

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Levantamento da micoflora de grãos ardidos de milho e avaliação da  
resistência genética à *Fusarium verticillioides***

**Adalgisa Thayne Munhoz Ramos**

**Dissertação apresentada para a obtenção do título  
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia**

**Piracicaba  
2008**

Adalgisa Thayne Munhoz Ramos  
Engenheiro Agrônomo

**Levantamento da micoflora de grãos ardidos de milho e avaliação da resistência genética à *Fusarium verticillioides***

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

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba  
2008**

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

Ramos, Adalgisa Thayne Munhoz

Levantamento da micoflora de grãos ardidos de milho e avaliação da resistência genética à *Fusarium verticillioides*. - - Piracicaba, 2008.

70 p. : il.

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

1. Fusariose vegetal 2. Fusarium 3. Grãos 4. Milho 5. Podridão (doença de planta) 6.  
Resistência genética vegetal I. Título

CDD 633.15  
R175L

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

À minha mãe Jane pelo amor e apoio constante  
Aos meus irmãos, Rafael e Fernanda pelo incentivo  
À tia Neuza por todos os cuidados e atenção

Dedico

Ao meu Tio Carlos Alberto pela  
referência humana e profissional

Ofereço

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela orientação, ensinamentos e amizade;

Ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia pelas valiosas contribuições ao estudo;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Júlia, Ana Paula, Bruno, Lara, Luiza, Thais, Raphaele, Lilian, Ana Carolina, Cynthia, Márcia, Juliana, Leandro e Érika, pela amizade e oportunidade de convivência todos esses anos.

Ao laboratório de patologia de sementes: Dra. Heloisa, Thaís, Annelise, Pastora e Vanessa por todo auxílio prestado durante a condução do trabalho e pela amizade;

Aos amigos de pós-graduação Fabrício, Pastora, Ana Paula, Bruno e Lara pela colaboração oferecida nos ensaios de campo;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia Carmem, Fernanda, Rodolfo, Edvaldo, Jefferson, Liliane e Pedro por todo o auxílio;

À empresa de sementes Dow AgroSciences Industrial Ltda pela participação e apoio na condução do trabalho;

Ao Roberto V. de Carvalho, Luciano Rosa, Donisete Pavani, Juvenal e demais funcionários da companhia de sementes Dow AgroSciences;

À todos os colegas do curso de pós-graduação em Fitopatologia pela amizade e bons momentos vividos;

Em especial, ao Fabrício Packer Gonçalves pela grande contribuição na realização das análises estatísticas, pelas sugestões que foram fundamentais para a elaboração da discussão deste trabalho, pelo companheirismo, amor e paciência.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
1 INTRODUÇÃO .....	8
Referências .....	10
2 LEVANTAMENTO DA MICROFLORA DE GRÃOS ARDIDOS DE MILHO.....	11
Resumo .....	11
Abstract .....	11
2.1 Introdução .....	12
2.2 Desenvolvimento.....	14
2.2.1 Revisão bibliográfica .....	14
2.2.1.1 A cultura do milho.....	14
2.2.1.2 Grãos ardidos.....	15
2.2.1.3 Fungos toxigênicos.....	17
2.2.1.4 Micotoxinas .....	20
2.3 Material e métodos.....	22
2.3.1 Material vegetal .....	22
2.3.2 Determinação da microflora presentes em amostras de grãos .....	26
2.3.4 Análises estatísticas.....	26
2.4 Resultados e Discussão .....	27
2.4.1 Flutuações na composição da microflora de grãos ardidos de híbridos em função de épocas e condições geográficas de plantio.....	27
2.5 Conclusões.....	36
Referências .....	37
3 ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA GENÉTICA À <i>Fusarium verticillioides</i> EM LINHAGENS TROPICAIS DE MILHO.....	44
Resumo .....	44
Abstract .....	45
3.1 Introdução .....	45
3.2 Desenvolvimento.....	47

3.2.1 Revisão Bibliográfica.....	47
3.2.1.1 <i>Fusarium verticillioides</i> como patógeno de milho.....	47
3.2.1.2 Fumonisinias.....	49
3.3 Material e métodos.....	52
3.3.1 Material vegetal.....	52
3.3.2 Avaliação da resistência de linhagens tropicais de milho à <i>Fusarium verticillioides</i> .....	53
3.3.3 Determinação de níveis de Fumonisinias.....	54
3.3.4 Análises Estatísticas.....	57
3.4 Resultados e Discussão.....	57
3.4.1 Avaliação da resistência a <i>Fusarium verticillioides</i> a podridão de espiga e produção de fumonisinias.....	57
3.5 Conclusões.....	66
Referências.....	66

## RESUMO

### **Levantamento da micoflora de grãos ardidos de milho e avaliação da resistência genética à *Fusarium verticillioides***

Este trabalho teve dois objetivos distintos, o primeiro foi realizar um levantamento da micoflora associada a grãos ardidos de híbridos comerciais de milho pertencentes à empresa Dow AgroSciences e o outro foi avaliar linhagens de milho tropical para a resistência a podridão da espiga, incidência de grãos ardidos e produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*. Para o primeiro objetivo, coletou-se grãos de dois híbridos (2B587 e 2B710) cultivados em diferentes localidades do Brasil durante a safra verão e safrinha, sob as zonas macro-climáticas SA (subtropical alta), SB (subtropical baixa), TA (tropical alta), TB (tropical baixa) e TT (tropical de transição) afim de, realizar a determinação da incidência fúngica através do método do papel de filtro com congelamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 grãos de cada amostra. Os resultados indicaram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. como os fungos de maior incidência nos grãos, sendo que na safra verão o comportamento dos híbridos em relação a incidência desses fungos variou de acordo com a zona climática. Na safrinha, o híbrido 2B710 foi o mais resistente a *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. independente da zona climática. Para o segundo objetivo, seis linhagens tropicais de milho, previamente classificadas como resistentes (R1, R2 e R3) e suscetíveis (S1, S2 e S3) a *F. verticillioides* pela Dow AgroSciences foram cultivadas na estação experimental da companhia, localizada no município de Jardinópolis/SP durante a safra verão e safrinha. O ensaio consistiu de dois tratamentos (inoculados e não inoculados), sendo que a inoculação foi feita através da pulverização 2 mL de uma suspensão de  $10^6$  conídios/ml no estigma da espiga e nas espigas não inoculadas a doença ocorreu por meio de infecção natural. A avaliação de severidade foi feita por uma escala de notas de 0 a 7, a incidência foi avaliada através da porcentagem de grãos ardidos em sub - amostras de 200 grãos de cada tratamento por repetição e a detecção dos níveis de fumonisinas foi realizada pelo método de Elisa. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com três repetições. Os resultados obtidos na safra verão indicaram uma variação na severidade de 1,2 a 4,3, na incidência de grãos sintomáticos de 13,7 a 46% e os níveis de fumonisinas detectados entre as linhagens variaram de 5,5 µg/g a 41 µg/g. Na safrinha, não houve diferenças significativas comparada à safra verão para a severidade, mas houve uma redução na incidência de grãos sintomáticos que variaram de 4,2% a 22,7% e redução nos níveis de fumonisina, os quais ficaram entre 1,5 µg/g a 22,7 µg/g. Nas duas safras, as linhagens R2 e R3 comportaram-se como mais resistentes a produção de fumonisinas e a R1 comportou-se como mais resistente a podridão da espiga e incidência de grãos ardidos, demonstrando que não houve correlação entre severidade da doença e incidência de grãos ardidos com níveis de fumonisinas.

Palavras-chave: *Zea mays*; Podridão rosada da espiga; Fumonisina; *Fusarium verticillioides*



## ABSTRACT

### **SURVEY OF MYCOFLORA IN DAMAGED CORN GRAINS AND EVALUATION OF GENETIC RESISTANCE TO *Fusarium verticillioides***

This work aimed to survey the mycoflora associated to damaged grains of commercial hybrid maize provided by the company Dow AgroScience and to assess the resistance levels of six tropical inbred lines to ear rot, incidence of damaged grains and of fumonisins production by *Fusarium verticillioides*. For the first objective, two hybrids (2B587 and 2B710) were collected and cultivated in different regions in Brazil, during the normal season and the late-summer plantings, known as “safrinha”, on macro-climatic zones SA (high subtropical), SB (low subtropical), TA (high tropical), TB (low tropical) and TT (tropical transition). The fungal incidence determination was made through the deep - freezing blotter test. The experimental design was totally randomized with four replicates of 50 grains each sample. The results showed *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. as the most prevalent fungi, and the incidence of such fungi in each hybrid varied according to the climatic zone. In the late-summer plantings, the 2B710 hybrid was the most resistant to *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp., independent of the climatic zone. For the second aim, six inbred lines of tropical maize, previously classified as resistant (R1,R2 and R3) and susceptible (S1,S2 and S3) to *F. verticillioides* by Dow AgroSciences were cultivated in the experimental station of the company, localized in Jardinópolis / SP during the normal season and the late-summer plantings. The tests were made by two kinds of treatment (inoculated and non inoculated), and the inoculated treatment was made by spraying 2 mL of a  $10^6$  conidia/mL suspension onto the silk channel of the corn ear and, in the no inoculated ones, the disease occurred by natural infection. Severity was evaluated using a scale of 0 to 7, whereas the incidence was evaluated by counting the damaged grains in sub samples of 200 grains. Fumonisin levels detection were determined by the ELISA method. The experimental design was made in random blocks with three replicates. The results, in the normal season indicated a severity variation of 1.2 to 4.3, and in the symptomatic grains, the incidence was from 13.7 to 46% and the detected fumonisins levels among the inbred lines ranged from 5.5  $\mu\text{g/g}$  to 41  $\mu\text{g/g}$ . No statistical differences between the normal season and the late-summer plantings were observed, concerning severity. However, there was a decrease in symptomatic grains, ranging from 4.2% to 22.7%, as well as a decrease in fumonisins levels, from 1.5  $\mu\text{g}$  to 22.7  $\mu\text{g}$ . The R2 and R3 inbred lines showed more resistance to fumonisins production and R1 showed higher resistance to corn ear rot and damaged corn grains incidence. It was concluded that there was no relation between the disease severity and the of incidence damaged grains with high fumonisins levels.

Keywords: *Zea mays*; Ear rot; Fumonisin; *Fusarium verticillioides*

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas utilizadas na alimentação humana e animal e seu cultivo ocupa uma área de mais de 150 milhões de hectares distribuídos pelo mundo (FAO, 2008). Essa dimensão torna este cereal alvo de intensos estudos relacionados a fatores de produtividade, incluindo aí doenças de causas bióticas e abióticas, entre outros. Nesse contexto, as podridões de espigas causadas por fungos destacam-se como uma das principais responsáveis por perdas em produção e qualidade. Somado ao problema das podridões nas espigas em si, esses fungos ainda podem produzir toxinas em grãos, problema este observado em todas as regiões onde o milho é cultivado (MUNKVOLD, 2003).

Em fitopatologia, o termo “grãos ardidos” se refere a grãos infectados por fungos que resultam das podridões das espigas. Dentre os fungos comumente encontrados em milho estão espécies dos gêneros: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium* e *Stenocarpella* (PINTO, 2005). Grãos ardidos representam uma perda ao agricultor, uma vez que os armazéns que os recebem descontam seu volume do total a ser pago. A estimativa de grãos ardidos é feita com base em amostragens e análises visuais no momento da entrega do lote de grãos. No Brasil, embora existam importantes levantamentos relativos à micoflora em grãos ardidos, estes não permitem estabelecer correlações entre possíveis variações na composição desta com variáveis geográficas, estacionais (relativas às duas estações de cultivo de milho) e genéticas (relativas ao hospedeiro).

Embora vários patógenos produtores de toxinas possam ser encontrados no milho, algumas espécies de *Fusarium* merecem atenção especial, tanto por ocorrerem em maior frequência como pelas conseqüências indesejadas das toxinas que produzem. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo = *F. moniliforme* J. Sheld), agente causal da podridão rosada da espiga e podridão da base do colmo, pode ser considerado o patógeno de maior relevância, pois, além de ser o mais freqüente em milho (WARREN, 1978), ainda produz toxinas denominadas fumonisinas, que estão associadas a enfermidades em animais e humanos. O risco de contaminação por essas toxinas é conhecido e estudado há décadas, porém, as medidas preventivas ainda

representam um alto custo e muitas vezes são consideradas inadequadas (IGAWA, 2007). Dentre as dificuldades encontradas para a realização de uma prevenção efetiva contra a ocorrência de micotoxinas está o fato de que só a presença do fungo toxigênico no grão não implica necessariamente na produção da micotoxina, a qual está relacionada à capacidade de biossíntese do fungo e/ou de condições ambientais favoráveis (PINTO, 2005).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi realizar um levantamento da microflore associada a grãos ardidos de híbridos comerciais de milho com ênfase em *Fusarium verticillioides* e avaliar a resistência de genótipos tropicais de milho à infecção de espigas e produção de fumonisinas por este organismo.

## Referências

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 18 ago. 2008.

IGAWA, T.; TAKAHASHI-ANDO, N.; OCHIAI, N.; OHSATO, S.; SHIMIZU, T.; KUDO, T.; YAMAGUCHI, I.; KIMURA, M. Reduced contamination by the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize kernels through genetic modification with a detoxification gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 5, p. 1622–1629, 2007.

MUNKVOLD, G.P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. Annual review. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 41, p. 116. 2003.

PINTO, N.F.J. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2005. 6 p. (Circular Técnica, 66).

WARREN, H.L. Comparison of normal and high lysine maize inbreds for resistance to kernel rot caused by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 8, p. 1331-1335, 1978.

## 2 LEVANTAMENTO DA MICROFLORA DE GRÃOS ARDIDOS DE MILHO

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento da micoflora associada a grãos ardidos de dois híbridos (2B587 e 2B710) comerciais de milho durante a safra verão e safrinha de 2007. Um total de 28 amostras (16 da safra verão e 12 da safrinha) de 1 kg de grãos de cada híbrido foram obtidas de ensaios anuais em faixa conduzidos pela empresa Dow AgroSciences em diferentes localidades do Brasil, sob as zonas macro-climáticas SA (subtropical alta), SB (subtropical baixa), TA (tropical alta), TB (tropical baixa) e TT (tropical de transição). A determinação da incidência fúngica foi realizada pelo método do papel de filtro com congelamento, onde 200 grãos foram distribuídos, sobre folhas de papel de filtro umedecidas, em placas de petri de plástico. Estas placas foram incubadas por 24h a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  sob fotoperíodo, a seguir foram levadas para um freezer a  $-18^\circ\text{C}$ , durante 24h, retornando às condições de incubação inicial por mais cinco dias. Após esse período, fez-se a análise dos grãos sob microscópio estereoscópico. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 grãos de cada amostra. Os resultados indicaram que os fungos de maior incidência, durante as duas safras foram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., enquanto que *Stenocarpella* spp., *Cladosporium* sp., *Cephalosporium* sp. e *Aspergillus* spp. apresentaram de média a baixa incidência. Considerando as diferentes zonas climáticas, na safra verão, o híbrido 2B587 apresentou variação na incidência de 57% a 74,6% para *Fusarium* spp. e de 85 a 94,2% para *Penicillium* spp. no híbrido 2B710, a variação na mesma ordem foi de 63,7 a 67,5% e 90,3 a 96%, respectivamente. Na safrinha foi observada uma redução na incidência de *Fusarium* spp., sobretudo no híbrido 2B710, o qual apresentou uma incidência de 37,3 a 40%, enquanto que a incidência no híbrido 2B587 variou de 48,7 a 61%. Para os dois híbridos a incidência de *Penicillium* spp foi acima de 96%, considerando as diferentes zonas climáticas. Não foi observada uma interação uniforme entre híbridos, safras e zonas climáticas na incidência fúngica ( $P > 0,05$ ), sendo o híbrido 2B710 mais resistente a *Stenocarpella* spp. na safra verão e mais resistente a *Fusarium* spp e *Penicillium* spp. na safrinha quando comparado ao 2B587 independente da zona climática.

