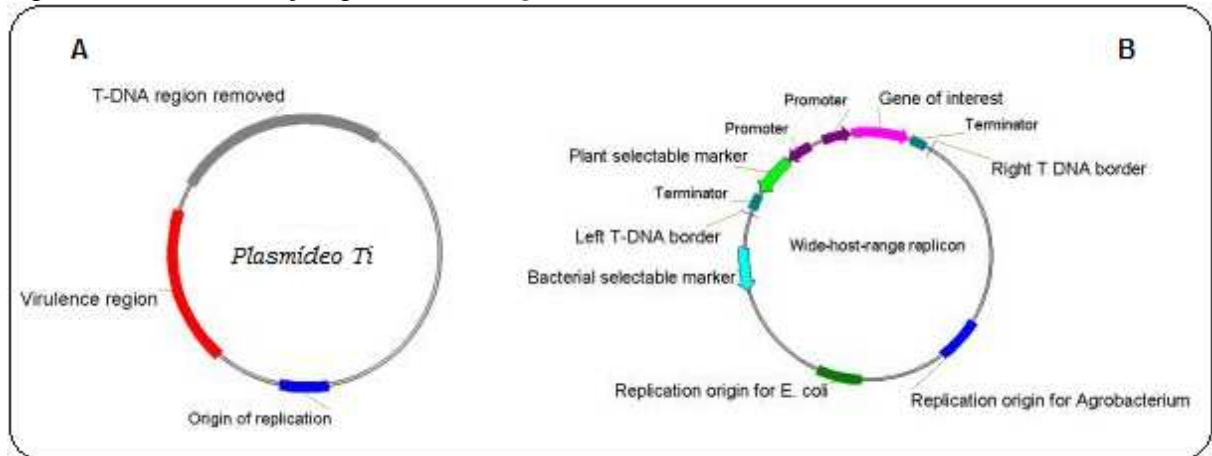


Fonte:(MAYER, 2003).

Para viabilizar a utilização da *Agrobacterium* processos biotecnológicos de transferência de genes para plantas, é necessário que os genes endógenos do T-DNA causadores de tumor sejam inativados e que os genes exógenos, genes de interesse, sejam inseridos entre as extremidades direita e esquerda do T-DNA (Fig. 7). O plasmídeo

recombinante resultante é novamente colocado no *Agrobacterium* para ser transferido para células vegetais (GELVIN, 2003).

Figura 7 - Transformação genética via *Agrobacterium*.



(A) Inativação da região T-DNA no plasmídeo Ti; (B) Inserção dos genes exógenos de interesse na região do T-DNA removido.

Fonte: Modificado de Mayer (2003).

Os genes inseridos via técnicas de biologia molecular no milho são constituídos basicamente da região codificadora do gene de interesse (gene *cry*) ou do gene marcador de seleção e das sequências reguladoras de expressão (promotores e terminadores). Os principais promotores utilizados para direcionar a expressão dos genes *cry* são: Ubiquitina e CaMV35S; já as regiões terminadoras utilizadas para finalizar a transcrição dos genes *cry* são: NOS, CaMV35S e pin II (CARNEIRO et al., 2009).

1.7.2 Efeito do milho Bt sobre as fumonisinas

O milho Bt permite reduzir o ataque de insetos em até 90%, diminuindo, consequentemente, a probabilidade de crescimento de fungos através das perfurações provocadas pelos insetos-pragas (MARQUES, 2009).

Bakan et al. (2002) encontraram baixos níveis de contaminação por fumonisia B₁ em milho Bt em relação ao milho não Bt em linhas iguais de crescimento na França e Espanha.

Outros estudos têm demonstrado a diminuição na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em milho Bt, como o trabalho de Duvick (2001), Munkvolv, Hellmich e Rice (1999) e por Papst et al. (2005). Hammond et al. (2004) verificaram diminuição nos níveis de fumonisinas em híbridos Bt contendo a proteína Cry1Ab durante o desenvolvimento da cultura em condições naturais e com infestação forçada pelos insetos *Ostrinia nubilalis* e

Diatraea grandiosella (broca européia do milho e broca do milho do sudoeste, respectivamente). Estes autores atribuem a diminuição na produção de fumonisinas pela queda da infestação dos insetos nos grãos e, conseqüentemente, manutenção da integridade dos mesmos, dificultando a entrada de fungos toxigênicos, como *Fusarium* (DUVICK, 2001).

2 PROPOSIÇÕES E OBJETIVOS

O milho é uma cultura relevante na cadeia produtiva de alimentos, sendo consumido desde *in natura* até indústria de ponta. Este cereal é importante mundial, uma vez que é amplamente cultivado e consumido em diferentes regiões do mundo. *F. verticillioides* é uma espécie fúngica altamente associada aos grãos de milho, ocasionando perda de produtividade, qualidade e conseqüentemente levando à queda na exportação, além disso, são capazes de produzir elevados níveis de fumonisinas. Alguns estudos têm relatado a diminuição na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em milho transgênico (Bt). A queda na produção de fumonisinas pode ser explicada pela redução da infestação por insetos nos grãos, conseqüentemente, impedindo o desenvolvimento do fungo no cerne do milho.

Até o presente momento não existem relatos envolvendo três genótipos de milho transgênico (Bt), em relação à contaminação fúngica e por fumonisinas nos grãos. Sendo assim, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a micobiota e a presença de fumonisinas nos diferentes genótipos de milho transgênico (Bt), comparativamente ao milho convencional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Implantação, colheita e análise do experimento

Foram analisadas 40 amostras de cada genótipo de milho, totalizando 240 amostras. Foram utilizados os genótipos 2B710 controle e 2B710 Hx, 30F35 controle e 30F35 YG, AG8088 controle e AG8088 VTPRO. Estes foram cultivados pelo Programa Milho e Sorgo IAC/APTA do Instituto Agrônomo de Campinas, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, no município de Cruzália, São Paulo. O milho foi semeado em novembro de 2010 e as amostras coletadas em março de 2011. A amostragem foi realizada segundo metodologia proposta por Delp, Stewell e Marois (1986), coletando espigas em parcelas uniformes. Para cada híbrido, foram instaladas 4 parcelas de 8 linhas e 10 m de comprimento. Foram coletadas 10 espigas de cada parcela, retiradas da 4ª linha a partir da sétima planta, totalizando 40 amostras por híbrido.

3.2 Micobiota das amostras de milho

3.2.1 Técnica da semeadura direta para o isolamento da micobiota das amostras de grãos de milho e verificação da atividade de água dos grãos

Utilizando a metodologia proposta por Berjak (1984), de cada sub-amostra (1 kg) de milho foram retirados, aproximadamente, 30 g para desinfecção em solução de hipoclorito de sódio (0,4%) por 3 minutos. Tal procedimento é utilizado para eliminação dos contaminantes externos. Após a desinfecção os grãos foram lavados, por 3 vezes, com água destilada esterilizada. Trinta e três grãos foram selecionados ao acaso e semeados diretamente em placas de Petri contendo Ágar DRBC - Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Foram utilizadas 3 placas contendo 11 grãos para cada uma das amostras. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias e os resultados expressos em porcentagem do total de grãos inoculados infectados por fungos.

As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em Ágar Batata -PDA (Oxoid) e incubadas a 25 °C por 5-7 dias. Após esse período foram submetidas à identificação em nível de gênero e mantidas em Ágar Spezieller Nährstoffarmer (SNA). Entretanto, aqueles pertencentes ao gênero *Fusarium* foram classificados até espécie, de acordo com os seguintes

compêndios: Leslie e Summerell, 2006, Nelson, Tousone Marasas 1983; Nelson, 1992 e Pitt e Hocking, 1997. A atividade de água dos grãos de milho foi determinada utilizando-se o equipamento AquaLab (Decagon, Washington, USA).

3.3. Identificação das espécies de *Fusarium* através do sequenciamento parcial do gene do Fator de Elongação 1 Alfa (TEF-1 α)

A identificação morfológica foi confirmada através do sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1- α , utilizando os *primers forward* e *reverse*, ef-1/ef-2 (\approx 650 pb), como descrito por Geiser et al., 2004.

3.3.1 Extração do DNA

Para a obtenção da biomassa fúngica, as cepas selecionadas foram semeadas em placas de Petri contendo o ágar Yes (ágar-sacarose-extrato de levedura) e incubadas por 5 dias a 25 °C. Após esse período, os micélios das placas foram retirados, acondicionados em microtubos de 1,5 mL e mantidos à -20°C. Posteriormente, o DNA genômico das cepas de *F. verticillioides* foi extraído conforme o manual de instruções do *kit Easy-DNA* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

O micélio obtido foi macerado em gral e pistilo previamente esterilizados, transferido para microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 350 μ L da solução A e o conteúdo incubado a 65 °C por 15 minutos. Foram adicionados 150 μ L da solução B, em seguida, 500 μ L de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos, posteriormente, a fase superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 1 mL de etanol absoluto (-20 °C) e mantidas por 1 hora em gelo. As amostras foram submetidas à centrifugação (14000 rpm/ 15 minutos) e o etanol removido, foram lavadas com etanol 80% (-20 °C) duas vezes e em seguida mantidas 5 minutos à temperatura ambiente.

O resíduo de DNA das amostras foi ressuspenso em 100 μ L de tampão de eluição (TE) e 2 μ L de RNase (2 mg/mL), incubado a 37 °C por 30 minutos e mantido a -20 °C até a utilização. A quantificação e a verificação do grau de pureza das amostras foram realizadas em Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) e a concentração dada em ng/ μ L.

3.3.2 Amplificação do fragmento parcial do gene TEF-1 α

O fragmento de aproximadamente 650 pb foi amplificado em termociclador *Applied Biosystems^R GeneAmp^R PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando-se os iniciadores conforme descrito por Geisen et al.(2004). O volume total da reação foi de 25 μ L, utilizando-se *buffer* 2,5 μ L, 1,25 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM, 0,2 μ L dNTP a 25 mM, 0,63 μ L de cada iniciadores a 10 μ M ; 0,13 μ L de Taq DNA polimerase a 0,04 U/ μ L; 1,5 μ L do DNA concentrado e 18,16 μ L de água ultra pura. Os parâmetros da amplificação foram: 94 °C a 5 minutos para a desnaturação inicial, 35 ciclos a 94 °C (30 segundos), 58 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto) e um ciclo adicional de 72 °C por 7 minutos (extensão final).

Os produtos da reação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (2%) com TBE 0,5x e corados com *Sybersafe DNA gel stain* (Invitrogen). O marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb *DNA ladder* (Invitrogen). A presença das bandas foi visualizada pela exposição dos géis à luz UV e fotografados por fotodocumentador *Doc Print* (Vilber Lourmat Biosystems, Paris, France).

3.3.3 Purificação do fragmento

O fragmento gerado foi purificado utilizando o kit para purificação *ExoSAP-IT* (Affymetrix Inc., Cleveland, Ohio, USA). Foram adicionados 5 μ L do fragmento de DNA (20 a 40 ng) com 2 μ L de *ExoSAP-IT* em um microtubo de 0,2 mL e colocadas no termociclador *Applied Biosystems^R GeneAmp^R PCR System 9700* com as seguintes condições: 37 °C por 15 minutos e 80 °C por 15 minutos.

3.3.4 Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmp^R9700*, utilizando 2 μ L do *BigDye Terminator v3.3*. (Applied Biosystems), 2 μ L do tampão para BigDye, 1 μ L do iniciador (5 μ M), 4 μ L de água ultra pura esterilizada e 1 μ L de DNA (20 a 40 ng). As condições da reação foram: 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 96 °C por 20 segundos, 55 °C (30 segundos) e 60 °C (4 minutos).

Após a reação, as amostras foram purificadas utilizando 40 μ L de isopropanol 60%, em seguida, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 3000 rpm

(30 minutos), o sobrenadante foi descartado e 150 μ L de etanol 65% adicionados. O material foi centrifugado novamente a 3800 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado, este último passo foi repetido mais uma vez e, em seguida, o tubo foi seco no *Speed Vacuum* (Eppendorf, Mount Laurel, New Jersey, USA).

As amostras foram ressuspensas em formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems), desnaturadas a 95 °C por 2 minutos e incubadas em gelo por 1 minuto. Em seguida foram aplicadas às colunas capilares contendo o polímero POP6 no sequenciador automático *Abi Prism^R Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

As sequências foram editadas utilizando o software *BioEdit* v7.1.3 e posteriormente alinhadas com o Blast do banco de dados *Fusarium* ID v1.0 (<http://isolate.fusariumdb.org>) (Geiser et al., 2004).

3.4 Metodologia analítica para determinação de fumonisinas B₁ e B₂

O método foi avaliado de acordo com os seguintes parâmetros: recuperação e limite de quantificação.

3.4.1 Construção da curva de calibração

Foram construídas duas curvas de calibração (Tabelas 2 e 3), para serem utilizadas na determinação dos limites de quantificação para as FB₁ e FB₂ tanto nas análises de fumonisinas das amostras de milho quanto para as amostras de milho artificialmente contaminadas por *F. verticillioides*.

As soluções padrão de FB₁ e FB₂ foram preparadas em acetonitrila:água (50:50, v/v) com uma concentração de 50 μ g/mL para FB₁ e FB₂. Foram pipetados 400 μ L desta solução padrão de fumonisinas para um balão volumétrico de 5 mL para diluição com acetonitrila:água (50:50, v/v). As soluções foram agitadas para a obtenção de uma concentração de 10 μ g/mL para FB₁ e FB₂. Foram preparadas oito soluções em balões volumétricos de 5 mL diluídas em acetonitrila:água (50:50, v/v) (Tabelas 2 e 3) para a realização das curvas de calibração e verificação da linearidade. As soluções tiveram limites variando entre 0,039 – 10,0 μ g/mL para FB₁ e FB₂. O coeficiente de correlação da curva de calibração 1 para FB₁ e FB₂ foi de 0,9997; já para a curva de calibração 2 foi de 0,9919 para FB₁ e 0,9958 para FB₂.

Tabela 2 - Concentração das soluções para a curva de calibração – Curva de calibração 1.

Soluções padrão	Concentração de FB₁ e FB₂ em µg/mL
1	0,3125
2	0,625
3	1,25
4	2,5
5	5,0
6	10,0

Tabela 3 - Concentração das soluções para a curva de calibração – Curva de calibração 2.

Soluções padrão	Concentração de FB₁ e FB₂ em µg/mL
1	0,039
2	0,078
3	0,156
4	0,3125

3.4.2 Avaliação da recuperação

A partir das soluções-estoque dos padrões de FB₁ e FB₂ (Romer Labs, Tulln, Austria) foram preparadas soluções na concentração de 10 µg/mL em acetonitrila:água (50:50,v/v) grau CLAE para utilização nas análises de recuperação.

O estudo da recuperação do método foi realizado pela adição de quantidades conhecidas de FB₁ e FB₂ a amostras de milho provenientes do campo com concentrações não detectáveis de fumonisinas, nas condições de nosso experimento.

Em 20 g de amostras de grãos de milho foram adicionados padrões de fumonisinas, em triplicata, nas seguintes concentrações: 15,0 µg/kg, 25,0 µg/kg, 35,0 µg/kg, 85,0 µg/kg, 150,0 µg/kg e 300,0 µg/kg para FB₁ e 15,0 µg/kg, 25,0 µg/kg, 35,0 µg/kg, 85,0 µg/kg e 150,0 µg/kg para FB₂. Em seguida, as amostras foram submetidas à metodologia adaptada de Visconti, Solfrizzo e Girolamo (2001).

3.4.3 Determinação de fumonisinas das amostras de milho

3.4.3.1 Extração das fumonisinas das amostras de milho

Foram transferidos para um frasco, 20 g de cada amostra previamente triturada e adicionados 100 mL de acetonitrila:metanol:água (25:25:50, v/v/v). Após agitação por 45 minutos, em agitador mecânico horizontal, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº 4, 12 cm). Foram pipetados 10 mL do filtrado, adicionados 40 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7,0 e agitados. Os extratos diluídos foram filtrados em papel de filtro de microfibras de 9 cm (Solcampo) e, em seguida, coletados 10 mL para a purificação em coluna de imunoafinidade.

3.4.3.2 Purificação do extrato

Após a filtração, um volume de 10 mL foi passado pela coluna de imunoafinidade-*fumonitest* (Vicom, Milford, Massachusetts, USA) com fluxo de 1 mL por minuto. Posteriormente, a coluna foi lavada com 10 mL de PBS (tampão fosfato, pH 7,0). As fumonisinas foram eluídas com 1,5 mL de metanol grau CLAE, evaporada a resíduo em banho-maria a 60 °C e mantida a -20 °C até o momento da cromatografia.

3.4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O resíduo foi redissolvido em 200 µL de acetonitrila:água (50:50, v/v). Uma alíquota de 50 µL do extrato da amostra foi diluída em 50 µL do reagente OPA (40 mg de orto-ftaldeído dissolvidos em 1 mL de metanol, diluídos em 5 mL de solução 0,1 M de tetraborato de sódio, acrescidos de 50 µL de mercaptoetanol) e mantidos à temperatura ambiente sob abrigo da luz.

A solução foi agitada por 30 segundos, e após 2 minutos da adição da solução de OPA, foi injetada no cromatógrafo líquido modelo LC-10AD, equipado com injetor e “loop” fixo de 20 µL (Shimadzu, Kyoto, Japan). Após a separação em coluna de fase reversa C-18 (5 ODS-20, 150 x 4,6 mm, Phenomenex), as fumonisinas B₁ e B₂ foram detectadas em detector de fluorescência (modelo RF-10AXL), com comprimentos de onda de 335 e 440 nm (excitação e emissão, respectivamente). Como fase móvel, foi utilizada, em modo isocrático, a solução acetonitrila:água:ácido acético (490:510:20, v/v/v). A vazão foi de 1,4 mL/min, temperatura

da coluna mantida em forno a 30 °C e a temperatura da sala de 22-23 °C, metodologia adaptada de Visconti, Solfrizzo e Girolamo (2001). A quantificação das toxinas nas amostras, quando presentes, foi feita através da fórmula proposta por Stack e Eppley (1992):

$$\text{Concentração (W) } (\mu\text{g/kg}) = \frac{P_1 \times (P) \times V_2 \times V_3}{P_2 \times V_1 \times M}$$

Onde,

W = concentração da amostra ($\mu\text{g/Kg}$) **P₁** = área da amostra

(P) = concentração do padrão ($\mu\text{g/mL}$) **V₂** = volume injetado do padrão (μL)

V₃ = diluição da amostra (μL) **P₂** = área do padrão

V₁ = volume injetado da amostra (μL) **M** = amostra correspondente no extrato (g)

3.4.3.4 Determinação dos limites de quantificação para fumonisinas FB₁ e FB₂

Os limites de quantificação (LQ), menor concentração medida precisamente (CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994), foram determinados a partir da adição de quantidades decrescentes dos padrões às amostras até concentrações não detectáveis de toxinas (nas condições de nosso experimento), baseadas nas estimativas dos teores de fumonisinas no milho e do estudo da recuperação do método.

3.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos do crescimento de *Fusarium*, da produção de fumonisina B₁ e B₂ e da atividade de água das 40 amostras analisadas de cada um dos seguintes genótipos de milho: 2B710 Hx, 30F35 YG, AG8088 VTPRO, 2B710, 30F35, AG8088, sendo os 3 primeiros genótipos transgênicos e os 3 últimos seus respectivos híbridos controle, foram feitas utilizando-se o *software* SAS 9.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microbiota fúngica do milho

Análise da micobiota de 240 amostras de grãos de milho recém-colhido dos híbridos 2B710, 30F35 e AG8088 (controle e transgênico) provenientes da região de Cruzália (São Paulo), revelaram a presença de fungos filamentosos na totalidade das amostras, destacando-se *F. verticillioides* como o mais frequente.

Dos 235 isolados de *Fusarium* spp. (5 amostras de milho não apresentaram contaminação pelo fungo), 234 foram classificados como *F. verticillioides* e 1 como *F. bulbicola*.

Das 80 amostras de grãos de milho, referentes ao híbrido 2B710 (controle e transgênico - Hx) foram isolados os seguintes gêneros fúngicos em ordem decrescente de frequência: híbrido controle (Quadro B.2) - *Fusarium* (75,4%), *Penicillium* (40,52%), *Cladosporium* (3,2%), *Neurospora* (2,8%), *Trichoderma* (2,2%), levedura (1,74%), *Aspergillus* (1,73%), *Mucor* (0,45%), *Rhizopus* (0,40%), fungo não esporulado – FNE (0,23%), *Curvularia* (0,1%). Os valores de Aa variaram de 0,74 a 0,94 (média: 0,90); Híbrido transgênico- *Penicillium* (66,8%), *Fusarium* (54,5%), *Trichoderma* (12,6%), levedura (3,68%), FNE (1,36%), *Cladosporium* (0,7%), *Neurospora* (0,67%), *Acremonium* (0,08%), *Aspergillus* (0,07%). Os valores de Aa variaram de 0,93 a 0,97 (média: 0,96). Pertencentes ao gênero *Fusarium* foi identificada apenas a espécie *F. verticillioides*, nos grãos transgênico e isogênico (Quadro B.3).

Das 80 amostras de grãos de milho do híbrido 30F35 (controle e transgênico - YG), foram isolados os seguintes gêneros fúngicos em ordem decrescente de frequência- híbrido controle: *Fusarium* (91,8%), *Penicillium* (40,7%), *Trichoderma* (10,2%) *Cladosporium* (4,7%), *Aspergillus* (1,4%), *Mucor* (1,4%), *Rhizopus* (0,15%), *Alternaria* (0,08%). Os níveis de Aa variaram de 0,87 a 0,98, com média de 0,93 (Quadro B.4). Híbrido transgênico: *Fusarium* (84,1%), *Penicillium* (34,7%), *Trichoderma* (5,2%) *Cladosporium* (2,3%), *Neurospora* (1,7%), *Aspergillus* (0,9%), *Mucor* (0,2%), *Rhizopus* (0,08%). Os níveis de Aa variaram de 0,92 a 0,97, média: 0,95 (Quadro B.5).

Dentro do gênero *Fusarium*, as espécies isoladas foram: *F. verticillioides* e *F. bulbicola* (amostra 19 – híbrido 30F35 controle). De acordo com Leslie e Summerel (2006) a espécie *F. bulbicola* está associada ao apodrecimento do bulbo das plantas e tem sido isolada principalmente de flores como narciso (*Narcissus* sp.) e nerine (*Nerine* sp.).

Com relação as 80 amostras do híbrido AG8088 (controle e transgênico – VTPRO), observou-se a presença dos seguintes fungos no grupo controle: *Fusarium* (59,5%), *Penicillium* (30,1%), *Neurospora* (17%), *Trichoderma* (10,9%), *Cladosporium* (1,4%), *Aspergillus* (1,1%), *Mucor* (1,1%), *Rhizopus* (0,8%), levedura (0,7%). Os valores de Aa variaram de 0,87 a 0,96, com média de 0,91 (Quadro B.6). Transgênico - *Fusarium* (81,5%), *Penicillium* (17,8%), *Neurospora* (4,6%), *Trichoderma* (3,3%), *Mucor* (1,8%), *Aspergillus* (0,8%), *Cladosporium* (0,3%), FNE (0,08%). Os níveis de Aa variaram de 0,86 a 0,93, com média de 0,91. Dentro do gênero *Fusarium*, constatou-se somente o isolamento da espécie *F. verticillioides* (Quadro B.7).

A cultura do milho é susceptível à contaminação e proliferação por diversos micro-organismos, principalmente por fungos toxigênicos. Dentre estes, os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os mais importantes do ponto de vista micotoxigênico, são os mais isolados nos grãos de milho. Estes fungos são provenientes da poeira, da água, das plantas infectadas, de insetos, do solo, de dejetos orgânicos de animais e de fertilizantes; entretanto, o ar e o solo, são as principais vias de dispersão utilizadas pelos fungos (ALMEIDA et al., 2002). Fatores abióticos também influenciam no crescimento fúngico e na presença de micotoxinas nos grãos. Dentre esses fatores, a atividade de água e a temperatura são consideradas os mais importantes (HURST, 2001). A contaminação por micotoxinas é um dos principais fatores que compromete a qualidade do produto (ALMEIDA et al., 2005).

A predominância de *F. verticillioides*, principal espécie produtora de fumonisinas, nos híbridos estudados, vem ao encontro dos resultados obtidos por diversos pesquisadores que citam o gênero *Fusarium* como principal contaminante de grãos de milho, podendo contaminar até 100% das amostras, dependendo do lote (MILLS, 1989). Estudos realizados no Brasil, também apontam este fungo, considerado endofítico, como o de maior frequência em grãos de milho recém-colhido e armazenado (ALMEIDA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005; HIROOKA et al., 1996; ORSI et al., 2000; POZZI et al., 1995; ROCHA et al., 2009).

Relacionando a frequência do gênero *Fusarium* com os níveis de Atividade de água (Aa), observou-se maior frequência de isolamento do fungo quando a Aa média foi de 0,93 (91,8%), no híbrido 30F35 (controle), e menor frequência quando a Aa média foi de 0,96 (54,5% - híbrido 2B710 Hx). Segundo Lacey e Magan (1991), os níveis mínimos e máximos de atividade de água para o crescimento de *F. verticillioides* variam de 0,87 e 0,98, valores que coincidem com os encontrados nos grãos estudados.

Alguns trabalhos têm demonstrado redução de *Fusarium* spp., como também da contaminação por fumonisinas em grãos de milho transgênico (MUNKVOLV; HELLMICH; RICE, 1999; PAPST et al., 2005). Os resultados demonstraram *F. verticillioides* como a espécie mais frequente tanto no Bt como no convencional.