Palavras-chave: Híbridos; Zonas climáticas; *Fusarium*; *Penicillium*

### Abstract

The aim of this study was to survey the mycoflora associated to damaged corn grains of commercial maize hybrids (2B587 and 2B710) during the normal season and the late-summer plantings of 2007. A total of 28 samples (16 from the normal season harvest and 12 from the late-summer plantings harvest) of 1kg of grains of each hybrid

were taken in strip test carried out in Dow AgroSciences Company, in different regions in Brazil, corresponding to the macro-climatic zones SA (high subtropical), SB (low subtropical), TA (high tropical), TB (low tropical), TT (tropical transition). The determination of the fungi incidence was made through the deep-freezing blotter test, in which 200 grains were distributed on wet blotter in plastic Petri dishes. The dishes were incubated for 24 hours at 20 to  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  under photoperiod (12h light/12h dark) and incubated at  $-18^{\circ}\text{C}$  during 24 hours, returning to the same incubation condition for 5 days. After this time, the grains were analyzed by stereo microscope. The experimental design was totally randomized with four repetition of 50 grains each sample. The results indicated that *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. were the most prevalent fungi, while *Stenocarpella* spp., *Cladosporium* spp., *Cephalosporium* sp. and *Aspergillus* spp. showed a medium to low incidence. Considering the different climatic zones, in the normal season, the 2B587 hybrid showed a variation ranging from 57% to 74% for *Fusarium* spp. and from 85% to 94.2% for *Penicillium* spp., to the 2B710 hybrid in the same order variation was from 63% to 67.5% and from 90.3 to 96%, respectively. In the late-summer plantings, a reduction was observed in the incidence of *Fusarium* spp., mostly in the 2B710 hybrid, which showed an incidence of 37.3 to 40%, while the 2B587 incidence ranged from 48.7 to 61%. For both hybrids, the incidence of *Penicillium* spp was over 96%, considering the different climatic zones. However, the 2B710 hybrid was the most resistant to *Stenocarpella* spp. in the normal season and the most resistant to *Fusarium* spp and *Penicillium* spp. in the late-summer plantings season when compared to 2B587, independent to the climatic zone.

Keywords: Hybrids; Climatic zones; *Fusarium*; *Penicillium*

## 2.1 Introdução

A grande importância do milho na alimentação humana e de animais está relacionada principalmente com suas propriedades nutricionais (alto teor de amido, proteínas, óleos e vitaminas), tornando-o componente básico da dieta de muitas populações. Está presente em mais de quinhentos produtos alimentícios e é constituinte principal na produção de inúmeras rações animais (FIGUEIRA et al., 2003). Além disso, a participação desta cultura no mercado mundial está aumentando devido à produção de etanol, principalmente em regiões onde o clima para o cultivo de cana-de-açúcar é desfavorável, como nos Estados Unidos (TSUNECHIRO; PEREZ, 2007). Em 2007, a produção mundial de milho foi cerca de 695,8 milhões de toneladas, sendo que o Brasil participou com 7,1 % do total (ESTADOS UNIDOS, 2007).

O rendimento do milho pode ser influenciado por densidade de plantio, disponibilidade hídrica, fertilidade do solo, potencial produtivo do híbrido, manejo de

plantas daninhas, além de pragas e doenças (FANCELLI, 2000). Nesse sentido, ressalta-se que as doenças da cultura, provocadas por patógenos (fungos e bactérias) representam um potencial de perdas de produtividade que varia de 8 a 13% (OERKE, 2006). Esses patógenos podem infectar diferentes partes da planta, porém, quando colonizam os grãos, o prejuízo tende a ser maior, porque além da formação dos chamados grãos ardidos, algumas espécies ainda podem produzir micotoxinas. Os principais gêneros fúngicos responsáveis por tais danos são *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Esses microrganismos podem infectar os grãos ainda no campo durante a pré-colheita ou no período de armazenamento, sendo *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. mais freqüentes no último caso (CORRÊA, 1995; ORSI et al., 1995; DILKIN et al., 2000; ALMEIDA et al., 2002). Também é comum encontrar nos grãos de milho, fungos dos gêneros *Cladosporium*, *Cephalosporium* e *Stenocarpella* (PINTO, 2005), porém em menor freqüência, dependendo principalmente do clima, região, qualidade genética do material, período de plantio e manejo da lavoura. Apesar disso, havendo condições favoráveis, este último microorganismo também pode acarretar em prejuízos econômicos.

Dentre as micotoxinas consideradas de maior relevância devido a freqüência com que ocorrem e/ou aos danos que causam à saúde animal e humana estão as fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxinas. As fumonisinas, produzidas por algumas espécies de *Fusarium*, apresentam efeito carcinogênico em roedores, provocam lesões em cérebro de equinos, doença denominada leucoencefalomalácia, podendo ser fatal; além disso, o consumo de grãos contaminados com essa micotoxina está associado epidemiologicamente a doenças em humanos, como câncer esofágico (MUNKVOLD; DEJARDINS, 1997). O milho é a principal fonte de contaminação por fumonisinas na dieta humana e animal. Pode haver contaminação de fumonisina no grão se o ambiente for favorável para a infecção por espécies de *Fusarium* e os níveis de contaminação podem aumentar durante o armazenamento se as condições forem propícias para o crescimento fúngico e produção de fumonisina (DESJARDINS, 2006), como alta temperatura e umidade relativa (ONO et al., 1999). As aflatoxinas, produzidas por espécies de *Aspergillus*, possuem poderosa ação hepatotóxica, mutagênica e carcinogênica (WIDSTRON, 1996). A contaminação por aflatoxina já foi responsável por

grandes perdas nas lavouras em algumas regiões dos Estados Unidos (PAYNE, 1992). As ocratoxinas, produzidas pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, são prejudiciais à saúde humana e animal devido às suas propriedades nefrotóxicas, imunotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (MAGNOLI et al., 2007). A ocorrência de ocratoxina em milho infectado por *Penicillium* spp. comumente ocorre em regiões de clima temperado, enquanto que esta micotoxina quando associada a fungos do gênero *Aspergillus*, pode ser isolada de milho cultivado em clima tropical (MAGNOLI et al., 2007).

Apesar da problemática, no Brasil ainda não existem levantamentos sistemáticos da ocorrência de grãos ardidos nem da incidência de fungos e níveis de micotoxinas que estabeleçam relações entre a composição da micoflora do grão e as épocas, locais e condições de cultivo, embora seja importante ressaltar que há inúmeros trabalhos relevantes, porém restritos a regiões específicas ou estados. Como exemplo, cita-se o levantamento fúngico em grãos de milho realizado por Salgado et al. (1980) em Santa Catarina; por Dilkin et al. (2000) em Santa Maria (RS); por Orsi et al. (2000) no Estado de São Paulo; por Almeida et al. (2002) no Estado de São Paulo; Schiabel (2004) no Estado do Paraná, entre outros.

Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a micoflora presente em dois híbridos de milho cultivados em diferentes regiões sob climas distintos, nas safras verão e safrinha (segunda safra) de 2007.

## **2.2 Desenvolvimento**

### **2.2.1 Revisão bibliográfica**

#### **2.2.1.1 A cultura do milho**

O milho (*Zea mays* L.) apresenta um papel importante na economia mundial, principalmente devido à sua forma de utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria. O uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo deste cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. No Brasil, varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano (EMBRAPA, 2006). O

aumento do uso do milho em aplicações industriais elevou sua importância no contexto da produção de cereais na esfera mundial. Nesse sentido, o milho passou a ser um dos cereais mais produzidos no mundo. Embora seja versátil em seu uso, a produção deste cereal tem acompanhado basicamente o crescimento da produção de suínos e aves no Brasil e no mundo (EMBRAPA, 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, ficando atrás dos Estados Unidos e China. Embora seu rendimento médio tenha aumentado nos últimos anos, o Brasil ainda não se destaca entre os países com maior rendimento. No período de 1995 a 2000, o rendimento médio das lavouras nacionais foi de 2.654 kg/ha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2008). Em 2008, apesar de um significativo aumento, alcançando 4.154 kg/ha na primeira safra e 3.672 kg/ha na segunda (CONAB, 2008), a produtividade ainda ficou abaixo da média mundial que, em 2006, já era em torno de 4.815 kg/ha (FAO, 2008).

O rendimento da cultura pode ser comprometido por fatores determinantes da produção, como potencial genético da cultivar, fertilidade do solo, condições climáticas, práticas culturais, doenças, pragas, plantas daninhas, época de semeadura e taxa de emergência (REIS; CASA, 1996). Neste contexto, as doenças representam um dos fatores cruciais responsáveis pelo baixo rendimento deste cereal e redução da qualidade dos grãos, sendo que as perdas estimadas devido ao ataque de fungos e bactérias variam de 8 a 13% (OERKE, 2006).

#### **2.2.1.2 Grãos ardidos**

Os principais patógenos do milho são fungos (FANCELLI; LIMA, 1987). Dentre estes, destacam-se os agentes causais de podridão de espiga que resulta na formação dos chamados “grãos ardidos”. São considerados “grãos ardidos”, grãos atacados por patógenos e/ou que sofreram algum tipo de injúria que leva a alteração de cor, fermentação em toda área do germe ou em qualquer outra parte do endosperma (Portaria nº11, de 12/04/96. BRASIL, 1996). Porém, em termos fitopatológicos apenas grãos infectados por fungos são considerados “ardidos”, os quais são caracterizados principalmente por sintomas de descoloração (TRENTO et al., 2002), estrias brancas no



pericarpo e estruturas fúngicas como crescimento micelial sobre os grãos (DESJARDINS et al., 1998).

Atualmente, grãos ardidos constituem um dos principais problemas nas lavouras de produção de milho, devido à queda de produtividade e qualidade dos grãos, além da redução do pagamento pelos armazéns aos produtores, uma vez que o percentual referente de grãos ardidos é descontado do valor de pagamento. Esta estimativa é feita com base em amostragens e análises visuais. A porcentagem de grãos ardidos também é usada para classificação do milho nos tipos 1 (até 3%), 2 (até 6%) e 3 (até 10%), conforme portaria 845 de 1976 do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). A portaria estabelece que lotes abaixo do padrão 3 devem ser re-beneficiados. Em casos extremos, pode ocorrer a recusa de recebimento do lote por parte do armazém. Estas situações tendem a ser mais freqüentes, uma vez que o mercado consumidor está cada vez mais sensível em relação à qualidade do produto (COMIGO, 2006).

Os agentes causais de podridões de espiga e conseqüentemente dos grãos ardidos mais comumente encontrados em milho são espécies do gênero: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium* e *Stenocarpella* (PINTO, 2005). A podridão de espiga causada por *Fusarium verticillioides* é denominada de podridão rosada, que também pode ser causada por *Fusarium proliferatum* e *subglutinans* (SHURTLEFF, 1992). Nas espigas atacadas pode-se observar crescimento cotonoso de coloração branca, constituído de micélio e esporos do patógeno. Já os grãos apresentam em sua parte superior estrias brancas típicas com posterior alteração de cor, que pode variar do róseo ao marrom escuro (PEREIRA et al., 2005). Outra importante podridão é a podridão rosada da ponta da espiga, também conhecida pelo nome de podridão de giberela (*Gibberella zeae*), sendo mais comum em regiões de clima sub - tropical ameno e de alta umidade relativa. A forma anamórfica de *G. zeae* é denominada de *Fusarium graminearum*. *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis* (Berk) Sacc (Sin.: *Diplodia zeae* (Schw. Lev) e *Stenocarpela macrospora* (Earle) (Sutton (= *Diplodia macrospora* Earle))) são responsáveis pela podridão branca da espiga. Espigas infectadas apresentam grãos com coloração marrom, baixo peso e com crescimento micelial branco entre suas fileiras. *Aspergillus* e *Penicillium*, embora sejam

considerados fungos de armazenamento, também podem invadir sementes de milho no campo quando as condições ambientais forem favoráveis (LAZZARI, 1997). Espécies do gênero *Aspergillus* são consideradas iniciadoras da deterioração das sementes e grãos, causando danos ao germe, descoloração e alterações nutricionais (MERONUCK, 1987). A principal característica de espigas infectadas por *Penicillium* é a coloração verde-azulada entre os grãos e superfície do sabugo. O grão pode ficar escurecido na região do embrião, sendo este sintoma denominado de “olho azul” do milho (PEREIRA et al., 2005).

A infecção na espiga por esses fitopatógenos é favorecida por clima úmido na fase de polinização, mau empalhamento e por injúrias causadas por insetos (SHURTLEFF, 1992). A alta densidade de plantas aliada a desequilíbrios nutricionais e a genótipos suscetíveis também contribuem para a incidência de podridões de espigas e de grãos ardidos (AGRIOS, 2005). Além disso, é importante ressaltar que a monocultura, principalmente associada ao plantio direto, predispõe a lavoura à maior frequência de podridões de espiga (REIS; CASA, 1996), isso devido à disponibilidade de inóculo, uma vez que fungos do gênero *Fusarium* e *Stenocarpella* sobrevivem saprofiticamente em restos culturais (TRENTO et al., 2002).

Medidas de controle que parecem ser práticas simples como rotação de cultura, manejo adequado da população de plantas e adubação equilibrada, nem sempre são fáceis de serem conduzidas. Trento et al. (2002) demonstraram que os fitopatógenos respondem de forma diferenciada em relação as diferentes densidades de plantio e sistema de cultivo. *Fusarium verticillioides*, por exemplo, ocorreu em maior incidência em uma lavoura de monocultura com 50 mil plantas/ha, enquanto que *Cephalosporium* sp., também em monocultura, apresentou maior incidência na densidade de 30 mil plantas/ha. De acordo com Agrios (2005) a densidade de plantio, os altos níveis de nitrogênio e baixos níveis de potássio favorecem patógenos causadores de podridões de espiga, principalmente espécies de *Fusarium*.

### **2.2.1.3 Fungos toxigênicos**

A incidência de fungos causadores de podridões de espigas e grãos ardidos representa um problema adicional devido à produção de micotoxinas, como as fumonisinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg; zearalenona por *Fusarium graminearum* e *F. poae*; vomitoxinas por *Fusarium verticillioides*; toxina T-2 por *Fusarium sporotrichioides*; aflatoxinas produzidas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*; ocratoxinas produzidas por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, entre outras.

No Brasil, os relatos de fungos toxigênicos na cultura do milho apontam a predominância do gênero *Fusarium*, seguido por *Aspergillus* e *Pencillium* (KAWASHIMA; SOARES, 2006). Diversos trabalhos de levantamento realizados no Brasil e no exterior demonstraram um elevado número de amostras de milho contaminadas com micotoxinas, sendo as fumonisinas as de maior ocorrência na cultura (KAWASHIMA; SOARES, 2006).

Fungos do gênero *Fusarium* são os mais freqüentes associados a espigas de milho (PINTO, 2001; TRENTO, 2002). Esses fungos podem causar doença em todos os estádios de desenvolvimento da planta, porém também podem infectar a planta sem causar sintomas. *F. verticillioides* e *F. proliferatum* são as espécies mais comumente relacionadas com a produção de fumonisinas, uma classe de micotoxina associadas a enfermidades em animais e humanos. Espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas causam podridões de espiga de milho, resultando na formação dos chamados grãos ardidos. Contudo, essa toxina também pode ser detectada, em níveis bem inferiores, em grãos com infecção assintomática (DESJARDINS et al., 1998).

No Brasil, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* são as principais espécies relacionadas a podridões de espiga de milho e grãos ardidos com prevalência da primeira (PINTO, 2001; TRENTO, 2002; SARTORI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005), ao passo que não há relatos da ocorrência de *F. proliferatum*. No entanto, a ocorrência desta espécie não pode ser descartada dada sua alta semelhança morfológica com *F. verticillioides*, que pode levar a classificações errôneas (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

*F. verticillioides* também é apontado como o principal produtor de fumonisinas no milho brasileiro. Embora Pinto (2001) aponte *F. subglutinans* como uma espécie capaz de sintetizar esta toxina em níveis elevados, existe uma controvérsia na

literatura, uma vez que, Nelson et al. (1992) e Reynoso et al. (2004) descreveram em seus respectivos trabalhos que *F. subglutinans* não sintetiza fumonisina ou a sintetiza em baixas concentrações. Nesse sentido, para o milho brasileiro, considera-se que *F. verticillioides* é a principal espécie responsável por podridão de espiga, grãos ardidos e produção de fumonisina.

Os sintomas provocados por *F. verticillioides* em grãos de milho variam desde grãos descoloridos, estrias brancas no pericarpo até severa podridão, além disso também é possível observar sinais do patógeno como a ocorrência de um micélio róseo cotonoso sobre a espiga (DESJARDINS et al., 1998). A infecção por esse fungo pode ocorrer por várias rotas, sendo a principal a infecção através do canal do estilo-estigma por conídios transportados pelo ar (OREN et al., 2003). Porém, Kedera et al. (1992) por meio de estudos de compatibilidade vegetativa, demonstraram que estruturas infectivas (conídio e micélio) são capazes de colonizar as sementes interna ou externamente e, após a germinação das mesmas, o fungo pode se movimentar para raízes, colmo e finalmente chegar a espigas e grãos da planta adulta.

É importante ressaltar que em alguns estudos com inoculação artificial de *Fusarium* em sementes de milho, como por exemplo o realizado por Oren et al., (2003), foi possível observar que a presença desse fungo além de não ter comprometido o crescimento da planta, ainda estimulou seu desenvolvimento. Esse resultado indica a existência de uma relação endofítica de *Fusarium* com o milho em algumas condições (LESLIE et al., 1990). Assim, o fungo possivelmente protege a planta do ataque de outros patógenos prejudiciais à cultura (ZUMMO; SCOTT, 1992; TRENTO et al., 2002).

Dentre as espécies de *Aspergillus* isoladas do milho, destaca-se *A. flavus* como a mais freqüente. A contaminação por esse fungo no estágio de pré - colheita foi verificada pela primeira vez nos Estados Unidos em meados de 1920 (SAVELYEV, 1962 apud BRADBURN et al., 1993). Embora *A. parasiticus* possa infectar o milho no campo (ILAG 1975; HESSELTINE et al., 1981 apud BRADBURN et al., 1993), *A. flavus* parece ser o fungo dominante na produção de aflatoxinas (CALVERT et al., 1978 apud BRADBURN et al., 1993). No entanto, há evidências de que a competição com outros fungos possa limitar a infecção por *A. flavus*, determinando o nível de contaminação por aflatoxinas na lavoura (WICKLOW et al., 1988 apud BRADBURN et al., 1993). A

infecção natural de *A. flavus*, ainda no campo, ocorre principalmente devido a danos mecânicos na espiga causados por tratos culturais e insetos.

A infestação de *A. flavus* e produção de aflatoxina no campo requerem alta umidade relativa (WINN; LANE, 1978 apud BRADBURN et al., 1993). Estresse provocado por seca também pode afetar os constituintes do grão de milho, favorecendo o estabelecimento desse patógeno e a biossíntese de aflatoxina. A alta densidade de plantas e presença de plantas daninhas também podem aumentar a suscetibilidade das plantas (COBB 1977).

A incidência de *Penicillium* vem aumentando em muitas áreas de cultivo de milho nos últimos anos. Períodos chuvosos após o florescimento favorecem o aumento da severidade da podridão (PEREIRA et al., 2005). A ocorrência desse fungo reflete uma preocupação adicional referente à produção de micotoxinas como por exemplo as ocratoxinas, sendo *P. verrucosum* a principal espécie produtora desta toxina, a qual é encontrada com maior frequência em regiões de clima temperado. Ainda Magnoli et al. (2007) citaram que esse gênero fúngico foi encontrado em baixa incidência em amostras de milho provenientes do Estado do Rio de Janeiro, quando comparada as incidências de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. Esses resultados explicam, em parte, a maior atenção direcionada às espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* como contaminantes de grãos de milho no Brasil.

#### **2.2.1.4 Micotoxinas**

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e estão associadas a efeitos desfavoráveis à saúde humana e animal. Metabólitos secundários são produzidos no micélio de fungos filamentosos, mas também podem estar presentes em seus esporos. Embora uma ampla diversidade de fungos possa produzir esses metabólitos, a produção de uma micotoxina específica geralmente está confinada a um número relativamente pequeno de espécies fúngicas ou até mesmo a isolados específicos (D'MELLO; MACDONALD, 1997).

A produção de micotoxinas pode ser afetada por um conjunto de fatores biológicos, químicos e físicos. Ressalta-se como um dos principais fatores biológicos a

agressividade do fungo e a suscetibilidade do hospedeiro. Como fator químico, destaca-se o uso de fungicidas, que quando atua controlando o fungo na cultura, ajuda também a reduzir os níveis de contaminação por micotoxinas. No entanto, estudos mostraram que sob aplicação de fungicida em uma concentração sub-letal, a produção de micotoxina pode aumentar. Gareis e Ceynowa (1994) apud D'Mello e MacDonald (1997) apontaram que a aplicação de uma mistura de tebuconazole e triadimenol reduziu a incidência de *Fusarium* em trigo, mas estimulou a produção da micotoxina nivalenol. A interação de alguns fatores físicos também pode influenciar na produção de micotoxinas durante o cultivo e/ou armazenamento de cereais. Dentre esses fatores estão: temperatura, umidade, infestação por insetos, tempo de cultivo ou de armazenamento. Por exemplo, estudos com *F. verticillioides* sugerem que a atividade de água pode influenciar na produção de fumonisina B<sub>1</sub> em grãos de milho, enquanto que a temperatura pode ser mais importante na produção de zearalenona por outras espécies de *Fusarium* (D'MELLO; MACDONALD., 1997).

Dentre as micotoxinas mais estudadas destacam-se as aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas e zearalenona. A aflatoxina B<sub>1</sub>, produzida por espécies de *Aspergillus*, está relacionada a lesões hepáticas e redução da eficiência do sistema imune e reprodutivo de animais ruminantes, além de apresentar potencial carcinogênico em humanos (D'MELLO; MACDONALD, 1997). Ocorre principalmente em amendoim, mas alguns trabalhos relataram a ocorrência de aflatoxina em milho no sudeste do Brasil.

A zearalenona, produzida por fungos do gênero *Fusarium*, apresenta atividade anabólica e estrogênica em várias espécies animais, como hiperestrogismo em suínos (OLIVEIRA et al., 2002), além de estar relacionada a infertilidade e redução da produção leiteira em vacas (D'MELLO; MACDONALD, 1997). Apesar dos efeitos danosos dessa toxina, Machinski Jr. et al., (2001) apontaram uma baixa incidência desse metabólito em milho na região Sudeste do Brasil. Esses autores encontraram apenas uma amostra contaminada em 110 amostras analisadas. Sabino et al. (1989) avaliaram 328 amostras de milho provenientes das regiões sul e sudeste e detectaram zearalenona em apenas 5% das amostras.

A ocratoxina A, produzidas por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, apresenta ação prejudicial à saúde humana e animal devido às suas propriedades

nefrotóxicas, imunotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (MAGNOLI et al., 2007). Contudo, a ocratoxina A ocorre em baixa freqüência na cultura do milho. Machinski Jr. et al. (2001) encontraram apenas duas amostras de milho contaminadas com essa toxina dentre 110 amostras analisadas no Estado de São Paulo.

As fumonisinas, produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*, estão associadas a lesões hepáticas em suínos e bovinos, leucoencefalomálacia eqüina, edema pulmonar em suínos, além de câncer esofágico em humanos. Machinski Jr. et al. (2000) encontraram fumonisina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em 50% das amostras de alimentos a base de milho analisadas na cidade de Campinas. Também Vargas et al. (2001) apontaram contaminação por essa toxina em 99% das amostras de milho analisadas nas regiões sul, centro e centro-sul e Castro et al. (2004) detectaram a presença de fumonisina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> em cereais infantis a base de milho comercializados no Estado de São Paulo. Kawashima e Soares (2006) encontraram 71 amostras contaminadas com fumonisina B<sub>1</sub> em 74 amostras analisadas em Recife (PE).

Do exposto acima, conclui-se que a presença de algumas espécies fúngicas nos grãos reveste-se de importância especial, não somente devido aos danos diretos que acarretam, mas também pelo perigo do consumo de grãos contaminados por toxinas. Nesse sentido, a identificação das espécies fúngicas contaminantes representa um importante sinalizador quanto à presença de micotoxinas nos substratos, indicando a necessidade do controle da ocorrência de fitopatógenos e conseqüentemente de seus metabólitos secundários.

## **2.3 Material e Métodos**

### **2.3.1 Material vegetal**

Amostras de 1 kg de grãos de milho híbrido foram obtidas de ensaios anuais em faixa conduzidos em diferentes localidades do Brasil pela empresa Dow AgroSciences. Ensaios em faixa (*strip tests*) consistem em plantios em faixas de 16 linhas de mais de 200 metros de comprimento, totalizando uma área mínima de 0,5 hectare para cada híbrido a ser avaliado para todas as características de interesse da empresa relevantes para a comercialização do material nas regiões onde são testados. Para finalidades do projeto, a empresa plantou, nos anos de 2007, dois híbridos comerciais, 2B587 e 2B710, nas regiões Sul, Sudeste (SE) e Centro-Oeste (CO) na 1ª safra e os mesmos híbridos nas regiões Sul e Centro-Oeste na 2ª safra (safrinha), totalizando 28 amostras (16 amostras da 1ª safra e 12 da 2ª safra). Segundo caracterização da Dow AgroSciences, o híbrido 2B587 é tolerante à seca, apresenta espigas com bom empalhamento, é resistente a doenças de grãos e é recomendado para o cultivo tanto na safra verão como na safrinha, sendo que apresenta maior potencial produtivo quando cultivado durante a safra verão em zonas macro-climáticas denominadas tropical alta (TA), tropical de transição (TT) e sub-tropical alta (SA); na safrinha seu cultivo na zona macro-climática SA não é recomendado, ao passo que para as demais áreas o potencial produtivo deste híbrido não varia. Entre as características atribuídas ao híbrido 2B710 está a tolerância ao estresse hídrico, espigas com bom empalhamento, grãos com moderada resistência a doenças e estabilidade quanto ao potencial produtivo em relação às regiões onde é cultivado. Contudo, na safra verão, o cultivo deste híbrido na zona macro-climática TA está sob avaliações e na safrinha, o 2B710 não é recomendado para zona macro-climática sub-tropical baixa (SB).

Zonas macro-climáticas correspondem a um dado conjunto de características atribuídas às regiões onde o milho é cultivado e são utilizadas por empresas produtoras de sementes como a Dow AgroSciences e EMBRAPA para avaliar o desempenho dos híbridos e orientar o plantio de seus materiais nas diferentes regiões produtoras de milho do Brasil (Roberto V. de Carvalho, comunicação pessoal, 2008). Assim, os climas SA (subtropical alta), SB (subtropical baixa), TA (tropical alta), TB (tropical baixa) e TT (tropical de transição), apresentados na Tabela 1, representam zonas macro-climáticas das regiões nas quais os híbridos 2B587 e 2B710 são cultivados comercialmente para serem testados quanto às características inerentes de cada híbrido, citadas acima. A



zona climática SA engloba regiões a uma altitude de 700 metros; SB, regiões localizadas abaixo de 700 metros; TA, acima de 700 metros; TB, abaixo de 500 metros e TT, regiões localizadas a altitudes de 500 a 700 metros

Tabela 1- Amostras de grãos avaliadas na primeira e segunda safra de 2007

<b>Local coleta</b>	<b>Est.</b>	<b>Híbrido</b>	<b>Safra</b>	<b>Clima</b>
Vacaria	RS	2B587	1ª safra	SA
Passo fundo	RS	2B587	1ª safra	SB
Itajú	SP	2B587	1ª safra	SB
Campo verde	MT	2B587	1ª safra	TA
Guarapuava	PR	2B587	1ª safra	SA
Formosa	GO	2B587	1ª safra	TA
Montividiu	GO	2B587	1ª safra	TA
Chapecó	SC	2B587	1ª safra	SB
Vacaria	RS	2B710	1ª safra	SA
Passo fundo	RS	2B710	1ª safra	SB
Itajú	SP	2B710	1ª safra	SB
Campo verde	MT	2B710	1ª safra	TA
Guarapuava	PR	2B710	1ª safra	SA
Formosa	GO	2B710	1ª safra	TA
Montividiu	GO	2B710	1ª safra	TA
Chapecó	SC	2B710	1ª safra	SB
Jataí	GO	2B587	2ª safra	TA
Jataí	GO	2B587	2ª safra	TA
Chapadão do sul	MT	2B587	2ª safra	TA
Londrina	PR	2B587	2ª safra	TT
Sidrolândia	MS	2B587	2ª safra	TT
Palotina	PR	2B587	2ª safra	TB
Jataí	GO	2B710	2ª safra	TA
Jataí	GO	2B710	2ª safra	TA
Chapadão do sul	MT	2B710	2ª safra	TA
Londrina	PR	2B710	2ª safra	TT
Sidrolândia	MS	2B710	2ª safra	TT
Palotina	PR	2B710	2ª safra	TB

SA: Subtropical alta; SB: Subtropical baixa; TA: Tropical alta; TB: Tropical baixa; TT: Tropical de transição

### **2.3.2 Determinação da micoflora presentes em amostras de grãos**

Os grãos foram secos até atingirem 13% de umidade e identificados segundo híbrido, local e época de produção. Num primeiro momento, uma sub-amostra de 400 gramas de cada amostra foi analisada visualmente a fim de separar grãos assintomáticos, quebrados, danificados por lagartas, por carunchos, por percevejos e ardidos, propriamente ditos. Estes últimos foram submetidos à análise microscópica, após plaqueamento e incubação, com o objetivo de analisar sua micoflora com base em características morfológicas de estruturas fúngicas, conforme descrito a seguir.

A determinação da incidência de fungos foi realizada pelo método do papel de filtro com congelamento (LUCCA FILHO, 1987; BRASIL, 1992), onde 200 grãos foram distribuídos sobre folhas de papel de filtro umedecidas com água destilada, em placas de petri de plástico de 9 cm de diâmetro. Estas placas foram incubadas por 24 h a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  sob luz branca fluorescente alternada (12 h de luz/12 h de escuro) em câmara de incubação a uma umidade relativa de 23%. A seguir, as placas foram levadas para um freezer a  $-18^\circ\text{C}$ , durante 24 h, retornando à câmara de incubação por mais cinco dias, sob as mesmas condições. Após o período de incubação, fez-se a análise dos grãos sob microscópio estereoscópico.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 grãos de cada amostra. Estas análises foram conduzidas junto ao laboratório de Patologia de Sementes da Seção de Fitopatologia sob a supervisão da Dra. Maria Heloísa D. de Moraes.