Em nossa pesquisa observou-se, também, menor frequência fúngica nos grãos de transgênico do híbrido 30F35 (Fig. 8). A tecnologia utilizada nesse híbrido, capaz de expressar as proteínas cry1Ab (YG – 30F35), está envolvida com a morte dos insetos na fase adulta. A menor frequência de *Fusarium* spp. nos grãos transgênicos (30F35 YG e 2B710 Hx) vem ao encontro dos estudos conduzidos por Dowd (2000).

Estudos realizados por Waquil et al. (2002) revelaram maior susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* (principal inseto-praga do milho), frente a tecnologia transgênica Cry1F. A tecnologia Cry1Ab (menos suscetível) apresentou uma suscetibilidade moderada. A maior suscetibilidade do inseto ao transgênico resulta em um menor dano aos grãos, conseqüentemente, uma menor contaminação fúngica no milho, uma das vias de contaminação utilizada pelos micro-organismos. Na presente pesquisa este fato pode ser constatado pela menor frequência de contaminação por *Fusarium* no híbrido 2B710 Hx (Cry1F) com redução de 21%. Por outro lado, o híbrido 30F35 YG (Cry1Ab), obteve uma redução de 8,4% (Fig. 9).

Na tecnologia transgênica VTPRO a maior frequência da contaminação de *Fusarium* (Fig.9) pode ser atribuída à baixa expressão da dose da toxina no híbrido, insuficiente para alcançar a dose letal nos insetos (morte de 99% dos insetos heterozigotos), permitindo o dano na planta e favorecendo a entrada de micro-organismos. Segundo Mendes e Waquil (2009), dependendo do híbrido de milho Bt utilizado, diferentes níveis de controle podem ser obtidos: larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com seis híbridos diferentes, com a mesma toxina Cry, apresentaram valores diferentes de sobrevivência, dependendo do híbrido. Além disso, a expressão da toxina cry na planta vai depender do híbrido, do inseto, da expressão da toxina nos diferentes tecidos vegetais e da dose da toxina (MARTINELLI; OMOTO, 2006).

Figura 8 - Porcentagem de contaminação fúngica nos híbridos 2B710, 2B710 Hx, 30F35, 30F35 YG, AG8088 e AG808 VTPRO.

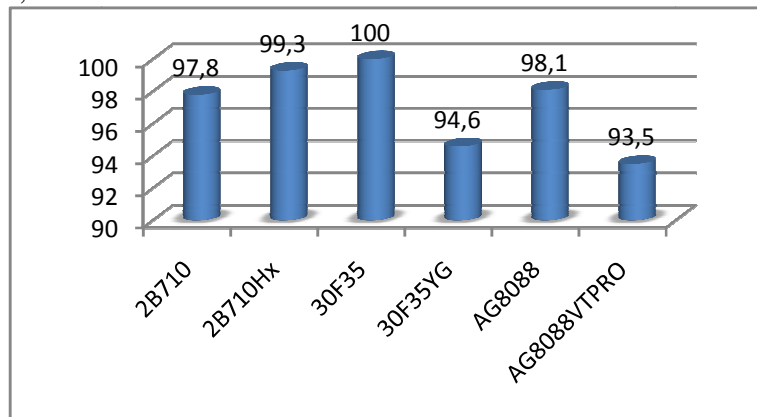
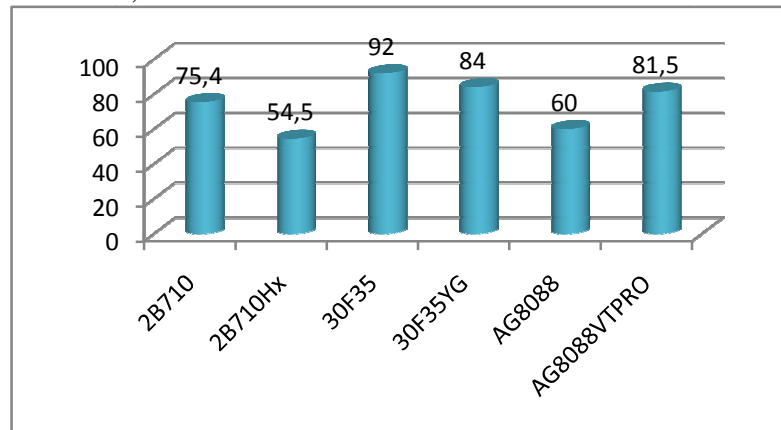
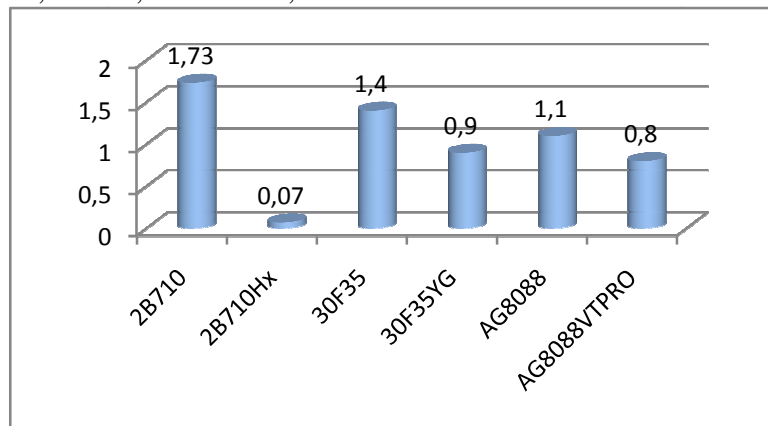


Figura 9 - Porcentagem de contaminação por *Fusarium* spp. nos híbridos 2B710, 2B710 Hx, 30F35, 30F35 YG, AG8088 e AG8088 VTPRO.



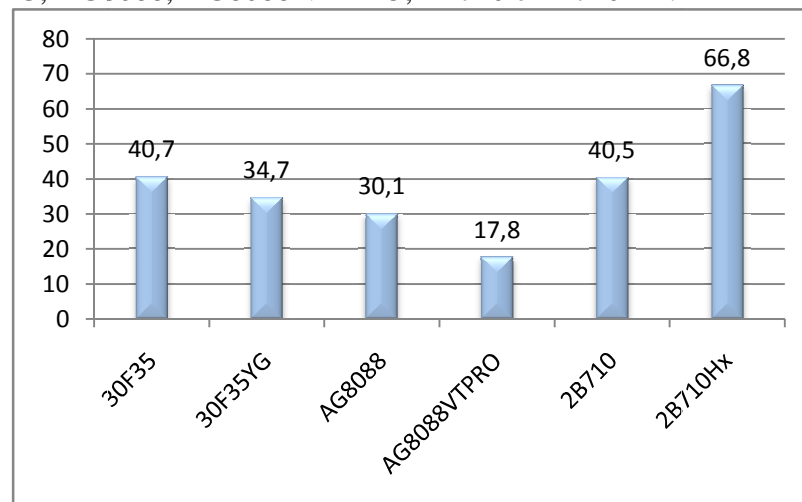
Nossos estudos também registraram a presença de *Aspergillus* spp. em todos os híbridos estudados, porém, com baixa frequência de isolamento. Estes resultados vêm ao encontro dos achados em Castro, Soares e Furlani (1995) ao estudar a microbiota em milho coletado em diferentes localidades do estado de São Paulo. Os autores constataram menor frequência do gênero *Aspergillus*. Em relação aos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*, Rocha et al. (2009) também observaram reduzida frequência do citado gênero em grãos de milho provenientes de diferentes regiões do Brasil. (Fig. 10).

Figura 10 - Porcentagem de contaminação por *Aspergillus* spp. nos híbridos 2B710, 2B710 Hx, 30F35, 30F35 YG, AG8088 e AG8088 VTPRO.



A redução da contaminação por *Penicillium* spp. na tecnologia transgênica YG e VTPRO, comparativamente com seus respectivos controles, é um fator relevante nesse estudo, apesar da tecnologia transgênica Hx não apresentar os mesmos resultados que as outras tecnologias. (Fig. 11).

Figura 11 - Porcentagem de contaminação por *Penicillium* spp. nos híbridos 30F35, 30F35 YG, AG8088, AG8088 VTPRO, 2B710 e 2B710 Hx.



O emprego de técnicas morfológicas clássicas (macro e micromorfológicas) possibilitou a identificação de *F. verticillioides* na maioria dos isolados. Microscopicamente, foram observados conídios em cadeia longa e em falsa cabeça, além de e conidióforos em monofiálides. Apenas um isolado (amostra 19, híbrido 30F35), identificado como *F. subglutinans*, apresentou conidióforos em mono e polifiálides e conídios aglomerados em falsa cabeça.

Para a confirmação dos resultados obtidos na análise morfológica, os isolados foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene do fator de alongação 1- α .

O gene do fator de alongação 1- α codifica uma parte essencial da proteína da maquinaria de translação e tem grande utilidade filogenética, já que é altamente informativo em nível de espécie para *Fusarium*. Até o momento nenhuma cópia não-ortóloga do gene foi descrita. Este gene é de cópia única e possui alto nível de polimorfismo entre as espécies relacionadas. Por esta razão se tornou um marcador de escolha como ferramenta de identificação das espécies de *Fusarium* (GEISER et al., 2004). Neste trabalho, esse marcador demonstrou-se mais uma vez muito útil para confirmação da identidade das espécies de *Fusarium* isoladas dos diferentes híbridos. Dos 235 analisados pela técnica de sequenciamento, observou-se divergência com a identificação morfológica em apenas um isolado (isolado 19 – híbrido 30F35), inicialmente classificado como *F. subglutinans*. Através do sequenciamento parcial de TEF-1 α , este isolado foi identificado como *F. bulbicola*. De acordo com Leslie e Summerell (2006), *F. bulbicola* é comumente identificada morfológicamente como *F. sacchari* ou *F. subglutinans*, e a diferenciação é facilitada através de técnicas moleculares.

4.2 Avaliação da metodologia analítica para determinação das fumonisinas B₁ e B₂

As curvas padrão apresentaram-se lineares nas faixas de concentrações variando de 0,3125 a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelas 2 e 3). Os coeficientes de correlação também foram considerados satisfatórios, já que todos os valores foram maiores que 0,99.

A recuperação do método foi testada em triplicata, a partir de amostras artificialmente contaminadas com FB₁ e FB₂, em diferentes níveis de contaminação (Quadros 1 e 2).

Os testes de recuperação apresentaram resultados variando de 81,35% (concentração de 300,0 $\mu\text{g/kg}$) a 109,13% (25,0 $\mu\text{g/kg}$) para FB₁. O maior valor de Desvio Padrão Relativo (DPR) foi de 13,86% para a concentração de 15,0 $\mu\text{g/kg}$, demonstrando que quanto menores os níveis de FB₁, maior a diferença entre as determinações (Quadro 1).

Com relação à FB₂, os valores de recuperação variaram de 85,39% (15,0 $\mu\text{g/kg}$) a 99,72% (25,0 $\mu\text{g/kg}$), sendo que o maior valor de DPR foi de 11,63% para a concentração de 35,0 $\mu\text{g/kg}$ (Quadro 2).

O limite de quantificação (LQ) para FB₁, na concentração de 25,0 $\mu\text{g/kg}$, apresentou recuperação média de 109,13% e DPR de 6,67%. Posteriormente, o emprego da concentração de 15,0 $\mu\text{g/kg}$, revelou recuperação média de 92,83% e o DPR 13,86%. A partir destes

resultados, a concentração de 15,0 µg/kg foi considerado como LQ para FB₁. Para a fumonisina B₂, na mesma concentração (15,0 µg/kg), a recuperação média foi de 85,39% e DPR de 6,87%, valores considerados satisfatórios.

Quadro 1- Avaliação da recuperação para FB₁.

Parâmetros	Concentração (µg/Kg)	Média (µg/Kg)	Recuperação média (%)
Recuperação (Exatidão)	15,0	13,92	92,83
	25,0	27,32	109,13
	35,0	32,76	93,70
	85,0	77,10	90,67
	150,0	146,0	97,33
	300,0	244,0	81,35
Repetitividade (Precisão)	Concentração (µg/Kg)	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)
	15,0	1,93	13,86
	25,0	1,82	6,66
	35,0	2,99	9,13
	85,0	5,89	7,64
	150,0	17,15	11,74
	300,0	28,27	11,59

Quadro 2 - Avaliação da recuperação para FB₂.

Parâmetros	Concentração (µg/Kg)	Média (µg/Kg)	Recuperação média (%)
Recuperação (Exatidão)	15,0	12,80	85,39
	25,0	24,90	99,72
	35,0	32,70	93,43
	85,0	83,90	98,68
	150,0	148,0	98,26
	Repetitividade (Precisão)	Concentração (µg/Kg)	Desvio Padrão
15,0		0,88	6,87
25,0		0,125	0,5
35,0		3,8	11,63
85,0		0,33	0,39
150,0		0,70	0,48

4.3 Determinação das fumonisinas nos grãos de milho

Análises micotoxicológicas das 240 amostras de grãos de milho (transgênicos e convencionais) revelaram a presença de FB₁ em 222 (92,5%) amostras e FB₂ em 113 (47,1%). Tais dados vêm ao encontro de outros pesquisadores (HASSEGAWA et al., 2008; ROCHA et al., 2009; TSENG; LIU, 2001), que também observaram alta contaminação por FB₁ nos grãos de milho convencional. Em relação ao milho transgênico, os estudos realizados mencionam

diminuição na frequência de contaminação e dos níveis de contaminação por FB₁ (FOLCHER et al., 2010; HAMMOND et al., 2004; MUNKVOLD et al, 1999).

Das amostras contaminadas com fumonisinas, 71 (29,6%) excederam o limite máximo permitido pela legislação brasileira (2000 µg/Kg), para a somatória das fumonisinas B₁ + B₂. (BRASIL, 2011).

Na tecnologia transgênica 30F35 YG, todas as amostras analisadas estavam contaminadas com FB₁ e 26 (65%) com FB₂. A concentração de FB₁ variou de 17,91 a 1028,80 µg/Kg e de FB₂ entre 16,03 a 6156,53 µg/Kg. Já no seu respectivo controle (30F35), a presença de FB₁ foi registrada em 100% das amostras e de FB₂ em 47,5% delas. A concentração de FB₁ variou de 35,39 a 4307,64 µg/Kg e de FB₂ entre 19,72 e 2710,23 µg/Kg (Quadro B.8).

Na tecnologia transgênica AG8088 VTRO, das 40 amostras analisadas, 27 (67,5%) apresentaram contaminação por FB₁ e 16 (40%) por FB₂. Os níveis variaram de 17,64 a 14024,58 µg/Kg (FB₁) e entre 16,92-7869,73 µg/Kg (FB₂). Já no seu respectivo controle (AG8088), a presença de FB₁ e FB₂ foi constatada em 38 (95%) e 17 (42,5%) das amostras, respectivamente. Os níveis de FB₁ variaram de 15,74 a 13576,39 µg/Kg e de FB₂ entre 77,05 e 7270,71 µg/Kg (Quadro B.9).

Na tecnologia transgênica 2B710 Hx, 38 (95%) das amostras apresentaram contaminação por FB₁ e 20 (50%) por FB₂. A concentração de FB₁ variou de 23,51 a 5111,33 µg/Kg e de FB₂ entre 17,70 e 2083,49 µg/Kg. Já no grupo controle (2B710), FB₁ foi detectada em 39 (97,5%) amostras e FB₂ em 15 (37,5%) das amostras analisadas. A concentração de FB₁ variou de 22,34 a 3346,05 µg/Kg e de FB₂ entre 17,70 a 2083,49 µg/Kg (Quadro B.10).

4.4 Análise estatística dos resultados

4.4.1 Análise exploratória

A Tabela A.1 apresenta estatísticas descritivas para a variável atividade de água. Pode-se observar que, em geral, a atividade de água foi elevada e resultou em médias amostrais iguais ou acima de 0,9, em todos os genótipos de milho. Também não houve variação nos valores de atividade de água entre os genótipos transgênicos e não transgênicos.

Análise estatística descritiva para a variável crescimento de *Fusarium* apresentada na Tabela A.2, revela comportamento distinto nos diferentes genótipos estudados. Nos genótipos

2B710 e 30F35 a variedade transgênica revelou, em geral, menor crescimento de *Fusarium* do que a variedade não transgênica. Por outro lado, para o genótipo AG8088, a variedade transgênica apresentou, em geral, maior crescimento de *Fusarium* do que a variedade não transgênica. Para o genótipo 2B710, por exemplo, a variedade transgênica apresentou média amostral de 54,5%, mediana de 50,0% e terceiro quartil de 75,8%, enquanto na variedade não transgênica, esses números são, respectivamente, 75,4%, 84,8% e 100,0%.

Análise estatística descritiva para as variáveis relacionadas à produção de fumonisina (Tabelas A.3 a A.5), nos genótipos 2B710 e 30F35, revelou médias amostrais bem maiores nas variedades transgênicas do que nas variedades não transgênicas. No entanto, se observarmos as demais medidas, podemos notar que as médias amostrais da produção de fumonisina são maiores nas variedades transgênicas, principalmente devido à ocorrência de amostras com níveis elevados de fumonisina. Nesses genótipos, os valores máximos observados nas variedades transgênicas são consideravelmente maiores que os observados nas variedades não transgênicas. Já o primeiro quartil amostral, por exemplo, na variedade transgênica é, nesses genótipos, igual ou inferior ao observado na variedade não transgênica. Para o genótipo AG8088, as médias amostrais são próximas nas variedades transgênicas e não transgênicas. No entanto, assim como nos demais genótipos, os valores máximos observados são bem maiores na variedade transgênica do que na variedade não transgênica. O terceiro quartil amostral, por exemplo, foi consideravelmente menor na variedade transgênica do que na variedade não transgênica (830 µg/kg no primeiro e 1388 µg/kg no último).

A Tabela A.6 apresenta frequência relativa de amostras de milho positivas para fumonisinas (FB₁ + FB₂) com níveis acima do permitido pela legislação brasileira. Parece não haver indícios de que a frequência de amostras positivas para fumonisina varie entre as variedades transgênicas e não transgênicas. No genótipo AG8080, por exemplo, o percentual de amostras obtidas que tinham fumonisina acima do permitido pela legislação é de 25% na variedade não transgênica e 22,5% na variedade transgênica.

4.4.2 Análise inferencial

Tendo em vista os elevados níveis de atividade de água das amostras (0,90 a 0,96) e a baixa variabilidade entre elas, como pode ser visto na Tabela A.1, consideramos desnecessário incluir essa variável na comparação do crescimento de *Fusarium* spp. e na produção de fumonisina entre as variedades transgênicas e não transgênicas. Para confirmar

essa suspeita, empregou-se a correlação de *Spearman* (GIBBONS; CHAKRABORTI, 2003) entre a atividade de água, o crescimento de *Fusarium* e a produção de fumonisina, para cada um dos híbridos analisados (Tabela A.7). Constatou-se que 100% das correlações foram baixas e inferiores, em módulo, a 0,43, porém, 16 das 18 correlações foram inferiores, em módulo, a 0,3. Tais resultados sugerem que pequenas variações na atividade de água não afetaram consideravelmente o crescimento de *Fusarium* e a produção de fumonisina nos híbridos de milho analisados. Dessa forma, foram utilizadas nas comparações do crescimento de *Fusarium* e produção de fumonisina, testes para comparações de duas populações para amostras independentes (BUSSAB; MORETTIN, 2011). Esses testes e todos os demais utilizados neste trabalho consideraram um nível de significância de 5%.

O teste mais simples de comparação entre duas populações independente é o teste t. (BUSSAB; MORETTIN, 2011). Esse teste supõe que a variável de interesse tenha distribuição normal. Para cada uma das variáveis de interesse em cada um dos genótipos analisados, utilizou-se o teste de Anderson-Darling (STEPHENS, 1986), quando a variável em estudo revela distribuição normal. Em quase todos os casos, a hipótese de normalidade foi rejeitada e, portanto, o teste t para duas amostras independentes não foi utilizado. Empregou-se, então, o teste de Mann-Whitney (BUSSAB; MORETTIN, 2011).

A Tabela A.8 apresenta os resultados dos testes de Mann-Whitney para as variáveis de crescimento de *Fusarium* e produção de fumonisina. Em relação ao crescimento de *Fusarium*, conforme esperado pelos resultados da análise descritiva, para os três genótipos de milho analisados, houve diferença entre as variedades transgênicas e não transgênicas. Para a variedade transgênica dos genótipos 2B710 ($p = 0,003$) e 30F35 ($p = 0,029$), constatou-se tendência de menor crescimento de *Fusarium*, comparativamente a variedade não transgênica. Já para a variedade transgênica do genótipo AG8088 houve tendência de maior crescimento de *Fusarium* comparativamente a variedade não transgênica ($p = 0,003$).

As demais colunas da Tabela A.8 apresentam os resultados dos testes de Mann-Whitney para as variáveis de produção de fumonisina. Nos genótipos 2B710 ($p > 0,22$ em todos os casos) e 30F35 ($p = 0,065$ para a produção de fumonisina B_2 e $p > 0,3$ nos demais casos) não houve indícios de variação entre a produção de fumonisina B_1 , B_2 e total e as variedades de milho transgênica e não transgênica. Já para variedade transgênica do genótipo AG8088 houve tendência de menor produção de fumonisina B_1 ($p = 0,023$) e menor produção de fumonisina total ($p = 0,017$) comparativamente a variedade não transgênica. Porém, não houve indícios de variação na produção de fumonisina B_2 entre as variedades transgênica e

não transgênica do genótipo AG8088 ($p = 0,610$). Curiosamente, a variedade transgênica do genótipo AG8088 foi aquela com maior tendência de crescimento de *Fusarium*. Dessa forma, para a variedade transgênica do genótipo AG8088, houve tendência de maior crescimento de *Fusarium* e menor produção de fumonisina B₁ e total do que a variedade não transgênica.

A tecnologia transgênica no milho Bt tem efeito direto somente nos insetos-praga, a contaminação por *Fusarium* e a produção de fumonisinas são efeitos indiretos. Isto pode ser observado na tecnologia transgênica Hx e YG, não existindo indícios de que a distribuição da produção de fumonisina B₁, B₂ e total varie entre a variedade de milho transgênica e não transgênica já no VTPRO somente a FB₁ teve uma menor redução no transgênico. Estudo realizado por Clements et al. (2003) não revelou variação no dano no grão causado pelo *Fusarium* e produção de fumonisinas tanto no controle (RX697) como no transgênico (RX697 YG).

Testou-se a probabilidade de uma amostra de milho divergir-se entre as variedades transgênicas e não transgênicas nas concentrações de fumonisinas superiores ao permitido pela legislação brasileira. Para isso utilizou-se o teste de homogeneidade (BUSSAB; MORETTIN, 2011) e os resultados estão apresentados na Tabela A.9. Em todos os três genótipos de milho analisados, não houve indícios de variação entre as variedades transgênicas e não transgênicas ($p > 0,31$ nos três genótipos).

5 CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu chegar às seguintes conclusões:

- o gênero *Fusarium* foi isolado em todos os híbridos, sendo a espécie *F. verticillioides* a mais predominante;
- a tecnologia transgênica apresentou menor frequência de contaminação fúngica, comparativamente à tecnologia convencional nos híbridos 30F35 e AG8088;
- a utilização do gene do fator de alongação 1- α para confirmação da identidade das espécies de *Fusarium* demonstrou-se adequada, permitindo uma correlação de aproximadamente 99,4% com identificação morfológica clássica;
- para os genótipos 2B710 e 30F35, a variedade transgênica tende a ter menor crescimento de *Fusarium* do que a variedade não transgênica;
- no genótipo AG8088, a variedade transgênica tende a ter maior crescimento de *Fusarium* do que a variedade não transgênica;
- para o genótipo AG8088, a variedade transgênica obteve menor produção de fumonisina B₁ e total comparativamente a variedade não transgênica, mas não são diferentes em relação à produção de fumonisina B₂;
- nos genótipos 2B710 e 30F35, não ocorreu variação na produção de fumonisina B₁, B₂ e total entre a variedade de milho transgênica e controle;
- em todos os 3 genótipos de milho analisados, não constatou-se diferença estatística, em relação a presença de fumonisinas nas amostras de milho transgênico e controle superiores as permitidas pela legislação brasileira.
- os níveis de fumonisinas detectados nas amostras analisadas (transgênica e controle) foram, em sua maioria, inferiores aos permitidos pela legislação brasileira.

REFERÊNCIAS*

- ABADO-BECOGNEE, K. et al. Cytotoxicity of fumonisin B₁: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA synthesis. **Arch. Toxicol.**, v.72, p. 233-236, 1998.
- AGUIAR, R. W. S. **Estudo de proteínas (Cry) recombinants de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto.** 2007. 109 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- ALMEIDA, A. P. et al. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Journal Brazilian Society Microbiology**, v. 31, p. 321-326, 2000.
- ALMEIDA, A. P. et al. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3877-3882, 2002.
- ALMEIDA, A. P. et al. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de micoproteínas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, p. 1-9, 2005.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.**, v. 50, p. 1-24, 1986.
- ARANTES, O.; LERECLUS, D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene**, v. 108, p. 2647-2651, 1991.
- ARMOLIK, N.; DICKSON, J. G. Minimum humidity requirements for germination of conidia associated with storage of grain. In: PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Springer, 2009. p. 121.
- ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.
- BAKAN, B. et al. Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetic modified maize grown in France and Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 728-731, 2002.
- BENSON, G. O.; PEARCE, R. B. Corn perspective and culture. In: WATSON, S. A. et al. **Corn: chemistry and technology**. St. Paul: Elsevier, 1987. p. 1-28.
- 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.

*De acordo com:

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

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun**, v. 11, p. 743-745, 1988.

BIANCO, R. Manejo de pragas do milho em plantio direto. In: INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO (Org.). **Encontro de fitossanidade de grãos**. Campinas: Emopi Editora e Gráfica, 2005. p. 8-17.

BOTTINI, A. T.; GILCHRIST, D. G. Phytotoxins. I. A. 1-aminodimethylheptadecapentol from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n.29, p. 2719-2722, 1981.