### **2.3.4 Análises estatísticas**

O programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) foi utilizado para determinar as diferenças entre as freqüências fúngicas nos dois híbridos cultivados em locais com diferentes climas durante a safra verão e safrinha de 2007. Para essas análises, os dados originais foram transformados por  $\sqrt{x}$  (PINTO et al., 2007) e as comparações das variáveis foram feitas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 2.4. Resultados e Discussão

### 2.4.1 Flutuações na composição da micoflora de grãos ardidados de híbridos em função de épocas e condições geográficas de plantio

Observando as Tabelas (2 e 3) e as Figuras (1 e 2) abaixo, nota-se que, independente da zona climática, híbrido ou interação dessas variáveis, os fungos de maior incidência, durante a safra verão e safrinha de 2007 foram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., enquanto que *Stenocarpella* spp., *Cladosporium* sp., *Cephalosporium* sp. e *Aspergillus* spp. apresentaram de média a baixa incidência. A alta incidência de *Fusarium* e *Penicillium* corrobora com resultados descritos por alguns autores, como Ono et al. (2002), que recuperaram esses dois gêneros fúngicos em todas as amostras de grãos que analisaram. Almeida et al. (2000) examinaram grãos de três híbridos obtidos de três regiões diferentes do Estado de São Paulo e obtiveram as maiores incidências fúngicas dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Tanaka et al. (2001), avaliaram sementes armazenadas e encontraram *Fusarium* e *Penicillium* como os mais freqüentes, seguidos de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cephalosporium* e *Stenocarpella*. Gonzáles et al. (1995), avaliando a micoflora de milho na Argentina, também encontraram *Fusarium* e *Penicillium* como os mais freqüentes e apontaram *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Cephalosporium* em menores incidências. Alhadas et al. (2004), embora não tenham avaliado amostras de milho *in natura*, avaliaram amostras de fubá provenientes do Paraná para a ocorrência de fungos e encontraram os gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* como os mais freqüentes, enquanto que *Cephalosporium* e *Cladosporium* foram relatados com menor freqüência nas amostras. Essa tendência parece igualmente ocorrer para outros países como Argentina (GONZÁLES et al., 1995), África do Sul (MARASAS et al., 1988) e Austrália (BLANEY et al., 1986).

Variações na ocorrência de fungos entre diferentes híbridos são esperadas. No entanto, é importante ressaltar a interação do material genético com a zona climática onde é cultivado, uma vez que o fator climático é um dos principais determinantes na ocorrência de fungos em sementes (FRANÇA –NETO; HENNING, 1992). Assim, a partir

dos dados obtidos neste trabalho foi possível comparar as flutuações de gêneros fúngicos em dois híbridos cultivados sob diferentes zonas climáticas e elaborar algumas suposições sobre o desempenho de tais híbridos a podridões de espiga e formação dos grãos ardidos.

O híbrido 2B587, apesar de apresentar espigas com bom empalhamento e ser classificado pela Dow AgroSciences como resistente a doenças de grãos, apresentou alta incidência de *Fusarium* e *Penicillium*, sobretudo na safra verão. Pela Tabela 2 e Figura 1A, é possível observar que na safra verão a incidência de *Fusarium* no híbrido 2B587 foi significativamente maior quando cultivado em regiões climáticas TA (sinalizado por letras maiúsculas na tabela e no gráfico), apresentando 74,6% de incidência quando comparado com a zona climática SA (57%). Embora esse híbrido seja recomendado para essas duas zonas climáticas, notou-se melhor adaptação nas regiões localizadas na zona climática SA, uma vez que também foi observado uma menor incidência dos outros gêneros fúngicos exceto *Stenocarpella* spp. (Tabela 2). Além disso, temperaturas amenas típicas de regiões subtropicais podem ter contribuído para a menor incidência de fungos que são favorecidos por altas temperaturas, como, por exemplo, fungos do gênero *Fusarium*. A incidência de *Penicillium* foi significativamente maior em zonas climáticas SB (94,2%). Contudo, nas zonas SA e TA, a incidência desse fungo foi a mais elevada em comparação com os outros gêneros, inclusive *Fusarium*. Também foi encontrada uma moderada incidência de espécies do gênero *Stenocarpella*, principalmente quando cultivado sob altitudes de 700 metros ou mais (Tabela 2 e Figura 1C). *Aspergillus* spp. foi o patógeno de menor incidência nesse híbrido, variando de 0,5% em zonas climáticas SA a 2,5% em zonas climáticas TA (Tabela 2). Para fungos do gênero *Cephalosporium* não foi observada interações significativas entre o híbrido e as zonas climáticas, sendo sua incidência de 16% em média. A incidência de *Cladosporium* sp. foi significativamente maior em zonas climáticas SB (34,8%) quando comparada com as zonas climáticas TA (23,8%) e SA (10%).

Na safrinha, a incidência de *Fusarium* spp. foi significativamente maior, quando o híbrido 2B587 foi cultivado em zonas macro-climática TA (61%) e TB (55%) comparado a zona climática TT (48,7%) (Tabela 3 e Figura 2A). Como na safra verão, a

incidência de *Penicillium* spp. foi a mais alta dentre todos os gêneros fúngicos e não diferiu significativamente entre as zonas climáticas. O gênero *Stenocarpella* spp. foi encontrado apenas em amostras provenientes da zona climática TA e em baixa incidência (< 1%). *Aspergillus* spp. não foi observado nesse híbrido durante a safrinha. Similarmente à safra verão, *Cephalosporium* sp. ocorreu em moderada incidência, no entanto, foi observada uma interação significativa entre híbrido e zona climática (Tabela 3). A incidência de *Cladosporium* foi alta, sobretudo em zonas TA (72,1%) e TB (71%).

O híbrido 2B710, caracterizado por espigas com bom empalhamento e considerado moderadamente suscetível a doenças de grãos, apresentou de maneira geral, menor incidência de fungos nos grãos do que o híbrido 2B587. Embora o cultivo de 2B710 em regiões macro-climáticas TA na safra verão esteja sob avaliação, nesse trabalho, grãos provenientes de regiões caracterizadas por este clima durante a safra verão não apresentaram diferenças significativas em relação à incidência de *Fusarium*, quando comparado com as zonas SA e SB, demonstrando que não houve interação entre este híbrido em diferentes regiões de cultivo. Quando o híbrido 2B710 foi cultivado em zona climática SA, a incidência de *Penicillium* e *Stenocarpella* foi maior do que nas zonas climáticas SB e TA. Já nas zonas climáticas TA, fungos do gênero *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cephalosporium* ocorreram em maiores incidências, enquanto que a maior incidência de *Cladosporium* foi observada em grãos provenientes da zona climática SB (Tabela 2). Na safrinha, a incidência de espécies do gênero *Penicillium* foi alta, variando de 96% em zona climática TB a 97,5% em TA. Comparando com a safra verão, observou-se que a incidência de *Fusarium* foi menor, variando de 37,3 % em TA a 40% em TB. Contudo, na safrinha não houve interações significativas entre o híbrido e a zona climática em relação às incidências de *Fusarium* e *Penicillium*.

Comparando os híbridos 2B710 e 2B587 para a incidência de *Fusarium*, na safra verão, observou-se que a incidência desse fungo foi alta nos dois híbridos e que não houve diferenças significativas entre os híbridos para nenhuma das zonas climáticas avaliadas. Na safrinha, observou-se menor incidência deste fungo no 2B710 independente da zona climática (Figura 2A e Tabela 3), no entanto, esse fungo ainda ocorreu em alta incidência comparado aos outros gêneros, exceto *Penicillium*.

Esta alta incidência de *Fusarium* em híbridos de milho cultivados nas principais regiões produtoras deste cereal no Brasil reflete uma preocupação adicional, pois além do dano na espiga e grão, ocorre a produção de toxinas, como por exemplo, as fumonisinas. Orsi et al. (1999), além de ressaltar que o gênero *Fusarium* é o mais freqüentemente associado ao milho brasileiro, seguidos por *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, também apontaram em seus resultados altas concentrações de fumonisinas, muito acima do estipulado pela FDA (Food and Drug Administration - EUA) (4 µg/g) e UE (União Européia) (1 µg/g) (BUTRÓN et al., 2006) para milho não processado. Kawashima e Soares (2006) encontram altas concentrações de fumonisinas em derivados de milho comercializados no Estado de Pernambuco, baixas concentrações de aflatoxinas e não relataram a ocorrência de ocratoxinas. Dessa forma, sugere-se que a ocorrência de *Fusarium* em grãos de milho destinados a produção de ração e alimento oferecem riscos a saúde animal e humana.

A incidência de *Penicillium* foi a mais elevada em relação aos outros gêneros fúngicos, independente do híbrido e zona climática. Na safra verão, a incidência desse patógeno foi significativamente diferente entre os híbridos cultivados em zona climática SA (Tabela 2). No híbrido 2B587 foi observada a maior incidência de *Penicillium* em zonas climáticas SB (94,2%) e esse valor não diferiu significativamente dos encontrados no híbrido 2B710 cultivado em zonas climáticas SA (96%) e SB (94%). Esses resultados podem ser comparados aos de Trento (2004) que avaliou a interação de híbridos de milho com diferentes altitudes e registrou altas incidências de fungos do gênero *Penicillium* em regiões subtropicais abaixo de 700 metros (consideradas zonas climáticas SB). Na safrinha nenhum dos híbridos cultivados sob os diferentes climas diferiram estatisticamente em relação à presença desse fungo.

Outra diferença significativa entre os híbridos foi observada para espécies do gênero *Stenocarpella* durante a safra verão, onde no híbrido 2B587, as incidências desse patógeno variaram entre 4,8% (TA) a 19,2% (SA), enquanto que no 2B710 essa variação foi de 0,7% (TA) a 5,2% (SA), demonstrando a maior resistência do híbrido 2B710 à ocorrência de podridão branca da espiga. Trento (2004) também mostrou as diferentes respostas de híbridos cultivados em diferentes altitudes para infecção de *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora.*, no entanto, em seu trabalho a maior incidência

de *Stenocarpella* spp. foi em zonas climáticas TA. Contudo a incidência desse gênero fúngico foi menor do que as de outros gêneros como *Fusarium* e *Penicillium*. Na safrinha, a incidência de *Stenocarpella* spp. foi menor que 1% nos dois híbridos sob os diferentes climas. Essa baixa incidência pode ser comparada ao trabalho de Tanaka et al. (2001), que relataram a rara ocorrência desse gênero em sementes armazenadas.

Na safra verão, houve diferenças significativas para a incidência de *Aspergillus* entre os híbridos 2B587 e 2B710 nas zonas climáticas SB e TA (Tabela 2), sendo o 2B587 considerado mais suscetível. Na safrinha, essa situação foi invertida, pois o híbrido 2B587 se comportou como mais resistente a fungos do gênero *Aspergillus* em relação ao 2B710, quando cultivado em zonas climáticas TA e TB. Esses resultados corroboram com a conclusão obtida por Ramos et al. (2008), que relataram que a incidência deste fungo pode ser variável de acordo com a interação do híbrido e o local de cultivo. É importante ressaltar que apesar dessa diferenças entre híbridos, a incidência desse gênero foi considerada baixa, nas duas safras, quando comparada aos outros gêneros fúngicos. Isto pode ser explicado devido à competição com *Fusarium*. Zummo e Scott (1992) concluíram que em espigas altamente infectadas por *Fusarium* ocorria a inibição do crescimento de *A. flavus*. Além disso, os resultados apresentados no presente trabalho foram obtidos a partir de amostra recém-colhidas, e assim, não se pode considerar que a infecção de *Aspergillus* spp. no milho permanecerá baixa até a comercialização. Ono et al. (2002) relataram que em grãos armazenados, *Aspergillus* spp. foi detectado apenas no 2º mês e que, no 10º mês de armazenamento, esse fungo foi observado em aproximadamente 50% dos grãos armazenados.

Na safra verão não foi observada diferenças significativas entre os híbridos para a incidência de *Cephalosporium*. Na safrinha, ocorreram diferenças significativas apenas nas zonas climáticas TT e TB, onde o 2B710 foi o mais resistente. Contudo, essas diferenças entre híbridos, não são consideradas relevantes em um primeiro momento, pois o gênero *Cephalosporium* não é considerado patógeno primário da cultura do milho. Além disso, sua colonização nos grãos pode ser desfavorecida devido a uma possível competição com espécies de *Fusarium* (TRENTO et al., 2002).



A incidência de *Cladosporium* sp. diferiu significativamente entre os híbridos 2B587 e 2B710, sobretudo em zona climática TA, na safra verão e em zona climática TT na safrinha, onde o 2B710 se comportou como o mais resistente (Figuras 2 e 3). Apesar das altas incidências de *Cladosporium* sp. observadas principalmente na safrinha nos dois híbridos cultivados em zonas climáticas TA e TB, não se julga, a princípio, essa alta incidência preocupante, uma vez que *Cladosporium* sp. é considerado patógeno secundário da cultura do milho.

Devido à freqüente interação observada entre o desempenho de híbridos de milho comerciais e zonas climáticas, pode se considerar os ensaios de faixa, realizados pela empresa Dow AgroSciences, essenciais para auxiliar no manejo de patógenos iniciadores de podridões de espiga. O híbrido 2B710, por exemplo, poderia ser melhor recomendado do que o 2B587 na safra verão para regiões localizadas em zonas climáticas TA que apresentassem problemas com a podridão rosada da espiga, causada por espécies do gênero *Fusarium* ou também poderia ser melhor recomendado para as zonas macro-climáticas (SA, SB e TA) que apresentassem problemas devido a ocorrência de *Stenocarpella* spp.

Tabela 2 - Incidência relativa (%) de fungos isolados de dois híbridos (2B587 e 2B710) cultivados sob três zonas macro-climáticas diferentes durante a safra verão de 2007/2008

Clima	2B587						2B710					
	FUS	PEN	STEN	ASP	CEP	CLAD	FUS	PEN	STEN	ASP	CEP	CLAD
SA	57 Aa	85 Aa	19,2 Bb	0,5 Aa	16 Aa	10 Aa	63,7Aa	96 Bb	5,2 Aa	0,7 Aa	10,7Aa	9 ABa
SB	64,3 ABa	94,2 Ba	10,2 Bb	2,2 ABb	16,2 Aa	34,8 Cb	65 Aa	94 ABa	4,8 Aa	0,3 Aa	12,8 ABa	22,3 Ba
TA	74,6 Ba	87,8 Aa	4,8 Ab	2,5 Bb	16,8 Aa	23,8 Bb	67,5 Aa	90,3 Aa	0,7Aa	1,0 Aa	17,5 Ba	5,5 Aa

\*Porcentagens seguidas pela mesma letra maiúscula indicam que não houve diferenças significativas entre os climas para o mesmo híbrido pelo teste de tukey a 5%

\*Porcentagens seguidas pela mesma letra minúscula indicam que não houve diferenças significativas entre os híbridos para o mesmo clima pelo teste de tukey a 5%

FUS: *Fusarium* spp; PEN: *Penicillium* spp; ASP: *Aspergillus* spp; STEN: *Stenocarpella* spp.; CEP: *Cephalosporium* sp; CLAD: *Cladosporium* sp.

Tabela 3 - Incidência relativa (%) de fungos isolados de dois híbridos (2B587 e 2B710) cultivados sob três zonas macro-climáticas diferentes durante a safrinha de 2007/2008

Clima	2B587						2B710					
	FUS	PEN	STEN	ASP	CEP	CLAD	FUS	PEN	STEN	ASP	CEP	CLAD
TA	61 ABa	98 Aa	0,8 Aa	0 Aa	13,5 Ba	72,1 Ba	37,3 Ab	97,5 Aa	0,7 Aa	0,8 Ab	17,5 Ca	71 Ba
TT	48,7 Aa	97,5 Aa	0 Aa	0 Aa	5,75 Aa	32,7 Aaa	37,7 Ab	97,2 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Ab	5,5 Ab
TB	55 ABa	99 Aa	0 Aa	0 Aa	14,5 Ba	71 Ba	40 Ab	96 Aa	0 Aa	0,5 Aa	5,5 Bb	62,5 Ba

\*Porcentagens seguidas pela mesma letra maiúscula indicam que não houve diferenças significativas entre os climas para o mesmo híbrido pelo teste de tukey a 5%

\*Porcentagens seguidas pela mesma letra minúscula indicam que não houve diferenças significativas entre os híbridos para o mesmo clima pelo teste de tukey a 5%

FUS: *Fusarium* spp; PEN: *Penicillium* spp; ASP: *Aspergillus* spp; STEN: *Stenocarpella* spp.; CEP: *Cephalosporium* sp; CLAD: *Cladosporium* sp.

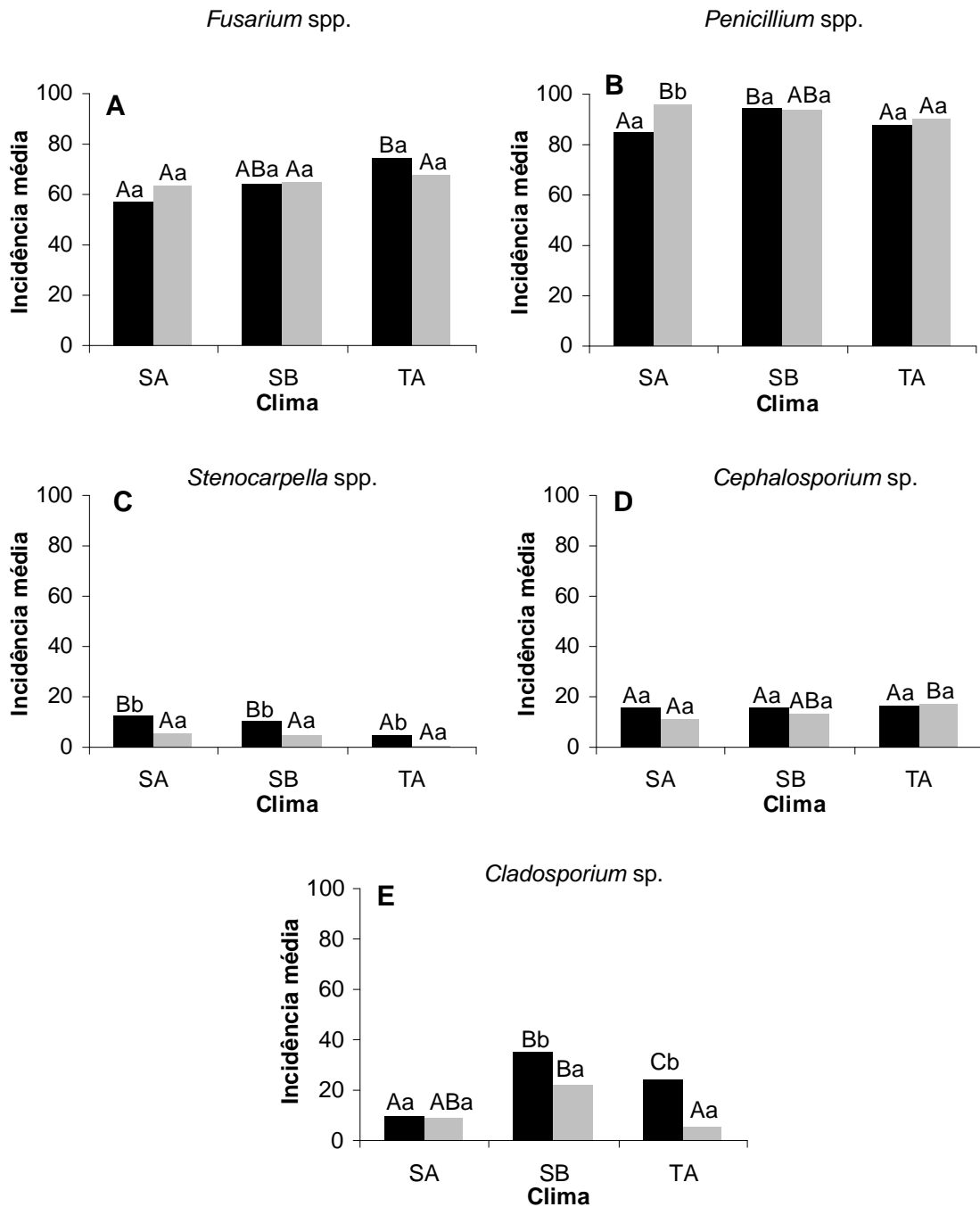


Figura 1 – Incidência média de fungos dos gêneros *Fusarium* spp. (A); *Penicillium* spp. (B); *Stenocarpella* spp. (C); *Cephalosporium* sp. (D) e *Cladosporium* sp. (E) nos híbridos 2B587 (■) e 2B710 (■) cultivados sob os climas SA (Sub –Tropical alta), SB (Sub-Tropical baixa) e TA (Tropical alta) na safra verão de 2007/2008. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os climas para o mesmo híbrido e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os híbridos para o mesmo clima pelo teste de tukey a 5%

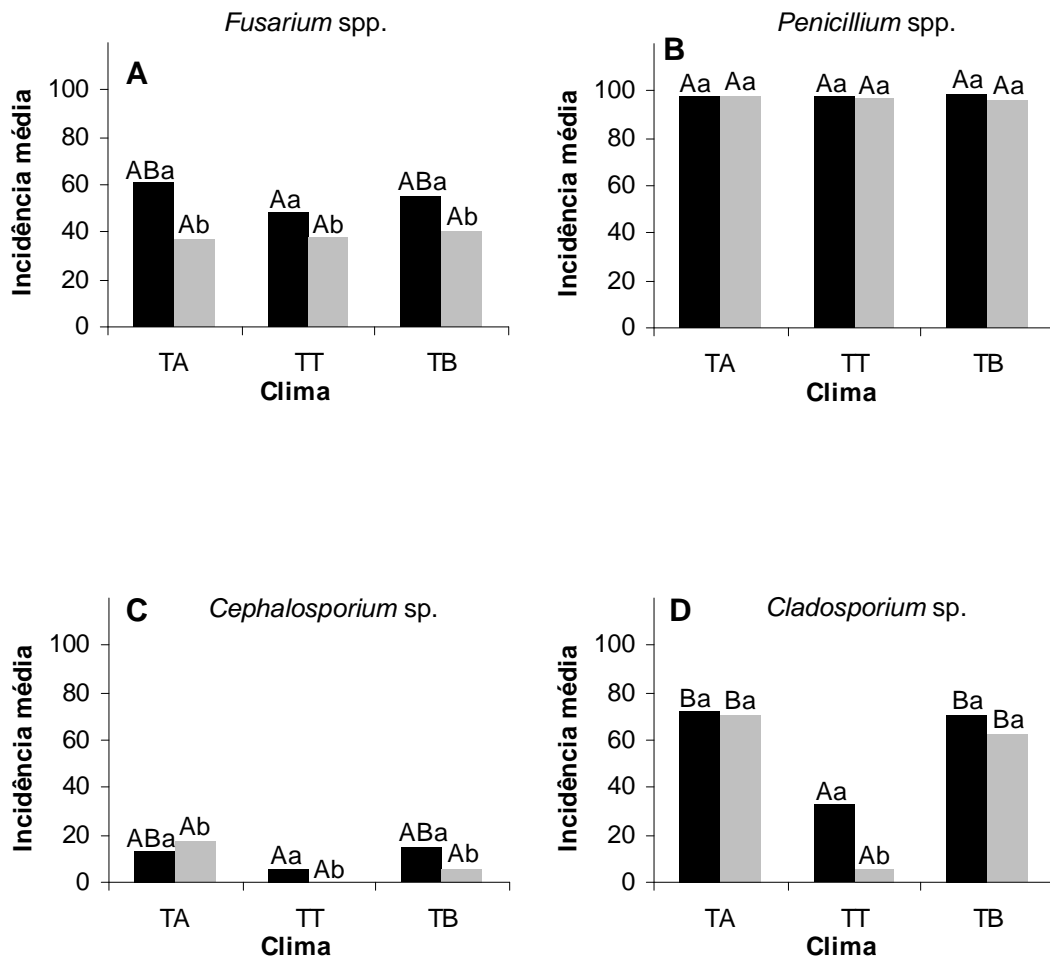


Figura 2 – Incidência média de fungos dos gêneros *Fusarium* spp. (A); *Penicillium* spp. (B); *Cephalosporium* sp. (C) e *Cladosporium* sp. (D) nos híbridos 2B587 (■) e 2B710 (▒) cultivados sob os climas TA (Tropical alta), TT (Tropical de transição) e TB (Tropical baixa) na safrinha de 2007/2008. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os climas para o mesmo híbrido e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os híbridos para o mesmo clima pelo teste de tukey a 5%

## 2.5 Conclusões

1 - *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram os principais fungos associados a espigas de milho.

2 - O híbrido 2B710 foi mais resistente a *Stenocarpella* spp. na safra verão e mais resistente a *Fusarium* spp e *Penicillium* spp. na safrinha, quando comparado ao 2B587 independente da zona climática e na safra verão, apresentou interação diferencial entre zonas climáticas apenas para as incidências dos gêneros fúngicos *Cephalosporium* e *Cladosporium*.

3 - O híbrido 2B587 por sua vez, apresentou interação diferencial entre as diferentes zonas climáticas para a incidência de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Stenocarpella* spp, *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* na safra verão.

4 – Na safra verão, a interação entre híbridos e zonas climáticas foi mais marcante do que na safrinha.

5 - Na safrinha, foram observadas interações entre híbridos e zonas climáticas apenas nas incidências dos gêneros *Cephalosporium* e *Cladosporium*.

## Referências

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. New York: Academic Press, 2005. 922 p.
- ALHADAS, R.V.; STUART, R.M.; BEUX, M.R.; PMENTEL, I.C. Contagem de bolores e leveduras em fubá e identificação de gêneros potencialmente toxigênicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 79-82. 2004.
- ALMEIDA, A.P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M.A.B.; SAWAZAKI, E.; ORTEGA, E.M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Journal Brazilian Society of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 321-326. 2000.
- ALMEIDA, A.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORRÊA, B. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3877-3882, 2002.
- BLANEY, B.J.; RAMSEY, M.D.; TYLER, A.L. Mycotoxins and Toxigenic fungi in insect-damage maize harvested during 1983 in Far North Queensland. Aust. **Journal Agriculture Research**, Punjab, v. 37. p. 235-244. 1986.
- BRABURN, N.; BLUNDEN, G.; COKER, R.D.; JEWERS, K. Aflatoxin contamination of maize. **Tropical Science**, London, v. 33, p. 418-428. 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365 p.
- BRASIL. Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 72, p. 1- 3, 1996.
- BRIEGER, F.G.; BLUMENSCHHEIN, A. Bica e origem do milho. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE POTASSA. **Cultura e adubação do milho**. São Paulo, 1996. p. 81-108.
- CASTRO, M.F.P.M.; SHEPHARD, G.S.; SEWRAM, V.; VICENTE, E.; MENDONÇA, T.A.; JORDAN, A.C. Fumonisins in Brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 7, p. 693-699, 2004.
- COBB, W.Y. Aflatoxin in the southeastern United States: was 1977 exceptional **Quarterly Bulletin of the Association of Food and Drug Officials**, Denver, v. 43, p. 99-107, 1977.

COMIGO: **Qualidade dos grãos será observada com rigor.** Disponível em <<http://www.comigo.com.br/noticias.php?codigo-210>>. Acesso em: 24 out. 2006.  
 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Décimo primeiro levantamento da safra, 2007/2008.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2008.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos em grãos e rações: Biologia, ocorrência e controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINASE MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia Avícolas, 1995. p. 15-20.

DESJARDINS, A.E.; PLATTENER, R.D.; LU, M.; CLAFLIN, L.E. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisina production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 953-958, 1998.

DESJARDINS, A.E. **Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology.** Saint Paul: The American Phytopathological Society. 2006. 260 p.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; HICKMANN, J.L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 137-141, 2000.

D'MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. Mycotoxins. **Animal Feed Science And Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 155-166, 1997.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços.** Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br>>. Acesso em: 01 maio 2006.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Office of the Chief Economist, World Agricultural Outlook Board, Prepared by the Interagency Agricultural Projections Committee. Long-term Projections Report OCE-2007-1. **Agricultural projections to 2016.** 110 p. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/publications/oce071/oce20071.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2007.

FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho.** Guaíba: Agropecuária 2000. 360 p.

FANCELLI, A.L.; LIMA, U.A. de. **Milho: produção, pré- processamento e transformação agroindustrial.** Piracicaba: FEALQ, 1982. 112 p. (Série Extensão Agroindustrial, 5).

FAO. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 18 ago. 2008.

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

FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. **DIACOM**: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1992. 22 p. (EMBRAPA. CNPSO. Circular Técnica, 10).

GONZÁLEZ, H.H.L.; RESNIK, S.L.; BOCA, R.T.; MARASAS, W.F.O. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 130, p. 29-36, 1995.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Incidência de fumonisina B<sub>1</sub>, aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KEDERA, C.J.; LESLIE, J.F.; CLAFLIN, L.E. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 1138, 1992.

LACEY, J.; RAMAKRISHNA, N.; HAMER, A.; MAGAN, N.; MARFLEET, C. Grain fungi. In: ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G.; MARTH, E.H. (Ed.). **Handbook of applied micology: foods and feeds**. New York: Dekker, 1991. p. 121-127.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Paranaset, 1997. 134 p.

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

LESLIE, J.F.; PEARSON, C.A.S.; NELSON, P.E. TOUSSON, T.A. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80. p. 343-350, 1990.

LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas. Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

MACHINSKI JR., M.; VALENTO SOARES, L.M. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 10, p. 875-879, 2000.

MACHINSKI JR., M.; VALENTO SOARES, L.M.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, n. 10, p. 1001-1007, 2001.



MAGNOLI, C.E.; ASTORECA, A.L.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M. Occurrence of ochratoxina and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 163, p. 249–260, 2007.

MARASAS, W.F.O. Medical relevance of mycotoxins in Southern Africa. **Microbiologie-Aliments Nutrition**, New Jersey, v. 6, p. 1-5, 1988.

MERONUCK, R.A. The significance of fungi in cereal grains. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 287-291, 1987.

MUNKVOLD, G.P.; HELLMICH, R.L.; RICE, L.G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 3, p. 130-138, 1999.

NELSON, P.E.; PLATTNER, R.D.; DARCY D. SHACKELFORD, D.D.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin B1 Production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 3, p. 984-989, 1992.

OERKE, E-C. Centenary review: crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 144, p. 31-43, 2006.