BOURGOUIN, C. et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 3575-3583, 1988.

BRASIL. Resolução – RDC nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72-73.

BRAVO, A. et al. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 68, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A. et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1667, p. 38-46, 2004.

BRAVO, A., S. et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 41, p: 423–431, 2011.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potencial for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, 2007.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística Básica**, 7 Ed. Saraiva: São Paulo, 2011.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 247-251, 1995.

CANADIAN BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. *Helicoverpa zea*. 2003. Disponível em: http://www.cbif.gc.ca/spp_pages/noctuoidea/jpgs/image_e.php?image%5B%5D=111095.jpg%20Helicoverpa+zea. Acesso em: 08 jan. 2013.

CANTARELLA, H. Calagem e adubação do milho. In: BULL, L.T. & CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: Fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 147-196.

CARNEIRO, A. A. et al. Milho Bt: Teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos praga. **Embrapa milho e sorgo**, Sete Lagoas, 2009. 26 p. (Circular Técnica, 135).

CARVALHO, R. L. P. Pragas do milho. In PATERNIANI, E. (Ed.). **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: Fundação Cargill, 1980. p.505-570.

CASA, R.T.; REIS, E.M. Doenças na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADONETO, D. (Ed.). **Milho: estratégias de manejo e alta produtividade**. Piracicaba: Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento da Produção Vegetal, 2003. p. 1-18.

CASTRO, A. P. Perspectivas da utilização do gene *bt* para o controle de insetos-praga do arroz no Brasil. **Embrapa arroz e feijão**. Santo Antônio de Goiás, 2008. 23 p. (Documentos, 232).

CASTRO, M. F. P. M.; SOARES, L. M. V.; FURLANI, R. R. Z. Mycoflora aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Rev. Microbiology**, v. 26, p. 289-295, 1995.

CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim.**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.

CLEMENTS, M. J. et al. Influence of Cry1Ab protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and *Fusarium* ear rot of corn. **Crop Sci.**, v. 43, p. 1283–1293, 2003.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBIO). **Resolução CNBS Nº 3, de 5 de março de 2008**. 2008. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11445.html>>. Acesso em: 20 nov. 2012.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBIO). **Aprovações comerciais**. 2011. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>>. Acesso em: 27 set. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Estudos de prospecção de mercado- Safra 2011/2012**. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_22_14_05_58_prospeccao_safra_2011-2012..pdf>. Acesso em: 10 dez. 2011.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Estudos de prospecção de mercado- Safra 2012/2013**. 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_11_16_41_03_prospeccao_12_13.pdf>. Acesso em: 15 set. 2012.

COSTA, R. S. et al. Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p. 27-33, 2003.

CRICKMORE, N. et al. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. 2012. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 27 mar. 2012.

CRUZ, I. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. **Embrapa milho e sorgo**, Sete Lagoas, 2007. 12 p. (Circular Técnica, 90).

- CRUZ, I. A largata do cartucho na cultura do milho. **Embrapa**, Sete Lagoas, 1995. 45p. (Circular Técnica, 21).
- CRUZ, I. Da cana ao milho. **Cultivar Grandes Culturas**, v. 11, n. 116, p. 20-23, 2009.
- CRUZ, I. Manejo de pragas na cultura do milho. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO “SAFRINHA”, 1999, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 1999. p. 27-56.
- CRUZ, I. et al. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 45, p. 293-296, 1999.
- DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bactéria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.23-40.
- DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has envolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends. Gene.**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.
- DELP, R. B.; STEWELL, L. J.; MAROIS, J. J. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. **Phytopathology**, v. 76, p. 1299-1305, 1986.
- DESJARDINS, A. E. et al. Genetic and biochemical aspects of fumonisin production. In: JACKSON, L. S. et al. **Fumonisins in food**, 1995. p. 165-173.
- DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; GORDON, T. R. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. **Mycol. Res.**, v. 104, p. 865–872, 2000.
- DILKIN, P. et al. Robotic automated clean-up for detection of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based feed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 965, p. 151-157, 2001.
- DOWD, P. F. Indirect reduction of ear molds and associated mycotoxins in *Bacillus thuringiensis* corn under controlled and open field conditions: utility and limitations. **J. Econ. Entomol.**, v. 93, p. 1669–1679, 2000.
- DUVICK, J. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. **Environm. Health Perspect.**, v. 109, p. 337-342, 2001.
- DUARTE, J. M. et al. **Eficácia de híbridos de milho Bt11 no controle de lepidópteros-praga em condições de campo sob infestação natural**. 2007. Disponível em: <<http://www.syngenta.com.br/cs/Resumo%20expandido%20milho%20Bt11.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2012.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent. Application.**, n. EP O 303 426 A2, 1998.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: PROCEEDINGS. OF XXVII ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY. FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY. 1994, Montpellier. **Anais...**Montpellier, 1994. p.184.

FOLCHER, L. et al. Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. **Agro. Sustain. Dev.**, v. 30, p. 711-719, 2010.

FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MESOAMERICAN STUDIES. **Map of Mesoamerica**. 2012. Disponível em: <<http://www.famsi.org/maps/>>. Acesso em: 25 set. 2012.

FRISVAD, J. C.; SANSON, R. A. Filamentous fungi in Foods and Feeds: Ecology spoilage and mycotoxins production. In: DILIP, K. et al., **Handbook of Applied Mycology: Food and Feeds**. New York: Marcel Dekker, 1991.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 134 p.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID V.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 473-479, 2004.

GELDERBLUM, W. C. A. et al. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1806-1811, 1988.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, 2003.

GIBBONS, J. D.; CHAKRABORTI, S. **Nonparametric statistical inference**. 4th ed. Marcel Dekker: New York, 2003.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000.350 p.

GLENN, A. E.;GOLD, S. E.; BACON, C. W. Fdb1 and Fdb2, *Fusarium verticillioides* loci necessary for detoxification of preformed antimicrobials from corn. **Mol. Plant. Microbe Interact.**, v. 15, n. 2, p.91-101, 2002.

GÓMEZ, I. et al. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 28, p. 169-173, 2007.

GROUCHUSLKI, P. et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 254, p. 447-464, 1995.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 346-353, 2004.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: ESALQ, 1998. p.383-446.

HAMMOND, B.G. et al. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. **J. Agric. Food Chem.**,v. 52, p. 1390-1397, 2004.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-64.

HASSEGAWA, R. H. et al. Influence of macro- and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. **Food Control**, v. 19, p.36-43, 2008.

HESELTIME, C. W. Conditions leading to micotoxin contamination of foods and feeds. In: RODRICKS, J. V. **Mycotoxins and other fungal related food problems**. Washington: American Chemical Society, 1976.v.149, p. 1-22.

HIROOKA, E. Y. et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, p. 173-183, 1996.

HOFMANN, C. et al. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ endotoxins is correlated with presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.85, p. 7844-7848, 1988.

HOUAISS, Antônio (Ed.). **Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2009. 1 CD-ROM.

HUGHES, P.A. et al. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 88, p. 34-39, 2005.

HURST, C. J. **Manual of environmental microbiology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2001. 1158 p.

IKEMURA, T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 2, p. 13-34, 1985.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Fumonisin B₁. In: _____ **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some traditional medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon: IARC Press, 2002. p. 301-366.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010**. 2010. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/>>. Acesso em: 02 nov. 2012.

JAMES, C. **Global status of commercialized Biotech/GM Crops: 2007**. 2007. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/37/executivesummary/default.html>>. Acesso em: 10 ago. 2012.

JOUANIN, L. et al. Transgenic plants for insect resistance – review. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11, 1998.

KNOWLES, B.H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 924, p. 509-518, 1987.

KNUDSEN, P. B. et al. Occurrence of fumonisins B₂ and B₄ in retail raisins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 2, p. 772–776, 2011.

KOZIEL, M. G. et al. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 194-200, 1993.

KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 36, p. 139-140, 1980.

LACEY, J.; MAGAN, N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water and temperature relations. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. p. 77-118.

LEIDERMAN, L. M.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milharais. **O Biólogo**, v. 19, n. 6, p. 105-113, 1953.

LEITE, N. A. et al. O milho Bt no Brasil: a situação e a evolução da resistência de insetos. **Embrapamilho e sorgo**. Sete Lagoas, 2011. 45 p. (Documentos, 133).

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

LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v. 353, n.7, p. 815-821, 1991.

LILLEHOJ, E.B.; ZUBER, M. S. Distribution of toxin-producing fungi in nature maize kernel from diverse environments. **Trop. Sci.**, v. 28, p. 19-24, 1988.

LUCCHINI, F. Biologia de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Níveis de prejuízos e avaliação toxicológica de inseticidas para o seu combate em milho**. 1977. 114 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1977.

MACHADO, A. T.; MAGNAVACA, R. **Estresse ambiental: o milho em perspectiva**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1991. p. 1-3. (Cadernos de T.A.).

MAYER, J. **Agrobacterium-mediated transformation of plants**. 2003. Disponível em: <http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/3139/version/default/part/AttachmentData/data/patentlens_techlandscape_agrobacterium.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A. **Toxigenic *Fusarium* Species**. University Park, PA: Pennsylvania State University, 1984.

- MARASAS, W. F. O. et al. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. **J. Nutr.**, v. 134, p. 711–716, 2004.
- MARQUES, D. O que você precisa saber sobre transgênicos. In: EMBRAPA. O milho Bt no Brasil: a situação e a evolução da resistência de insetos. **Embrapa milho e sorgo**. Sete Lagoas, 2011. (Documentos, 133).
- MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, p. 1167-1182, 2006.
- MARTINS, E. S. **Estudo de *Bacillus thuringiensis* ativas para inseto-praga do algodoeiro**. 2009. 158 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- MARTINS, E. S. et al. Estudo da atividade da proteína CryIIA expressa em células de insetos promissora para o controle de Bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman) e da lagarta do Cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*). **Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**, Brasília, 2005. 29 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 92).
- MELO, E. P. et al. Distribuição espacial de plantas infestadas por *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: *Noctuidae*) na cultura do milho. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 689-697, 2006.
- MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M. Uso do milho Bt no manejo integrado de lepidópteros-praga: recomendações de uso. **Embrapa milho e sorgo**, Sete Lagoas, 2009. 8 p. (Circular técnico, 170).
- MENEZES, L.; CUNHA, J.; BISINOTTO, F.; ATTIE, J. Relatório biotecnologia. **Céleres**, p. 1-7, 2011.
- MILLER, J. D. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: MILLER, J. D. et al. **Mycotoxins in grain**. St. Paul: Eagan Press, 1994. p. 19-36.
- MILLER, S. S.; REID, L. M.; HARRIS, L. J. Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. **Can. J. Bot.**, v. 85, p. 369–376. 2007.
- MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 10, p. 737-742, 1989.
- MOGENSEN, J. M. et al. Production of fumonisin B₂ and B₄ by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 2, p. 954–958, 2010.
- MONERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Embrapa meio ambiente, Jaguariúna, 2000. p.163-200.

- MOURA, P. A. A.; OLIVEIRA, A. C. S. Aspectos econômicos da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v. 6, p. 1-86, 1980.
- MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 87, p. 209-217, 1997.
- MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; RICE, L. G. Comparison of fumonisin concentration in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. **Plant Dis.**, v. 83, p. 130-138, 1999.
- MURRAY, E. E.; LOTZER, J.; EBERLE, M. mRNA transcript of several plant genes are polyadenylated at multiple sites in vivo. **Nucleic Acids Research**, v. 14, p. 2229-2240, 1989.
- MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 1169-1173, 1997.
- NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v. 117, p. 29-36, 1992.
- NELSON, P. E.; TOUSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species an illustrated manual for identification**. Pennsylvania: University Press, 1983. 193 p.
- NIRENBERG, H. Untersuchungen u'ber die morphologische und biologische Differenzierung in Die *Fusarium*-Sektion *Liseola*. In: PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Springer, 2009. p.121.
- OLIVEIRA, E; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T. **Livro de bolso: identificação e controle de doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009.
- ONO, E. Y. S. et al. Post -harvest storage of corn: effect of beginning moisture content in mycoflora and fumonisin contamination. **Food Addict. Contam.**,v. 19, p. 1081-1090, 2002.
- ORSI, R. B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvest and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, p. 75-87, 2000.
- PAPST, C. et al. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic Bt vs. non Bt maize hybrids under European corn borer pressure. **Agronomy J.**, v. 97, p. 219-224, 2005.
- PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa milho e sorgo**. Sete Lagoas, 2006. 6 p. (Circular Técnica, 75).
- PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progr. Biophys & Mol. Biol.**,v.88, p. 91-142, 2005.
- PEST AND DISEASE IMAGE LIBRARY. **Sugarcane Borer**. 2012. Disponível em: <<http://padil.gov.au/pests-and-diseases/Pest/Main/136271/506>>. Acesso em: 08 jan. 2013.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 71, p. 255–281, 2007.

PINTO, A. S.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos do milho e sorgo**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2004. 108 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Pub., Inc., 1997. 593 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Springer, 2009. 519 p.

POHL, M. E. D. et al. Microfossil evidence for pre-Columbian maize dispersals in the neotropics from San Andrés, Tabasco, Mexico. **PNAS**, v. 104, n. 6, p. 6870-6875, 2007.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C.M. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. 1982. p. 145-217.

POZZI, C. R. et al. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants**, v. 12, p. 313-319, 1995.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.

RILEY, R. T. et al. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 118, p. 105-112, 1993.

ROCHA, L. O. et al. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 5090-5193, 2009.

SAHU, S. C. et al. Peroxidation of membrane lipids and oxidative DNA damage by fumonisin B₁ in isolated rat liver nuclei. **Cancer Lett.**, v. 125, p. 117-121, 1998.

SAMAPUNDO, S. et al. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B₁ production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part II: The effect of initial headspace oxygen concentration. In: PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Springer, 2009. p. 121.

SANCHIS, V. et al. Multiplicity of δ endotoxins genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* *saizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 393-404, 1998.

SANFORD, J.; KLEIN, T.; WOLF, E.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using particle bombardment process. **Journal Part Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 62, p. 775–806, 1998.

SCOTT, P. M. Fumonisin. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 18, p. 257-270, 1993.
 SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 65, p. 1331-1334, 1999.

SHUNDO, L.; SABINO, M. Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. **Brazilian J. of Microbiol.**, v. 37, p. 164-167, 2006.

SILVA, A.G.D.A. et al. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitos e predadores. Laboratório Central de Patologia Vegetal, 1º. Tomo, Parte II, Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 622p., 1968. In: FORESTI, J. et. al. **Biologia, Seleção e Avaliação de Linhagens de *Trichogramma* spp. para o Controle da Lagarta-da-Espiga em Milho Semente.** Entomo Brasiliis, v. 5, n. 1, 2012. p. 43-48.

SILVA, M. T. B. Manejo de insetos nas culturas de milho e soja. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Org.). **Bases e técnicas de manejo de insetos.** Santa Maria: UFSM/CCR/DFS, 2000. p. 169-200.

SOLAGRO. *Maíz.* 2006. Disponível em: <http://www.solagro.com.ec/cultdet.php?vcultivo=Ma%EDz>. Acesso em: 08 jan. 2013.

STACK, M. E.; EPPLEY, R. M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 72, p. 834-837, 1992.

STEPHENS, M. A. Tests based on edf statistics, In: D'AGOSTINO, R. B.; STEPHENS, M. A. eds, **Goodness-of-fit techniques.** New York: Marcel Dekker: 1986. p. 560.

SWEELEY, C. C. Sphingolipids. In: VANCE, D. E.; VANCE, J. E. (Ed.). **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes.** Amsterdam: Elsevier Science Publ., 1991.

SYDENHAM, E. W. et al. Fumonisin contamination of commercial corn-based human food stuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 2014-2019, 1991.

SYNGENTA **Biotecnologia:** a Syngenta sempre fez primeiro. 2010. Disponível em: <http://www.syngenta.com/country/br/pt/sobresyngenta/biotecnologia/Pages/biotecnologianobrasil.aspx>. Acesso em: 20 nov. 2012.

TAYLOR, N. J.; FAUQUET, C. M. Particle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 12, p. 963-977, 2002.

TSENG, T. C.; LIU, C, Y. Occurrence of fumonisin B₁ in maize imported into Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 23-26, 2001.

TOLLESON, W. H. et al. Fumonisin B₁ induced apoptosis in culture human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide deposition. **Int. J. Oncol.**, v. 14, p. 833-843, 1999.

TOMES, D. T.; SMITH, O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 70, p. 505-509, 1985.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de micro-organismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Embrapa meio ambiente, Jaguariúna, 1998. p.102-225.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems of the improvement of cereal and grass crops. **Journal of Plant Physiology**, v. 128, p.193-218, 1987.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* X *P. purpureum* hybrid. **American Journal of Botany**, v. 68, p. 864-872, 1981.

VISCONTI, A. et al. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR-Measurements and testing projects. **Natural Toxins**, v. 3, p. 269-274, 1995.

VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column clean up: collaborative study. **Food Chemical Contaminants**, v. 84, n. 6, p. 1828-1837, 2001.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 1486-1490, 1991.

WAQUIL, J. M. et al. Atividade biológica das proteínas do Bt, Cry1A(b), e Cry1F em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (*Lepidoptera* : *Noctuidae*). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 2, p. 161-171, 2002.

WARFIELD, C. Y.; DAVIS, R. M. Importance of the husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. **Plant Disease**, v. 80, p. 208-210, 1996.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A.; HUGER, A. M. **Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land und forstwirtschaft berlin-dahlen heft**. Berlin: Paul Parey, 1986. p. 37-50.

WISEMAN, B. R.; PAINTER, R. H.; WASSOM, C. E. Detecting corn seedling differences in the greenhouse by visual classification of damage by the fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 59, n. 5, p.1211-1214, 1966.

WU, L. et al. Expression and inheritance of nine transgenes in rice. **Transgenic Research**, v. 11, p. 533-541, 2002.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81-100.

ZHANG, X. et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 9897-9902, 2006.

ZHANG, X. et al. Enhancend exocytosis of the receptor BT-R1 induced by the Cry1ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. **Comparative Biochemistry and Physiology, PartB**, v. 149, n. 4, p. 581-588, 2008.

ZHANG, Y.; DICKMAN, B. M.; JONES, C. The mycotoxin fumonisin B₁ transcriptionally activates the p21 promoter through a cis-acting element containing two Sp₁ binding sites. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 367-371, 1999.

APÊNDICE A - Tabelas

Tabela A.1 - Estatísticas descritivas para atividade de água.

Híbrido	Média	Desvio padrão	Mínimo	Quartis			Máximo
				Q1	Q2	Q3	
2B710	0,90	0,03	0,74	0,90	0,91	0,92	0,94
2B710Hx	0,96	0,01	0,93	0,95	0,96	0,96	0,97
30F35	0,93	0,03	0,87	0,91	0,93	0,95	0,98
30F35YG	0,95	0,01	0,92	0,94	0,95	0,96	0,97
AG8088	0,91	0,02	0,87	0,89	0,90	0,93	0,96
AG8088VTPRO	0,91	0,02	0,86	0,90	0,92	0,92	0,94

Tabela A.2 - Estatísticas descritivas para o crescimento de *Fusarium* em porcentagem de grãos contaminados.

Híbrido	Média	Desvio padrão	Mínimo	Quartis			Máximo
				Q1	Q2	Q3	
2B710	75,4	25,7	21,2	53,0	84,8	100,0	100,0
2B710Hx	54,5	29,7	6,0	30,3	50,0	75,8	100,0
30F35	91,8	18,7	33,3	95,4	100,0	100,0	100,0
30F35YG	84,1	21,1	33,3	74,3	95,3	100,0	100,0
AG8088	59,5	35,8	0,0	25,8	65,1	98,5	100,0
AG8088VTPRO	81,5	26,1	15,2	63,5	100,0	100,0	100,0

Tabela A.3 - Estatísticas descritivas para a produção de fumonisina B₁ (µg/kg).

Híbrido	Média	Desvio padrão	Mínimo	Quartis			Máximo
				Q1	Q2	Q3	
2B710	646	989	0	58	100	817	3346
2B710Hx	1177	1570	0	56	132	2439	5111
30F35	994	1251	35	103	256	1917	4308
30F35YG	2698	3306	18	63	570	5730	9419
AG8088	1271	2179	0	50	87	1388	6998
AG8088VTPRO	1287	2829	0	0	32	830	14025

Tabela A.4 - Estatísticas descritivas para a produção de fumonisina B₂(µg/kg).

Híbrido	Média	Desvio padrão	Mínimo	Quartis			Máximo
				Q1	Q2	Q3	
2B710	292	574	0	0	0	285	2083
2B710Hx	482	784	0	0	8	815	3421
30F35	507	789	0	0	0	1016	2710
30F35YG	1029	1445	0	0	147	1952	6157
AG8088	510	1037	0	0	0	451	4043
AG8088VTPRO	494	1438	0	0	0	127	7870

Tabela A.5 - Estatísticas descritivas para a produção de fumonisina (B₁ + B₂) em µg/kg.

Híbrido	Média	Desvio padrão	Mínimo	Quartis			Máximo
				Q1	Q2	Q3	
2B710	938	1525	0	58	100	1101	5208
2B710Hx	1659	2254	0	56	154	3289	6774
30F35	1501	2017	35	103	256	3067	6926
30F35YG	3726	4676	18	86	709	7626	15367
AG8088	1782	3154	0	55	87	1871	10093
AG8088VTPRO	1781	4172	0	0	38	1058	21894

Tabela A.6 - Frequência relativa de amostras de milho positivas para fumonisinas (FB₁ + FB₂) com níveis acima do permitido pela legislação brasileira.

Híbrido		Produção de FB		Total
		≤ 2000	> 2000	
2B710	#	31	9	40
	%	77,5%	22,5%	100,0%
2B710Hx	#	27	13	40
	%	67,5%	32,5%	100,0%
30F35	#	27	13	40
	%	67,5%	32,5%	100,0%
30F35YG	#	23	17	40
	%	57,5%	42,5%	100,0%
AG8088	#	30	10	40
	%	75,0%	25,0%	100,0%
AG8088VTPRO	#	31	9	40
	%	77,5%	22,5%	100,0%

Tabela A.7 - Correlação de *Spearman* entre a atividade de água, crescimento de *Fusarium* e produção de fumonisina B₁ e B₂.

Híbrido	Crescimento de <i>Fusarium</i>	Produção de	
		FB ₁	FB ₂
2B710	0,028	0,031	0,180
2B710Hx	0,054	-0,173	-0,232
30F35	0,165	0,232	0,271
30F35YG	0,042	0,001	0,009
AG8088	0,426	-0,064	0,116
AG8088VTPRO	-0,054	0,365	0,296

Tabela A.8 - Valores-p dos testes para comparação entre os milhos transgênicos e não transgênicos em relação ao crescimento de *Fusarium* e a produção de fumonisina.

Híbrido	Variável			
	<i>Fusarium</i>	FB ₁	FB ₂	FB
2B710	0,003	0,278	0,228	0,302
30F35	0,029	0,392	0,065	0,304
AG8088	0,003	0,023	0,610	0,017

Tabela A.9 - Valores-p dos testes para comparação entre os milhos transgênicos e não transgênicos em relação à proporção de amostras que não atendem a legislação.

Híbrido	Valor-p
2B710	0,317
30F35	0,356
AG8088	0,793

ANEXOS

ANEXO A-Figuras

Figura A.1 - Mapa da Mesoamérica.



Fonte: (FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MESOAMERICAN STUDIES, 2012)

Figura A.2 - Lagarta-do-cartucho



Fonte: (SOLAGRO, 2006)

Figura A.3 - Lagarta-da-espiga



Fonte:(CANADIAN BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2003).

Figura A.4 - Broca-do-colmo



Fonte: (PEST AND DISEASE IMAGE LIBRARY, 2012).

ANEXO B – Quadros

Quadro B.1 - Produtos derivados do milho ou que contêm seus componentes isolados ou transformados industrialmente.

Acetato de cálcio e magnésio	Grits
Adesivos (colas, pastas, mucilagens, gomas, etc)	Herbicida natural
Álcoois etílico e butílico	Inseticidas
Alimentos para bebê	Iogurtes
Alimentos congelados	Ketchup
Alumínio	Lápis de cor e de cera
Amido e glucose (mais de 40 tipos)	Licorice
Antibióticos (penicilina)	Maionese
Asbestos para materiais de condicionamento térmico	Manteiga de amendoim
Aspirina e outros medicamentos	Manufatura de papéis
Automóveis (volante, estofamento, cabeça do cilindro, pneus, acabamento de borrachas sintéticas)	Margarinas
Balas e confeitos	Molhos para saladas
Batata chips	Mostarda preparada
Baterias para veículos	Óleo comestível
Bebidas gasosas	Pães e biscoitos
Cafés e chás instantâneos	Papéis de parede
Carpets, tapetes.	Papéis e papelões, (corrugados e laminados)
Carreadores de cor em papéis, tecidos e tinta para impressão	Pastadedentes
Cereais matinais	Pigmentos
Cerveja	Plásticos degradáveis
Chiclete de goma	Polidor para sapatos
Coberturas em madeira, papel e metal	Pós para sobremesas
Combustível (etanol)	Produtos de chocolates

Copos e pratos de papel	Produtos farmacêuticos
Cosméticos	Produtos maltados
Couro acabado	Queijos ou requeijões cremosos
Cremes de barbear	Ração animal e alimentos para animais de estimação
Dextrose (utilizada desde soluções intravenosas a coberturas para bolos)	Refrigerantes
Escurecedor de couro.	Suplementos para alimentação animal (vitaminas e aminoácidos)
Explosivos – fogos de artifício	Salgadinhos tipo chips, tortillas e outros
Farinhas ou fubás de milho	Tacos e tortillas
Fibra de vidro	Tecidos egomas
Filmes fotográficos	Tinta latex
Fraldas descartáveis	Tinta para máquinas de etiquetas de preço
Frutose seca e xaropes (usados em refrigerantes, misturas alimentícias, etc)	Vegetais enlatados
Geléias e doces em conserva	Whisky
Giz para quadro negro	Xaropes

Fonte: (PAES, 2006).