OLIVEIRA, MARIZE S.; PARDO, G.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y., HOMECHIN, M., KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisin freshly harvested corn of the State of Parana, Brazil. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 147, p. 139–148, 1999.

ONO, E.Y.S.; SASAKI, E.Y.; HASHIMOTO, E. H.; HARA, L.N.; CORRÊA, B.; ITANO, E.N.; SUGIURA, T.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisina contamination. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 11, p. 1081-1090. 2002.

OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides* – maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1695-1701, 2003.

- ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POZZI, C.R. Microbiota fúngica em três híbridos de milho recém colhidos e armazenados. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO "SAFRINHA", 3., 1995, Assis. **Anais...** Assis: Instituto Agrônomo de São Paulo, 1995. p. 105-110.
- ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POZZI, C.R.; SCHAMMASS, E.A.; NOGUEIRA, R.J.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 36. p. 75–87, 2000.
- PAYNE, G.A. Aflatoxins in maize. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 10, p. 423-440, 1992.
- PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V. de; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 477- 488.
- PINTO, N.F.J. Incidência de grãos ardidos em cultivares de milho precoce. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, n. 4, p. 433-436. 2001
- \_\_\_\_\_. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2005. 6 p. (Circular Técnica, 66).
- PINTO, N.F.J.A.; VERGAS, E.A.; PREIS, R.A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 304-306, 2007.
- RAMOS, C.R.B.A.; BRASIL, E.M.; GERALDINE, R.M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do Estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 95-102, 2008.
- REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 86 p.
- REYNOSO, M.M., TORRES, A.M., CHULZE, S.N. Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating populations among the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize. **Micological Research**, Amsterdam, v. 108, p. 154-160, 2004.
- RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1003-1009, 2005.

- SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E.I.; PEDROSO, M.O., GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n. 3, p. 327-331, 1989.
- SALGADO, I.M., CARVALHO, P.C.T. Fungos toxigênicos associados a cereais. Levantamento da microflora associada ao milho, trigo e arroz. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 11, p. 60-63, 1980.
- SARTORI, A.F.; REIS, E.M.; CASA, R.T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de Sementes para Plântulas de Milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 456-458. 2004.
- SCHIABEL, V.C. **Genética e toxicidade de *Fusarium verticillioides* em grãos de milho (*Zea mays* L.) sob plantio direto e convencional**. 2004. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- SHURTLEFF, M.C. **Compendium of corn diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. 105 p.
- TANAKA, M.A.S.; MAEDA, J.A.; PLAZAS, I.H.A.Z. Micoflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 501-508, 2001.
- TRENTO, S.M. **Distribuição de *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* nas principais regiões produtoras de sementes de milho no Brasil**. 2004. 66 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.
- TRENTO, S.M.; IRGANG, H.H.; REIS, E.M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.
- TSUNECHIRO, A.; PEREZ, L.H. Custo e rentabilidade da produção de milho safrinha em dois níveis tecnológicos. **Análises e Indicadores de Agronegócio**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 1-4, 2007.
- VARGAS, E.A.; PREIS, R.A.; CASTRO, L; SILVA, C.M.G. Co-ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, zearalenone and fumonisin B<sub>1</sub> in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.
- WIDSTROM, N. W. The aflatoxin problem with corn grain. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 56, p. 219-280, 1996.

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

### 3. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA GENÉTICA A *Fusarium verticillioides* EM LINHAGENS TROPICAIS DE MILHO

#### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar de forma comparativa linhagens de milho tropical para a resistência a podridão da espiga, incidência de grãos ardidos e produção de fumonisinas por *Fusarium verticillioides*. Para tanto, seis linhagens tropicais de milho, previamente classificadas como resistentes (R1, R2 e R3) e suscetíveis (S1, S2 e S3) a este patógeno, pela Dow AgroSciences foram cultivadas na estação experimental da companhia, localizada no município de Jardinópolis/SP durante a safra verão e safrinha de 2007. O ensaio consistiu de dois tratamentos (inoculados e não inoculados), sendo que a inoculação foi feita através da pulverização de 2mL de uma suspensão de  $10^6$  conídios/ml no estigma da espiga e nas espigas não inoculadas a doença ocorreu por meio de infecção natural. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com três repetições. Para avaliar a severidade, utilizou-se uma escala de notas (0 – 7), a incidência foi avaliada através da porcentagem de grãos ardidos em sub - amostras de 200 grãos de cada tratamento por repetição e para detectar os níveis de fumonisinas, todos os grãos colhidos de cada tratamento foram submetidos a moagem a 20 mesh, seguida pela adição de metanol 70%. A partir dessa solução determinou-se os níveis da toxina através do método de ELISA. Como nas duas safras não houve efeito da inoculação para as linhagens ( $P > 0,05$ ), os resultados, representam à média dos dois tratamentos. Na safra verão foram avaliadas 336 espigas, as quais receberam notas de severidade variando de 1,2 a 4,3, incidência de grãos sintomáticos de 13,7% a 46% e os níveis de fumonisinas detectados variaram de 5,5  $\mu\text{g/g}$  a 41  $\mu\text{g/g}$ . Na safrinha, não houve diferenças significativas entre as 517 espigas avaliadas comparadas às da safra verão para a severidade, mas houve uma redução significativa na incidência de grãos sintomáticos que variaram de 4,2% a 22,7% e redução nos níveis de fumonisina, os quais ficaram entre 1,5  $\mu\text{g/g}$  a 22,7  $\mu\text{g/g}$ . Nas duas safras, as linhagens R2 e R3 comportaram-se como mais resistentes a produção de fumonisinas e a R1 comportou-se como mais resistente a podridão da espiga e incidência de grãos ardidos, demonstrando que não houve correlação entre os três parâmetros avaliados. Isto indica que provavelmente há a necessidade de selecionar genótipos em programas de melhoramento genético, tanto para a resistência à podridão de espiga como para a produção de fumonisina no grão.

Palavras-chave: *Zea mays*; *Giberella fujikuroi*; Micotoxinas; Podridão da espiga

## Abstract

The aim of this study was to assess in a comparative way inbred lines of tropical maize to resistance to ear rot, incidence of damaged grains and production of fumonisins by *Fusarium verticillioides*. Six tropical inbred lines, previously classified as resistant (R1, R2 and R3) or susceptible (S1, S2 and S3) by Dow AgroSciences were cultivated in the experimental station of the company, localized in Jardinópolis / SP, during the normal season and the late-summer plantings in 2007. The tests were made by two kinds of treatment (inoculated and non inoculated), and the inoculation was made by spraying 2 mL of a  $10^6$  conidia/mL suspension onto the silk channel of the corn ear and, in the non inoculated ones, the disease occurred by natural infection. The experimental design was made in blocks with three random repetitions. The severity was evaluated using a scale of 0 to 7, the incidence was evaluated by counting the damaged grains in sub samples of 200 grains of each treatment and the levels of fumonisins were determined in grains milled to 20 mesh, followed by an extraction in 70% of methanol. Fumonisins levels were then determined through ELISA method. Since there were no inoculation effects for the inbred lines ( $P>0.05$ ), the results showed an average for both treatments. In the normal season harvest, 336 corn ears were evaluated. To these ears it was given a severity grade scale, ranging from 1,2 to 4,3. The incidence in symptomatic grain ranged from 13.7% to 46% and the detected fumonisins levels ranged from 5.5  $\mu\text{g/g}$  to 41  $\mu\text{g/g}$ . There were no relevant differences in the late-summer plantings among the 517 ears evaluated, compared to those from the normal season. Nevertheless, there was a significant decrease in symptomatic grains, ranging from 4,2 to 22,7% and a decrease in fumonisins levels, ranging from 1.5  $\mu\text{g/g}$  to 22,7  $\mu\text{g/g}$ . In both seasons, the R2 and R3 were the most resistant inbred lines to fumonisins production and R1 was the most resistant line to the corn ear rot and damaged grain incidence. The results indicated that it is necessary to select genotypes to genetic improvement programs, both for corn rot ear resistance as for the fumonisins production in grains.

Keywords: *Zea mays*; *Giberella fujikuroi*; Mycotoxins; Ear rot

## 3.1 Introdução

Em lavouras de grãos é comum a ocorrência de fungos toxigênicos, sendo que na cultura do milho, destacam-se espécies do gênero *Fusarium*. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, (teleomorfo: *Gibberella moniliformis*), *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (teleomorfo: *G. intermédia*) e *F. subglutinans* (teleomorfo: *G. subglutinans*) são responsáveis pela podridão rosada da espiga de milho. *F. verticillioides* e *F.*

*proliferatum* ainda estão associados à produção de fumonisinas, ao passo que não há relatos de produção desta toxina em concentrações elevadas por *F. subglutinans* (REYNOSO; TORRES; CHULZE, 2004).

As fumonisinas pertencem a uma família de micotoxinas que estão associadas as doenças em animais e humanos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Dentre as principais enfermidades causadas pelas fumonisinas estão leucoencefalomálacia em eqüinos (ROSS et al., 1992), edema pulmonar em suínos (COLVIN; HARRISON, 1992), além de uma relação com doenças em humanos, como câncer esofágico (RHEEDER et al., 1992) e defeito no tubo neural em fetos (HENDRICKS, 1999).

Órgãos internacionais como FDA (Food and Drug Administration - EUA) e União Européia estabeleceram limites de máxima concentração de fumonisinas em alimentos e rações. A FDA, por exemplo, sugeriu para as indústrias uma concentração máxima de 2 a 4 µg/g em farinha de milho e outros produtos a base de milho destinados a alimentação humana e a União Européia estabeleceu limites que variam de 2 µg/g em milho não processado a 0,5 µg/g de fumonisinas em flocos de milho (BUTRÓN et. al., 2006).

Condições ambientais como, tempo quente e seco, deixam a cultura do milho predisposta a infecção de *Fusarium* e contaminação por fumonisinas (CLEMENTS et al., 2003). Como exemplo, pode-se citar os prejuízos econômicos que ocorreram no Estado da Carolina do Norte nos Estados Unidos, na safra de 1998, onde as condições climáticas foram altamente favoráveis à contaminação por fumonisina, levando armazéns a rejeitarem lotes de milho pois estavam com níveis de fumonisinas acima de 15 µg/g (BUSH et al., 2004).

Embora a concentração de fumonisinas seja geralmente maior em grãos ardidos (DESJARDINS et al., 1998), também é comum detectar estas toxinas em grãos colonizados assintomaticamente por *Fusarium* spp., porém em concentrações bem menores (OREN et al., 2003). Práticas culturais como colheita precoce, plantio de cultivares adaptadas à região, adubação adequada, escolha de datas de plantio que ofereçam clima desfavorável para o desenvolvimento de *Fusarium* spp. e produção de

fumonisina, aplicadas isoladamente não são suficientes para prevenir a contaminação por micotoxina, (ROBERTSON et al., 2006).

A estratégia de controle, mais eficiente e de menor custo e impacto no ambiente, da podridão espiga causada por *Fusarium* spp., é a resistência genética (HEADRICK; PATAKY, 1989). Porém, ainda não foram encontrados híbridos de milho que sejam completamente resistentes à produção de micotoxinas. Além disso, nem sempre é possível estabelecer uma correlação entre sintomas de podridão rosada da espiga e níveis de fumonisina (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997), dificultando os trabalhos de melhoramento genético. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar de forma comparativa linhagens de milho tropical para a resistência a podridão de espiga, incidência de grãos ardidos e produção de fumonisinas.

## **3.2 Desenvolvimento**

### **3.2.1 Revisão Bibliográfica**

#### **3.2.1.1 *Fusarium verticillioides* como patógeno de milho**

No Brasil, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* são as espécies mais freqüentes em grãos ardidos, com prevalência da primeira (PINTO, 2001; TRENTO, 2002; SARTORI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005), ao passo que não há relatos de *F. proliferatum*. No entanto, a ocorrência desta espécie não pode ser descartada dada sua alta semelhança morfológica com *F. verticillioides*, fato que pode levar a classificações errôneas (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Na prática, análises morfológicas devem ser complementadas com análises moleculares para distinção destas espécies e também de outras pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi* (SUMMERELL et al., 2003).

*Fusarium verticillioides* é considerado um dos principais responsáveis pelas podridões de sementes, espigas e morte de plântulas de milho tanto no Brasil como em outros países. Vários autores, como Reid et al. (1999), consideram esse fungo endofítico e onipresente na cultura, contudo, nem sempre patogênico.



*F. verticillioides* pode produzir diferentes metabolitos tóxicos, como ácido fusárico, fusarinas e giberilinas. No entanto, as fumonisinas são consideradas as de maior relevância, principalmente a fumonisina B<sub>1</sub>, por ser o metabólito mais encontrado em grãos de milho infectados por este patógeno.

Esse fungo é transmitido pelas sementes e, neste caso, causa danos em plântulas. Em alguns casos, sementes infectadas podem originar infecções no colmo em plantas adultas. Podridões de espiga resultam de duas maneiras de infecção: através dos estigmas (“cabelo”) sob condições de alta umidade, ou através de ferimentos causados por insetos. Em ambos os casos, os propágulos infectivos são os conídios, provavelmente oriundos de restos culturais, mas também possivelmente de lesões das próprias espigas (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

O controle da podridão de espiga em lavouras comerciais se dá largamente através do uso de genótipos resistentes e de arquitetura desfavorável à infecção, como espigas que dobram para baixo após sua maturação. Não obstante, outras práticas culturais devam ser adotadas concomitantemente, como rotação de culturas com espécies não hospedeiras e redução da densidade de plantio (PINTO, 2005).

O melhoramento para resistência a *Fusarium* e suas toxinas é complicado, pois existem ao menos três tipos de interação entre o patógeno e o milho que resultam em diferentes situações, as quais exigem metodologias de avaliação variadas e nem sempre aplicáveis em larga escala. A primeira situação e a mais comum é a ocorrência de podridão rosada da espiga, grãos ardidos e produção de fumonisinas em altas concentrações, a segunda é a produção de fumonisinas em grãos, que apesar de infectados por *Fusarium*, por algum motivo não exibem sintomas visíveis da colonização fúngica e a terceira refere-se a ocorrência de grãos severamente danificados pela presença de *Fusarium*, mas que, no entanto, não apresentam ou apresentam níveis de fumonisinas em baixas concentrações (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; DESJARDINS; PLATTNER, 1998; MUNKVOLD, 1999; AFOLABI et al., 2007).

O comportamento de germoplasma tropical utilizado em programas de melhoramento no país frente a estes mecanismos de resistência é desconhecido, embora sabe-se que há materiais genéticos que podem ser usados como fontes de

genes de resistência para infecção de grãos e produção de fumonisinas (HOLLEY et al., 1989). Também não se conhece muito sobre o efeito das variáveis climáticas sobre o patossistema no que concerne a produção de fumonisinas em grãos infectados. Desta forma, ainda nenhum material foi relatado como altamente resistente a espécies de *Fusarium* e produção de micotoxinas. Na África, por exemplo, o Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) desenvolveu linhagens altamente produtivas e resistentes a produção de aflatoxinas, porém nenhuma linhagem foi desenvolvida para a resistência a podridão de espiga causada por *F. verticillioides* e produção de fumonisinas (AFOLABI et al., 2007).