Quadro B.2 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 2B710 Controle.

Amostras	Aa	% Contaminação Fúngica											
		DRBC – Híbrido 2B710											
		Total-grãos	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Mucor</i>	Levedura	FNE	<i>Curvularia</i>
1	0,90	100	87,9	3	-	6	-	-	15,2	-	-	-	-
2	0,91	100	100	-	45,5	6	-	-	-	-	12,1	-	-
3	0,91	100	42,4	-	100	6	12,1	3	-	-	-	9	-
4	0,90	100	48,5	-	81,8	-	21,2	-	-	-	-	-	-
5	0,91	100	90,9	6	12,1	-	-	-	-	9	-	-	-
6	0,91	100	96,9	-	36,4	-	3	3	-	-	-	-	-
7	0,92	100	100	-	6	12,1	-	-	-	3	-	-	-
8	0,88	100	100	-	-	9	9	-	-	-	-	-	-
9	0,91	100	78,8	-	51,5	12,1	-	-	-	-	33,3	-	-
10	0,89	100	63,6	-	48,5	-	-	-	-	-	15,2	-	-
11	0,93	100	57,6	-	72,7	3	-	-	-	-	-	-	-
12	0,93	100	39,4	-	87,9	3	3	-	-	-	-	-	-
13	0,74	100	84,8	3	84,8	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,92	100	69,7	-	84,8	-	3	-	-	-	-	-	-
15	0,90	100	81,8	-	48,4	-	3	-	-	-	-	-	-
16	0,91	100	90,9	6	54,5	-	3	-	-	-	-	-	-
17	0,91	100	100	3	9	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0,92	100	54,5	3	48,5	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0,90	100	100	9	18,2	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0,91	100	100	6	18,2	-	9	9	-	3	-	-	-
21	0,89	100	24,2	-	100	18,2	-	-	-	3	-	-	3
22	0,88	100	36,4	-	30,3	-	-	-	48,5	-	-	-	-
23	0,94	93,9	39,4	-	3	-	3	-	51,5	-	-	-	-
24	0,92	48,5	21,2	-	21,2	-	3	-	-	-	-	-	-
25	0,90	75,8	54,5	-	54,5	-	3	-	-	-	-	-	-
26	0,92	100	60,6	-	75,8	-	3	-	-	-	-	-	-
27	0,89	97	75,8	-	21,2	-	-	-	-	-	-	-	-
28	0,87	100	48,5	-	51,5	-	-	-	-	-	-	-	-
29	0,88	100	84,8	-	12,1	3	-	-	-	-	-	-	-

30	0,90	100	51,5	-	81,8	-	-	-	-	-	-	-	-
31	0,94	100	39,4	6	42,4	-	-	-	-	-	-	-	-
32	0,92	100	100	3	15,2	21,2	-	-	-	-	-	-	-
33	0,92	100	97	6	9	12,1	-	-	-	-	-	-	-
34	0,93	100	100	-	45,5	-	-	-	-	-	-	-	-
35	0,92	100	100	3	12,1	3	-	-	-	-	-	-	-
36	0,91	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	0,89	100	100	-	15,2	-	-	-	-	-	-	-	-
38	0,89	100	93,9	3	36,4	-	-	-	-	9	-	-	-
39	0,91	100	100	6	18,2	6	-	-	-	-	-	-	-
40	0,93	100	100	3	66,6	6	9	-	-	-	-	-	-
Média	0,90	97,8	75,4	1,73	40,52	3,2	2,2	0,4	2,8	0,45	1,74	0,23	0,1

*Aa: atividade de água

*FNE: fungos não esporulados

Quadro B.3 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 2B710 Hx.

Amostras	Aa	% Contaminação Fúngica									
		DRBC – Híbrido 2B710Hx									
		Total- grãos	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Neurospora</i>	Levedura	FNE	<i>Acremonium</i>
1	0,97	100	93,9	-	78,8	-	-	-	42,4	-	-
2	0,97	100	45,4	-	100	-	-	-	24,2	-	-
3	0,97	85	30,3	-	63,6	-	-	-	-	-	-
4	0,97	100	60,6	-	60,6	-	-	-	18,2	-	-
5	0,96	100	6	-	90,9	-	-	-	6	-	-
6	0,95	100	66,6	-	81,8	-	-	-	-	-	-
7	0,96	100	100	-	27,3	-	-	66,6	-	-	-
8	0,96	100	30,3	-	90,9	-	90,9	-	-	-	-
9	0,97	100	100	-	96,7	-	-	-	21,2	-	-
10	0,96	100	30,3	-	51,5	-	-	-	9	21,2	-
11	0,95	100	27,3	-	72,7	21,2	-	6	-	-	-
12	0,96	100	66,6	-	6	-	12,1	9	-	-	-
13	0,96	100	78,8	-	81,8	-	-	-	-	-	-
14	0,96	97	39,4	-	75,8	-	-	9	-	-	-
15	0,95	100	57,6	-	48,5	-	-	-	-	-	-
16	0,96	100	69,7	-	75,8	-	-	-	9	-	-

17	0,96	100	84,8	-	84,8	-	-	-	18,2	-	-
18	0,95	100	45,5	3	69,7	-	-	-	18,2	-	-
19	0,96	100	42,4	-	100	-	-	-	3	-	-
20	0,95	100	100	-	9	-	-	-	9	-	-
21	0,95	100	18,2	-	97	-	-	-	-	-	-
22	0,96	100	60,6	-	54,5	-	-	-	-	-	-
23	0,96	100	100	-	3	-	-	-	-	-	-
24	0,94	100	54,5	-	51,5	-	-	-	-	-	-
25	0,95	94	45,5	-	57,6	-	-	-	-	-	-
26	0,95	100	30,3	-	75,8	-	24,3	-	-	-	-
27	0,95	100	97	-	45,5	-	3	-	6	-	-
28	0,96	100	12,1	-	100	-	24,3	-	-	-	-
29	0,95	94	36,4	-	60,6	-	3	-	-	9	-
30	0,95	100	27,3	-	69,7	-	36,4	-	18,2	-	-
31	0,96	100	6	-	94	3	3	-	-	-	-
32	0,95	100	97	-	33,3	-	-	-	-	-	-
33	0,95	100	18,2	-	66,6	-	6	-	-	-	-
34	0,96	100	60,6	-	60,6	-	-	-	-	-	-
35	0,97	100	12,1	-	100	-	66,6	9	-	-	-
36	0,96	100	72,7	-	84,8	-	-	-	-	-	-
37	0,96	100	42,4	-	45,5	-	-	-	-	12,1	-
38	0,93	100	72,7	-	48,5	3	-	-	-	-	-
39	0,94	100	42,4	-	100	-	-	-	-	-	3
40	0,96	100	100	-	60,6	-	9	-	-	-	-
Média	0,96	99,3	54,5	0,07	66,8	0,7	12,6	0,67	3,68	1,36	0,08

* Aa: atividade de água

*FNE: fungos não esporulados

Quadro B.4 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 30F35 Controle.

Amostras	Aa	% Contaminação Fúngica								
		DRBC – Híbrido 30F35								
		Total – grãos	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Mucor</i>
1	0,98	100	100	-	6	30,3	-	-	-	-
2	0,98	100	100	3	45,5	-	3	-	-	-
3	0,98	100	97	-	57,6	-	3	-	-	-
4	0,96	100	100	-	12,1	9	-	-	-	-
5	0,95	100	33,3	3	3	27,3	100	-	-	-

6	0,96	100	100	-	66,6	15,2	12,1	3	-	-
7	0,97	100	100	-	3	-	-	-	-	-
8	0,96	100	100	-	33,3	-	-	-	-	-
9	0,95	100	100	-	-	12,1	-	-	-	-
10	0,95	100	100	-	60,6	12,1	-	-	3	-
11	0,95	100	100	3	21,2	12,1	-	-	-	-
12	0,95	100	100	-	21,2	-	-	3	-	-
13	0,92	100	100	-	18,1	12,1	-	-	-	-
14	0,94	100	100	-	15,2	-	9	-	-	-
15	0,95	100	100	-	33,3	15,2	3	-	-	-
16	0,93	100	100	-	72,7	3	-	-	-	3
17	0,92	100	100	12,1	-	-	3	-	-	-
18	0,93	100	93,9	-	69,7	-	6	-	-	-
19	0,90	100	93,9	-	36,4	-	6	-	-	-
20	0,92	100	60,6	3	21,2	9	63,6	-	-	-
21	0,93	100	93,9	6	96,9	-	-	-	-	-
22	0,90	100	100	-	42,4	3	-	-	-	-
23	0,91	100	100	-	36,4	-	-	-	-	-
24	0,91	100	96,9	-	33,3	-	-	-	-	-
25	0,91	100	88	-	81,8	6	-	-	-	-
26	0,92	100	100	-	72,7	6	-	-	-	-
27	0,91	100	100	-	48,5	-	-	-	-	54,5
28	0,90	100	100	-	48,5	-	3	-	-	-
29	0,91	100	100	-	33,3	6	-	-	-	-
30	0,89	100	36,4	-	42,4	-	57,5	-	-	-
31	0,95	100	96,9	3	42,4	-	-	-	-	-
32	0,91	100	33,3	-	45,5	-	66,6	-	-	-
33	0,93	100	84,8	-	60,6	6	-	-	-	-
34	0,93	100	63,6	6	21,2	-	60,6	-	-	-
35	0,93	100	100	3	63,6	-	-	-	-	-
36	0,94	100	100	3	48,4	-	-	-	-	-
37	0,87	100	100	-	42,4	-	-	-	-	-
38	0,93	100	100	3	63,6	-	-	-	-	-
39	0,90	100	100	-	63,6	3	12,1	-	-	-
40	0,87	100	100	6	42,4	-	-	-	-	-
Média	0,93	100	91,8	1,4	40,7	4,7	10,2	0,15	0,08	1,4

* Aa: atividade de água

Quadro B.5 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido 30F35YG.

Amostras	Aa	% Contaminação Fúngica								
		DRBC – Híbrido 30F35 YG								
		Total – grãos	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Mucor</i>
1	0,94	100	100	-	33,3	3	-	-	-	-
2	0,96	100	90,9	-	66,6	-	-	-	-	-
3	0,96	75,8	60,6	-	6	18,2	-	-	-	-
4	0,95	100	36,4	-	33,3	-	-	-	33,3	-
5	0,96	100	72,7	-	42,4	-	-	-	-	-
6	0,95	88	69,7	-	15,2	3	-	-	-	-
7	0,94	88	84,8	-	42,4	3	-	-	-	-
8	0,95	100	82	-	42,4	-	-	-	-	-
9	0,95	100	33,3	-	78,8	-	-	-	-	-
10	0,94	72,7	63,3	-	18,2	-	-	-	-	-
11	0,95	100	100	18,2	12,1	-	12,1	-	-	-
12	0,96	60,6	48,5	3	15,2	3	-	-	-	-
13	0,95	100	100	-	12,1	-	-	-	-	-
14	0,93	81,8	81,8	3	15,2	15,2	-	3	-	-
15	0,94	96,9	96,9	3	30,3	-	-	-	-	6
16	0,95	75,8	75,8	-	6	-	-	-	-	-
17	0,94	100	100	3	57,6	-	-	-	-	-
18	0,93	84,8	33,3	-	9	-	15,2	-	33,3	-
19	0,95	81,8	81,8	-	15,2	-	-	-	-	-
20	0,93	100	100	-	42,4	-	9	-	-	-
21	0,95	100	78,8	-	88	-	-	-	-	-
22	0,97	100	100	-	-	-	42,4	-	-	-
23	0,95	100	100	-	36,4	-	-	-	-	-
24	0,93	100	100	-	33,3	-	-	-	-	-
25	0,95	100	100	3	69,7	24,2	-	-	-	-
26	0,96	100	100	-	30,3	-	-	-	-	-
27	0,96	93,9	93,9	-	39,4	12,1	6	-	-	-
28	0,96	100	100	-	18,2	-	18,2	-	-	-
29	0,94	100	100	-	57,6	-	-	-	-	-
30	0,95	93,9	93,9	-	45,5	12,1	-	-	-	-
31	0,96	100	100	-	57,6	-	-	-	-	-
32	0,94	100	63,6	-	12,1	-	36,4	-	-	-
33	0,96	100	96,7	-	75,8	-	-	-	-	-
34	0,96	100	100	-	30,3	-	-	-	-	-

35	0,94	100	100	-	45,5	-	-	-	-	-
36	0,92	100	42,4	-	100	-	3	-	-	-
37	0,95	100	100	3	6	-	12,1	-	-	-
38	0,94	100	100	3	12,1	-	24,3	-	-	-
39	0,92	100	81,8	-	18,2	-	30,3	-	-	-
40	0,92	100	100	-	18,2	-	-	-	-	-
Média	0,95	94,6	84,1	0,9	34,7	2,3	5,2	0,08	1,7	0,2

* Aa: atividade de água

Quadro B.6 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido AG8088 Controle

Amostras	Aa	% Contaminação Fúngica									
		DRBC – Híbrido AG8088									
		Total – grãos	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Mucor</i>	Levedura
1	0,96	100	100	3	57,5	18,2	-	-	-	-	-
2	0,95	100	84,8	6	87,9	12,1	-	-	-	-	-
3	0,94	100	100	3	-	-	3	-	3	-	-
4	0,94	100	96,9	-	60,6	-	-	-	-	-	-
5	0,93	100	96,9	-	75,7	-	-	3	-	-	-
6	0,93	100	100	-	27,2	9,1	-	3	-	-	-
7	0,92	100	100	3	18,2	-	-	-	-	-	-
8	0,93	100	100	6,1	36,4	-	-	-	12,1	-	-
9	0,93	100	66,6	-	30,3	-	66,6	-	-	-	-
10	0,93	100	27,3	-	100	-	-	-	-	-	-
11	0,92	100	75,8	-	30,3	-	-	-	24,2	-	-
12	0,93	93,9	54,5	15,2	36,4	3	-	6	-	-	-
13	0,90	100	100	-	-	-	3	3	-	-	-
14	0,91	100	21,2	-	57,6	-	-	-	30,3	-	-
15	0,92	100	33,3	-	21,2	-	6	-	66,6	-	-
16	0,93	100	100	-	18,2	-	-	-	-	3	-
17	0,91	100	100	-	15,2	-	-	-	-	-	-
18	0,91	100	63,6	3	12,1	-	-	-	33,3	-	-
19	0,91	100	-	-	-	-	100	-	66,6	-	-
20	0,92	100	100	-	24,2	-	6	3	6	-	-
21	0,88	81,8	39,4	-	39,4	-	3	-	-	-	-
22	0,89	100	-	-	100	-	-	-	-	-	-
23	0,90	100	42,4	-	27,3	-	15,2	6	33,3	-	-

24	0,89	100	24,2	-	15,2	6	-	-	66,6	-	-
25	0,89	87,9	63,6	-	21,2	-	-	-	-	-	-
26	0,90	81,8	24,2	-	9	-	-	-	48,5	-	-
27	0,89	90,9	63,6	-	39,4	-	-	-	-	-	-
28	0,89	100	66,6	-	42,4	3	-	-	-	-	-
29	0,89	100	24,2	-	21,2	-	-	-	66,6	-	-
30	0,89	87,9	24,2	-	24,2	-	-	-	36,4	-	-
31	0,90	100	78,8	-	51,5	-	-	-	-	3	-
32	0,90	100	78,8	-	39,4	-	-	-	-	-	24,2
33	0,89	100	69,7	-	21,2	-	3	3	33,3	-	-
34	0,90	100	-	-	-	6	100	-	21,2	-	-
35	0,90	100	-	-	-	-	-	-	100	-	-
36	0,90	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-
37	0,90	100	33,3	-	30,3	-	6	-	-	3	3
38	0,88	100	30,3	-	-	-	6	-	33,3	33,3	-
39	0,87	100	90,9	-	-	-	21,2	-	-	-	-
40	0,89	100	100	3	15,2	-	-	3	-	-	-
Média	0,91	98,1	59,5	1,1	30,1	1,4	10,9	0,8	17	1,1	0,7

* Aa: atividade de água

Quadro B.7 - Porcentagem de contaminação fúngica em 40 amostras de grãos de milho recém-colhido referentes ao híbrido AG8088 VTPRO.

Amostras	Aa	% Contaminação Fúngica								
		DRBC – Híbrido AG8088 VTPRO								
		Total – grãos	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Mucor</i>	FNE
1	0,93	100	24,2	-	30,3	3	-	45,5	-	-
2	0,91	100	57,6	-	42,4	-	-	-	-	-
3	0,92	51,5	15,2	-	3	-	-	33,3	-	-
4	0,91	100	21,2	-	3	-	-	72,7	-	-
5	0,91	63,6	63,6	-	-	-	-	-	-	-
6	0,90	75,8	66,6	-	6	3	-	-	-	-
7	0,91	84,8	66,6	-	18,2	-	-	-	-	-
8	0,91	93,9	84,8	-	12,1	-	-	-	-	-
9	0,90	84,8	51,5	-	-	-	-	33,3	-	-
10	0,90	69,7	39,4	-	30,3	-	-	-	-	-
11	0,91	100	100	-	-	-	-	-	-	-
12	0,91	100	100	3	6	-	-	-	-	-

13	0,90	100	100	6	30,3	-	-	-	9	-
14	0,90	100	63,3	-	57,6	-	6	-	-	-
15	0,90	100	100	3	30,3	-	-	-	-	-
16	0,89	100	100	-	12,1	-	-	-	-	-
17	0,88	100	100	3	-	-	-	-	-	-
18	0,88	100	100	3	36,4	-	-	-	-	-
19	0,88	100	100	-	42,4	-	-	-	-	-
20	0,86	100	100	-	-	-	-	-	36,4	-
21	0,94	100	100	-	45,5	-	12,1	-	-	-
22	0,92	100	100	-	42,4	-	-	-	-	-
23	0,92	100	100	-	6	-	-	-	-	-
24	0,92	100	100	-	24,2	-	-	-	-	-
25	0,92	100	100	-	12,1	-	3	-	-	-
26	0,92	100	66,6	3	-	-	33,3	-	-	-
27	0,92	100	100	-	30,3	-	3	-	3	3
28	0,91	100	100	3	6	3	-	-	3	-
29	0,92	100	51,5	6	15,2	-	60,6	-	-	-
30	0,91	100	100	-	18,2	-	-	-	-	-
31	0,92	70	57,6	-	9	3	-	-	-	-
32	0,93	60,6	51,5	-	6	-	3	-	-	-
33	0,92	84,8	78,8	-	6	-	-	-	-	-
34	0,92	100	100	-	39,4	-	-	-	-	-
35	0,92	100	100	-	24,2	-	-	-	9	-
36	0,92	100	100	-	9	-	-	-	-	-
37	0,92	100	100	3	6	-	9	-	-	-
38	0,92	100	100	-	48,5	-	3	-	-	-
39	0,92	100	100	-	3	-	-	-	12,1	-
40	0,93	100	100	-	-	-	-	-	-	-
Média	0,91	93,5	81,5	0,8	17,8	0,3	3,3	4,6	1,8	0,08

* Aa: atividade de água

Quadro B.8 - Incidência de fumonisina B₁ e B₂ no híbrido 30F35 (YG e Controle)

Amostra	30F35 Controle		30F35YG	
	FB1 (µg/Kg)	FB2 (µg/Kg)	FB1 (µg/Kg)	FB2 (µg/Kg)
1	4215,35	2710,23	355,13	35,50
2	869,52	231,41	5458,73	2308,22
3	588,39	106,96	194,92	0,00
4	2160,00	1011,62	1703,58	463,38
5	3353,59	1751,33	313,46	42,47
6	1739,01	1385,33	3475,76	462,22
7	2669,45	1404,46	82,44	0,00
8	2173,06	1645,65	2359,36	493,28
9	1987,45	1021,32	88,65	0,00
10	69,86	0,00	9074,22	2290,62
11	158,93	32,29	32,91	0,00
12	124,71	0,00	4669,53	1772,57
13	111,90	0,00	225,37	0,00
14	296,36	19,72	543,96	171,57
15	466,78	42,04	7551,38	3146,26
16	171,40	0,00	6747,52	2689,37
17	2116,19	387,30	110,33	0,00
18	132,29	0,00	4686,42	1933,66
19	1741,13	504,14	9419,13	3214,68
20	836,74	379,81	7855,04	2790,48
21	93,61	0,00	33,28	0,00
22	2443,15	1948,59	596,89	105,50
23	144,20	0,00	123,41	16,03
24	90,77	0,00	6071,54	1413,76
25	73,79	0,00	51,96	0,00
26	114,35	0,00	6001,20	1970,69
27	295,96	0,00	856,22	850,44
28	260,49	0,00	64,88	109,47
29	181,88	0,00	1110,36	490,36
30	1845,75	1574,29	52,84	0,00
31	95,01	0,00	9209,99	6156,53
32	250,58	0,00	17,91	0,00
33	40,71	0,00	60,84	0,00
34	120,58	0,00	44,86	122,06
35	91,81	0,00	3376,80	1193,53
36	69,15	0,00	28,58	0,00
37	57,54	0,00	7496,02	3072,37
38	3176,44	1860,66	21,47	0,00
39	35,39	0,00	21,83	0,00
40	4307,64	2257,23	7718,78	3836,89

Quadro B.9 - Incidência de fumonisina B₁ e B₂ no híbrido AG8088 (VTPRO e Controle).

Amostra	AG8088 Controle		AG8088VTPRO	
	FB1 (µg/Kg)	FB2 (µg/Kg)	FB1 (µg/Kg)	FB2 (µg/Kg)
1	2481,46	722,21	71,98	0,00
2	0,00	77,05	5022,51	153,21
3	36,16	0,00	0,00	0,00
4	22,44	0,00	0,00	0,00
5	15,74	0,00	7584,26	2154,34
6	890,63	209,87	3088,69	779,28
7	6004,52	3747,78	40,82	0,00
8	89,92	0,00	154,82	0,00
9	4052,64	1035,49	23,12	0,00
10	53,09	0,00	19,82	0,00
11	77,60	0,00	0,00	41,13
12	6998,14	3095,10	0,00	0,00
13	1885,98	756,09	0,00	0,00
14	28,97	0,00	0,00	0,00
15	4883,98	1955,75	0,00	0,00
16	496,54	133,23	28,72	0,00
17	47,77	0,00	17,64	0,00
18	32,28	0,00	20,77	0,00
19	41,83	0,00	0,00	16,92
20	370,45	136,32	0,00	0,00
21	6830,54	1656,05	0,00	0,00
22	706,76	193,25	502,72	99,83
23	2148,24	691,56	0,00	0,00
24	372,71	159,41	14024,58	7869,73
25	64,71	0,00	0,00	0,00
26	76,33	0,00	130,16	39,38
27	116,44	0,00	6544,00	1513,95
28	57,47	0,00	18,35	0,00
29	26,12	0,00	1652,84	554,06
30	5458,21	4042,97	0,00	0,00
31	64,12	0,00	18,72	0,00
32	113,46	0,00	142,70	39,47
33	231,08	48,86	1157,42	355,06
34	70,07	0,00	2397,63	720,71
35	143,45	0,00	5113,96	4353,24
36	83,20	0,00	60,41	0,00
37	5639,60	1745,29	34,35	0,00
38	69,50	0,00	48,37	0,00
39	76,94	0,00	3201,97	1020,97
40	0,00	0,00	367,75	52,93

Quadro B.10 - Incidência de fumonisina B₁ e B₂ no híbrido 2B710 (Hx e Controle)

Amostra	2B710 Controle		2B710 Hx	
	FB1 (µg/Kg)	FB2 (µg/Kg)	FB1 (µg/Kg)	FB2 (µg/Kg)
1	23,35	0,00	70,64	0,00
2	31,53	0,00	241,29	22,70
3	0,00	0,00	38,42	0,00
4	23,70	0,00	68,42	0,00
5	52,51	0,00	0,00	16,44
6	460,13	109,50	47,68	0,00
7	1860,71	869,66	39,07	0,00
8	1609,68	459,56	54,71	0,00
9	22,34	20,70	2754,70	1228,78
10	177,93	0,00	73,56	0,00
11	29,46	0,00	60,84	0,00
12	36,78	0,00	25,87	0,00
13	3154,12	1322,34	396,20	90,60
14	1964,87	2083,49	2516,20	773,05
15	2509,01	1474,97	2135,14	857,11
16	69,11	0,00	0,00	0,00
17	2164,56	1616,91	967,92	334,51
18	835,36	210,48	1985,78	1558,95
19	72,54	0,00	46,02	0,00
20	65,61	0,00	119,06	0,00
21	102,40	0,00	2361,50	927,46
22	82,30	0,00	3352,37	3421,46
23	3346,05	1861,74	5111,33	426,75
24	797,98	358,81	2759,13	1218,72
25	128,58	0,00	51,84	0,00
26	74,90	0,00	134,01	0,00
27	62,21	0,00	1194,11	554,13
28	144,76	0,00	4096,59	1698,55
29	85,53	17,7	4126,27	2093,00
30	142,09	0,00	94,69	79,77
31	65,80	0,00	4346,13	1690,16
32	45,15	0,00	2660,01	483,63
33	121,59	0,00	3973,54	1731,91
34	2250,85	727,55	57,93	0,00
35	98,24	0,00	93,75	0,00
36	138,32	0,00	216,94	0,00
37	53,12	0,00	109,75	0,00
38	69,74	0,00	532,53	90,47
39	2411,80	457,19	23,51	0,00
40	462,74	91,53	129,77	0,00