### 3.2.1.2 Fumonisinas

O nome fumonisina deriva de *Fusarium moniliforme* (atualmente denominado *F. verticillioides*), de onde o primeiro membro desta classe de compostos tóxicos, fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), foi caracterizado. Trata-se de um diéster de propano- 1,2,3- ácido tricarbóxico e um 2S-amino-12,16R-dimetil-3S,5R,10R,14S,15R-pentahidroxiéicosano. A esta classe pertencem também outros dois membros, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>, que se distinguem molecularmente pela ausência de grupos livres de hidroxila. Juntas, estas toxinas respondem pela maioria das fumonisinas produzidas por espécies de *Fusarium* em grãos de milho. Existem ainda outras fumonisinas de menor importância, como FB<sub>4</sub> e fumonisinas das séries C e P (DESJARDINS, 2006).

Embora de nomenclatura química complexa, a estrutura das fumonisinas é simples e similar à de bases esfingóides. Esta semelhança estrutural sugeriu inicialmente que o efeito tóxico das fumonisinas poderia estar relacionado com alterações no metabolismo dos esfingolipídios, compostos presentes nas membranas celulares onde desempenham papel importante no crescimento, diferenciação e morte celular (LINO et al., 2004). De fato, hoje se sabe que essas toxinas inibem a enzima dihidroceramida sintase, responsável pelo terceiro passo da via da biossíntese *de novo* dos esfingolipídeos que cataliza a conversão de acetil-CoA e esfinganina em dihidroceramida. Esta inibição leva ao acúmulo de esfinganina, que é altamente tóxica e

a uma depleção de esfingolipídios complexos, resultando em alterações nas estruturas de membranas e nas funções de receptores, como por exemplo, de receptor de folato (MERRIL, 2002).

Atualmente, toxicoses causadas por fumonisinas, especialmente FB<sub>1</sub>, são consideradas um problema global (PLACINTA et al., 1999; DESJARDINS, 2006). Isto se deve grandemente ao fato de as espécies toxigênicas de *Fusarium* serem também patógenos de cereais. O efeito carcinogênico hepático de fumonisinas foi demonstrado experimentalmente em roedores. Por outro lado, há casos históricos de associações epidemiológicas entre consumo de fumonisinas e doenças em animais, incluindo o homem. Essas toxinas atingem principalmente cavalos e coelhos que se alimentam com milho ou ração contaminada com a micotoxina, provocando leucoencefalomalácia (amolecimento e cavitações na substância branca do cérebro), resultando em morte. No Brasil, as primeiras análises sobre níveis de contaminação de amostras de ração de milho associados à leucoencefalomalácia eqüina se deram entre 1985 e 1990 (SYDENHAM et al., 1992), evidenciando que contaminação por fumonisinas é um problema também no país. Trabalhos posteriores, embora em número reduzido, confirmaram a extensão do problema. Há ainda relatos da ação da fumonisina em suínos, causando inchaço nos pulmões — "edema pulmonar dos suínos". Já em humanos, em regiões da África do Sul onde o milho é componente constante da dieta de populações tribais, há uma correlação muito alta entre câncer do esôfago e alta contaminação do milho com *F. verticillioides* e fumonisinas (MUNKVOLD; DEJARDINS, 1997).

Trabalhos realizados em âmbito nacional demonstraram que este é um problema de grande relevância também no país. Orsi et al. (2000) relataram freqüências de 90,2% e 97,4% de contaminação por FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em amostras de grãos armazenados de milho híbrido. Vargas et al. (2001) analisaram 214 amostras de milho não processado e coletadas em armazéns de diferentes localidades do país e encontraram níveis variando de 200 a 6.100 µg/kg de FB<sub>1</sub> em 99% das amostras. Ono et al. (2006) chegaram a resultados similares ao relatarem níveis de 130 a 20.380 µg/kg de fumonisinas em 109 amostras de milho coletadas no Paraná. Finalmente, Castro et al.

(2004) mostraram que a contaminação não se restringe aos grãos e se estende aos produtos processados derivados do milho. Os autores analisaram teores de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em diferentes produtos coletados em 13 cidades do estado de São Paulo e encontraram contaminação em 100% de amostras de cereal infantil tipo C (compostos por farinha de milho, açúcar, amido, sal e outros sais minerais, aromatizantes e traços de glúten), de alimento infantil instantâneo à base de milho e de mingau de milho. Os valores médios totais variaram de 437 a 2.242 µg/kg. Nesse ponto, convém ressaltar que não há um limite aceitável estabelecido mundialmente para as fumonisinas. Porém, em países como os Estados Unidos, por exemplo, além do manejo adotado para reduzir a contaminação no milho, ainda foram estabelecidas normas que regulamentam a quantidade máxima de fumonisina que pode estar presente no alimento ou ração. Assim, a “U.S Food and Drug Administration” recomenda que os níveis desta toxina devem estar abaixo de 4µg/g em derivados de milho destinados ao consumo humano. Recentemente, a União Européia também estabeleceu normas para o limite máximo de fumonisinas, nas quais ficou estabelecido que a concentração máxima permitida da toxina em milho não processado é de 2 µg/g; 1 µg/g em farinha de milho; 0,05 µg/g em flocos de milho; 0,4 µg/g em alimento a base de milho destinados a adultos e 0,2 µg/g em alimentos destinados à alimentação infantil (BUTRÓN et al., 2006).

Quinze espécies de *Fusarium* foram relatadas como produtoras de fumonisinas, mas este universo é reduzido apenas para *F. verticillioides* e *F. proliferatum* no âmbito sócio-econômico mundial, pois são as únicas que combinam alto nível de produção de toxinas, ampla distribuição geográfica, ocorrência freqüente como patógenos de milho e clara associação com toxicoses animais (RHEEDER et al., 2002). Contudo, já foram relatados que compostos similares às moléculas de fumonisinas podem ser produzidos por algumas espécies de *Alternaria* (BOTTINI; GILCHRIST, 1981 apud DEJARDINS, 2006).

Os grãos podem ser contaminados por esta toxina ainda no campo quando as condições ambientais são favoráveis à infecção fúngica (alta umidade relativa) e os níveis de fumonisina podem aumentar consideravelmente nos grãos armazenados se

as condições de armazenamento também forem favoráveis (alto teor de umidade nos grãos- 18 a 23% umidade) (FIGUEIRA et al., 2003).

Como espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisina ocorrem naturalmente no campo, sendo que algumas espécies ainda possuem uma relação endofítica com o milho, a completa eliminação desta toxina da dieta torna-se praticamente impossível. Desta forma, os esforços são direcionados para o desenvolvimento de práticas de manejo que ajudem a minimizar a contaminação de alimentos e rações. Dentre as principais práticas adotadas no campo para minimizar os danos provocados por *Fusarium* spp. estão: a utilização de variedades que favoreçam a decumbência das espigas; controle de insetos e pássaros no campo, a fim de evitar que esses organismos provoquem ferimentos na espiga, favorecendo a entrada do patógeno; não colheita de espigas danificadas e nem de plantas acamadas; eliminação de restos de cultura, uma vez que esse fungo apresenta atividade saprofítica; adubação e espaçamento equilibrados, entre outros (EMBRAPA, 2006).

### **3.3 Material e métodos**

#### **3.3.1 Material vegetal**

O material vegetal utilizado na avaliação da resistência a *Fusarium verticillioides* foi constituído por seis linhagens tropicais de milho pertencentes a empresa Dow AgroSciences, sendo que três dessas linhagens foram previamente classificadas pela empresa como resistentes (R1, R2 e R3) e três foram classificadas como suscetíveis (S1, S2 e S3) a *Fusarium verticillioides*.

As seis linhagens foram cultivadas no dia 27 de novembro de 2007 para a avaliação da safra verão e para a avaliação da safrinha as mesmas foram cultivadas em primeiro de abril de 2008 na estação experimental da empresa localizada no município de Jardinópolis/ SP.

### 3.3.2 Avaliação da resistência de linhagens tropicais de milho à *Fusarium verticillioides*

Isolados de *Fusarium* obtidos junto às micotecas do Laboratório de Genética Molecular (ESALQ-USP) e do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos (UFLA) foram previamente caracterizados quanto à espécie *Fusarium verticillioides*, por meio de análises morfológicas, através da observação das estruturas características da espécie (LESLIE; SUMMERELL, 2006) em microscópio óptico e por análises moleculares através de reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) com iniciadores específicos para a espécie (MULÉ et al., 2004). A identificação de isolados potencialmente toxigênicos foi feita através de reações de PCR, utilizando iniciadores específicos para a região do gene FUM-5 (responsável pela produção de fumonisina) (BLUHM et al., 2002). Foram selecionados dez isolados caracterizados como *F. verticillioides* potencialmente toxigênicos para constituir o inóculo.

Para a obtenção da suspensão de inóculo, transferiu-se cinco discos de micélio de 5 mm de diâmetro de cada isolado para placas de Petri contendo meio BDA (batata dextrose ágar) de maneira a formar cinco repetições de cada isolado de *F. verticillioides* que em seguida foram incubados a 25 °C sob luz fluorescente e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro por um período de 15 dias.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas constituídas por 12 tratamentos (6 linhagens inoculadas e 6 não inoculadas) e três repetições. Cada parcela foi constituída por uma linhagem (resistente ou suscetível) e as subparcelas foram representadas por linhas de 20 plantas (espaçadas a 0,76m) que receberam os tratamentos (inoculadas e não inoculadas). Desta forma, foram formadas 18 parcelas, sendo três para cada uma das linhagens. Entre as subparcelas havia uma linha (da mesma linhagem) como bordadura e um híbrido foi utilizado para isolar a área experimental (Figura 3).

A inoculação na safra verão foi realizada em 07/02/2008 e na safrinha em 03/07/2008, períodos que coincidiram entre o sétimo e o décimo dia após o início de florescimento, época em que a planta encontra-se mais suscetível (MUNKVOLD, 1997;

DREPPER, 1990) e consistiu em pulverizar no estigma (cabelo) da espiga, 2 ml de suspensão com  $10^6$  conídios/ml e em seguida cobrir com saco plástico por 48 horas. De acordo com Warren (1978), esta técnica é recomendada para diferenciar hospedeiros resistentes de suscetíveis à *F. verticillioides*, uma vez que simula uma infecção natural, pois não causa ferimentos.

A avaliação na safra verão foi realizada em 11/03/2008 e na safrinha em 21/08/2008, datas que corresponderam ao estágio de maturidade fisiológica e consistiu na colheita de 10 espigas/ tratamento/repetição, as quais foram avaliadas em relação à severidade e incidência. A estimativa de severidade foi feita através de notas com o auxílio de uma escala diagramática já utilizada em experimentos semelhantes (REID et al., 1999; DESJARDINS; PLATTNER, 2000; AFOLABI et al., 2007), a qual consiste de 7 notas, sendo 1 = 0% de infecção, 2 = 1 a 3 %, 3 = 4 a 10%, 4 = 11 a 25%, 5 = 26 a 50%, 6 = 51 a 75% e 7 = 76 a 100%. A incidência foi avaliada através da porcentagem de grãos ardidos em sub amostras de 200 grãos de cada tratamento por repetição.

### **3.3.3 Determinação de níveis de Fumonisin**

A avaliação da resistência de genótipos tropicais de milho à produção de fumonisina foi feita através do método de ELISA que consiste no emprego do kit Myco Fumonisin<sup>TM</sup> (Strategic Diagnostics Inc., E.U.A.). O teste é um ensaio competitivo imuno-solvente baseado na habilidade da toxina livre extraída da amostra competir com a toxina conjugada à enzima para a ligação com anticorpo presente nos poços do kit. Esse teste é calibrado para uma mistura de fumonisina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> na razão 5:2:1, respectivamente.

As amostras foram representadas pela mistura dos grãos obtidos das três repetições dos tratamentos (inoculado e não inoculado) de cada linhagem (R1, R2, R3, S1, S2 e S3). O primeiro passo para essa análise consistiu na moagem das amostras a 20 mesh e após mistura para homogeneização, uma sub-amostra de 500g foi separada e, a partir desta, uma porção de 20g foi pesada em erlenmeyers para a realização do teste.

A extração das fumonisinas foi realizada em 100mL de uma solução de metanol 70%. Em seguida, as amostras foram agitadas em agitador orbital a 28 rpm por 25 minutos e, ao término dessa etapa, os extratos permaneceram sem agitação por 2 a 3 minutos, para decantação. Passado esse tempo, 15mL do extrato foi filtrado com filtro tipo Whatman® #1 e recolhido em tubo falcon de 50 mL. O teste foi realizado com o filtrado final.

Após a extração, 50 µL do filtrado foram transferidos para poços contendo anticorpos anti-fumonisina para que a toxina presente nas amostras competisse com a toxina conjugada à enzima (Horseradish peroxidase - HRP) por sítios de ligação do anticorpo presente nos poços do kit. Foi então realizada breve agitação e posterior incubação por 5 minutos e, após essa etapa, os poços foram lavados e secos. Uma solução contendo fluoróforo foi adicionada para reagir e se ligar ao conjugado enzima-toxina e nova agitação e incubação de 5 minutos foi realizada. Ao término da incubação, uma solução foi adicionada a fim de parar a reação. Essas reações produziram uma coloração azul, sendo que quanto mais escura a reação, menos fumonisinas na amostra. Os resultados dos testes foram quantificados em leitor de ELISA Expert Plus da Asys Hitech GmbH, Áustria, com filtro de 650 nm.

Embora este não seja um método tão preciso quanto ao método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), este kit foi aprovado pelo GIPSA (Grain Inspection, Packers and Stokyards Administration), agência atrelada ao USDA (United States Department of Agriculture) nos Estados Unidos e, responsável por, dentre outras atividades, coordenar programas de monitoramento, revisões e investigações. O GIPSA determina os métodos mais justos e competitivos para a comercialização de produtos agrícolas como produtos armazenados, aves, carne, cereais, sementes oleaginosas entre outros, para garantir benefício para produtores e consumidores.



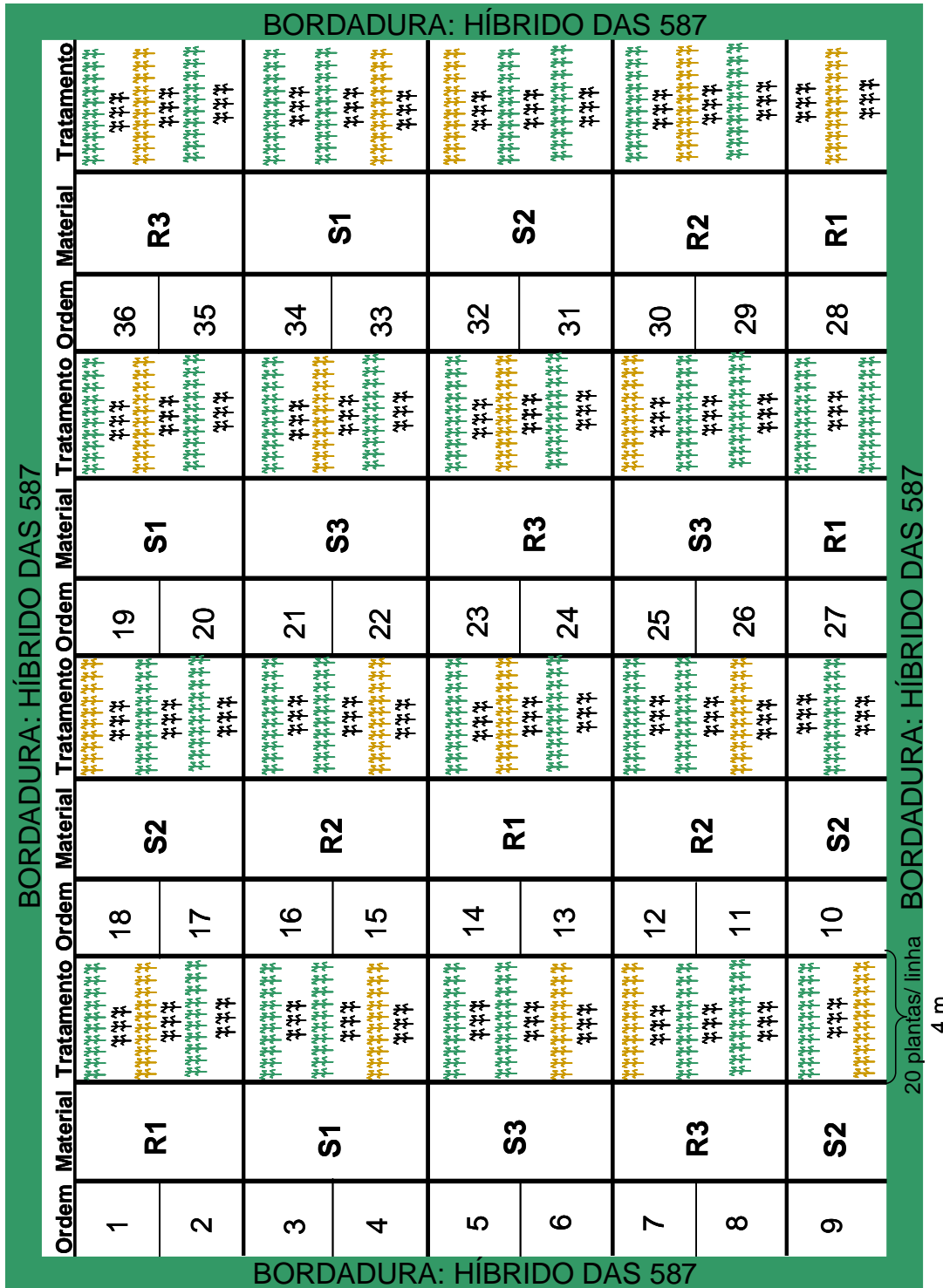


Figura 3 - Croqui do ensaio de campo da safra verão e safrinha. Plantas em verde (espigas inoculadas com suspensão de esporos de *Fusarium verticillioides*) plantas em amarelo (espigas inoculadas com água) e plantas em preto (bordadura)

### 3.3.4 Análises Estatísticas

O programa SISVAR (Sistema para Análise de Variância) foi utilizado para determinar se houve diferenças entre podridão de espiga, incidência de grãos ardidos e produção de fumonisina entre os tratamentos (inoculado e não inoculado) na mesma linhagem e para avaliar se houve diferenças para resistência dentre estes três componentes entre as linhagens. Os dados de incidência foram transformados pela equação  $y = \log_{10} (1 + \text{incidência de grãos ardidos})$  conforme descrito por Afolabi et al. (2007) e os dados de concentrações de fumonisina foram transformados pela equação  $y = \ln (\text{concentração de fumonisina} + 1)$  conforme descrito por Kleinschmidt et al. (2005) a fim de normalizar os resíduos. As análises foram feitas através do teste de Tukey a 5% de significância.

## 3.4 Resultados e Discussão

### 3.4.1 Avaliação da resistência a *Fusarium verticillioides* a podridão de espiga e produção de fumonisinas

Na safra verão, foram analisadas 336 espigas de milho entre os seis materiais testados para a resistência a infecção causada por *Fusarium verticillioides*, tanto pela infecção natural como pela inoculação. Nessa safra a temperatura média na estação experimental foi de 24,3 °C e a umidade relativa de 80%. Na safrinha, 517 espigas das mesmas linhagens foram analisadas entre os seis materiais (inoculado e não inoculado). Durante a condução deste ensaio, a temperatura média na estação experimental foi de 21° C e a umidade relativa de 66%.

Como não houve diferenças significativas entre a linhagem (R1, R2, R3, S1, S2 e S3) inoculada e a não inoculada em relação a severidade da podridão da espiga, incidência de grãos ardidos e produção de fumonisinas, os resultados foram discutidos com base na média dos tratamentos inoculados e não inoculados de cada linhagem (Figura 4). Esse resultado era esperado, uma vez que, *F. verticillioides* é o patógeno

mais comum em espigas de milho (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997) além, de ser responsável por severas infecções sob condições naturais (AFOLABI, 2007). Munkvold et al. (1997) atribuíram este fato a possíveis isolados endêmicos introduzidos no campo por insetos. Nesse sentido, a inoculação foi apenas para assegurar que haveria infecção na espiga por este patógeno, caso ocorressem variações climáticas inesperadas que prejudicassem a ocorrência e infecção de *F. verticillioides* na cultura.

Os resultados apresentados corroboram parcialmente com a classificação apontada pela empresa Dow AgroSciences em relação aos níveis de resistência das linhagens, uma vez que, a severidade de podridão nas espigas, incidência de grãos sintomáticos e níveis de fumonisinas nas linhagens classificadas como resistentes foram, em média, mais baixas nas duas safras do que nas linhagens classificadas como suscetíveis. Entre as linhagens suscetíveis, houve uma alta variação, sendo que alguns resultados puderam ser comparados aos das linhagens resistentes como, por exemplo, na safra verão, a severidade nas linhagens S1 e S2 pôde ser comparada à linhagem R2 e na safrinha, a severidade registrada para S1 foi igual à registrada para R2 (Figura 5 e Tabela 4).

Na safra verão a severidade na espiga variou de 1,2 a 4,3 entre as linhagens, a incidência de grãos sintomáticos variou de 13,7 a 46% e os níveis de fumonisinas detectados entre as linhagens variaram de 5,5 µg/g a 41 µg/g. Na safrinha, não houve diferenças significativas comparada à safra verão para a severidade, a qual foi de 1,3 a 4,5, mas houve uma redução na incidência de grãos sintomáticos que variaram de 4,2% a 22,7% e redução nos níveis de fumonisina, os quais ficaram entre 1,5 µg/g a 22,7 µg/g (Tabela 4). Ainda, comparando as duas safras, foi possível notar que apenas as linhagens R2, R3 e S1 responderam as variações climáticas da safra verão e safrinha, sendo que a R1 foi a mais resistente para severidade de podridão da espiga e incidência de grãos sintomáticos, independente da época do ano (Tabela 4). Para os níveis de fumonisinas, R2 foi a mais resistente na safra verão e R3, a mais resistente na safrinha. Dentre as linhagens suscetíveis, S3, na safra verão, foi a que apresentou maior nota de severidade de podridão na espiga e maior incidência de grãos ardidos, porém menores níveis de fumonisinas foram detectados nesta linhagem quando

comparados as linhagens S1 e S2. Na safrinha, a linhagem S2 foi a mais suscetível as três variáveis analisadas quando comparada às linhagens S1 e S3.

As reduções de incidências de grãos sintomáticos e níveis de fumonisinas observados na safrinha, em comparação à safra verão, ocorreram em todas as linhagens (Figuras 6 e 7), já a redução de severidade foi observada apenas nas linhagens R2, R3 e S1 (Figura 5). Isso pode ser atribuído, em parte, pelas condições ambientais que desfavoreceram o desenvolvimento da doença e conseqüentemente a produção de fumonisinas. A temperatura média e umidade relativa durante a condução do ensaio da safra verão foram mais elevadas tornando propício o desenvolvimento do fungo (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). As variações observadas nas duas safras, também foram observadas em outros trabalhos como o de Afolabi et al. (2007), que apontaram, em um experimento realizado na África do Sul, uma variação de severidade de 1,6 a 3, incidências de grãos ardidos de 2,4% a 51,9% e níveis de fumonisinas de 1,1 µg/g até 104 µg/g em grãos provenientes de espigas submetidas à inoculação artificial ou obtidos através de infecção natural. Ainda, Clements et al. (2003) demonstraram a ocorrência de altas incidências de grãos com sintomas de infecção por *Fusarium*, além de detectar uma ampla variação nos níveis de fumonisina em grãos de diferentes híbridos avaliados na estação experimental da Universidade de Illinois- EUA. No Brasil não há relatos de ensaios de inoculação de *F. verticillioides* em linhagens de milho, mas há alguns trabalhos realizados por meio de análises visuais de grãos e testes de sanidade a fim de identificar a micoflora presente, além de ensaios *in vitro* para detectar e quantificar níveis de fumonisina. Hermanns et al. (2006) avaliaram amostras de grãos de milho colhidas em diferentes estádios fenológicos no Estado do Rio Grande do Sul e observaram o gênero *Fusarium* presente em 90% das amostras colhidas na fase de maturidade fisiológica, além de detectarem teores de fumonisinas de até 3 µg/g. Pinto et al. (2007), através de análise de sanidade de sementes avaliaram a incidência de grãos ardidos em cultivares de milho semeadas no Estado de Minas Gerais e detectaram porcentagens de grãos ardidos acima do máximo tolerado (6%) por algumas agroindústrias brasileiras de grãos ardidos no lote (MENEGAZZO,

2000 apud PINTO et al., 2007) e, apontaram níveis de fumonisinas variando de 2 µg/g a 7 µg/g.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre severidade de podridão de espiga, incidência de grãos ardidos e níveis de fumonisinas entre as linhagens na safra verão, já na safrinha foi observado correlação entre incidência de grãos sintomáticos e níveis de fumonisinas. Tanto na safra verão como na safrinha, nenhuma das linhagens avaliadas comportou-se como mais resistente ou mais suscetível para os três parâmetros avaliados. Neste ponto, destaca-se a dificuldade encontrada na prática de se detectar genótipos resistentes a podridão de espiga, incidência de grãos ardidos e níveis de fumonisinas. A linhagem R1, por exemplo, apresentou a menor severidade de podridão de espiga (1,2) na safra verão, a menor porcentagem de grãos ardidos, na safra verão (13,7%) e safrinha (4,2%), mas não apresentou os menores níveis de fumonisinas, nem na safra verão (10,7 µg/g) e nem na safrinha (5,4 µg/g). Estatisticamente não houve diferenças entre as linhagens resistentes para os níveis de fumonisina, sobretudo na safra verão (Tabela 4), onde a linhagem R2 apresentou 5,5 µg/g e a R3 6,6 µg/g, mas se for considerar os níveis recomendados desta toxina pela FDA (Food and Drug Administration) de 2 µg/g a 4 µg/g (CFSAN 2001) e União Européia de 0,4 µg/g (BUTRÓN et al., 2006) para consumo humano e os níveis recomendados para ração animal de 5 µg/g para eqüinos; 10 µg/g para suínos; 50 µg/g para gado e aves domésticas (MILLER et al., 1996 apud MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997), a diferença entre a concentração de fumonisinas da linhagem R1 para a R2 seria extremamente relevante. Assim como na safrinha, também seria relevante a diferença entre os níveis de fumonisinas nas linhagens R1 (5,4 µg/g) e R3 (1,5 µg/g).

Apesar da linhagem R3, na safrinha, ter apresentado menor nota de severidade de podridão de espiga (Figura 5 e Tabela 4) e a menor concentração de fumonisinas (Figura 7 e Tabela 4), nesta linhagem foi observada a maior porcentagem de grãos ardidos (Figura 6 e Tabela 4), demonstrando que em certas situações, *F. verticillioides* pode provocar sintomas no grão, mas por algum motivo não produz fumonisinas. Isso pode ser relacionado, em parte, aos sintomas causados na espiga pela infecção de *F. subglutinans* (não produtor de fumonisinas) que são bem similares aos causados por *F.*

*verticillioides* (produtor de fumonisinas), (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Contudo, esta hipótese não pode se generalizada, uma vez que, Desjardins et al. (1998) relacionaram níveis de fumonisina com sintomas visíveis de podridão em espigas analisadas individualmente e também altos níveis de fumonisina ( $> 138 \mu\text{g/g}$ ) foram correlacionados com grãos sintomáticos e baixas concentrações desta toxina ( $< 1 \mu\text{g/g}$ ) correlacionadas à grãos sem sintomas. Além disso, outros trabalhos descritos na literatura relatam que geralmente há uma correlação entre níveis de fumonisinas e grãos ardidos (DESJARDINS; PLATTENER, 2000; CLEMENTS et al., 2004; AFOLABI et al., 2007).

A falta de uma exata correlação entre as interações que *F. verticillioides* pode estabelecer com o milho, também foi observada por Afolabi et al. (2007) que relataram a não correlação entre a severidade de podridão de espiga e os níveis de fumonisina nos grãos provenientes de espigas inoculadas artificialmente. Clements et al. (2004), também não observaram uma correlação consistente entre produção de fumonisina e severidade de podridão da espiga e Kleinschmidt et al. (2005) relataram que em alguns híbridos dos quais foram observados baixa severidade de podridão da espiga, os níveis de fumonisina excederam a concentração de  $4 \mu\text{g/g}$ , sugerindo que pode haver concentrações de fumonisina em grãos assintomáticos acima do recomendado para o consumo humano. Também em outros trabalhos foram relatados altos níveis desta toxina em grãos assintomáticos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; CLEMENTS et al., 2004; AFOLABI, 2007).

Esses resultados sugerem que fatores genéticos que afetam a infecção no grão podem operar independentes daqueles que afetam a produção de fumonisinas (AFOLABI et al., 2007), indicando a necessidade de selecionar genótipos em programas de melhoramento genético, para a resistência à podridão de espiga e à produção desta toxina no grão.

De maneira geral, nas duas safras as linhagens R1, R2 e R3 foram mais resistentes as interações entre *F. verticillioides* e milho comparadas com as linhagens S1, S2 e S3. Entretanto, deve-se considerar que estes resultados foram obtidos com base em análises realizadas em um único ano e, portanto, são necessários repetições

ao longo dos anos para se certificar que o comportamento dessas linhagens não serão alterados pelas flutuações climáticas características de cada ano. Outros fatores, além do clima, também devem ser considerados como ocorrência de insetos, os quais desenvolvem um importante papel na infecção do milho por *F. verticillioides* devido aos ferimentos que causam na planta, favorecendo a entrada do patógeno. Além disso, o conteúdo do grão também pode afetar a produção de fumonisinas. Em uma análise feita com grãos de milho moídos, detectou-se fumonisinas principalmente nas porções de glúten, fibra e gérmen do grão, enquanto que na porção amido, os níveis desta toxina foram mais baixos (BENNETT et al., 1996 apud MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997), indicando que possivelmente em grãos que acumulam maior teor de amido pode ocorrer menores concentrações de fumonisinas. Também, substâncias presentes nos grãos como amilopectinas podem induzir a síntese de fumonisina por *F. verticillioides* (BLUHM; WOLOSHUK, 2005).

Diante do exposto, conclui-se que as linhagens R2 e R3 podem representar fontes de resistência, oferecendo genes de resistência, a podridão rosada da espiga e a produção de fumonisinas para ser incorporados em germoplasmas comerciais, principalmente em materiais adaptados a safra verão e, que as linhagens R1, R2 e R3 podem ser indicadas para o desenvolvimento de genótipos resistentes para a safrinha. Contudo, deve-se considerar as características agronômicas (produção, cor do grão, resistência ao frio, seca, entre outros) de cada linhagem que interessam para cada região. Deste modo, práticas como remoção de grãos ardidos e/ou danificados durante o beneficiamento e condições de armazenamento que dificultem o desenvolvimento do fungo, como teor de umidade abaixo de 18% (KOMMEDAHL; WINDELS, 1981 apud MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997), podem representar uma importante medida na redução dos níveis de fumonisinas no lote ou evitar que esses níveis aumentem durante o armazenamento do grão respectivamente.

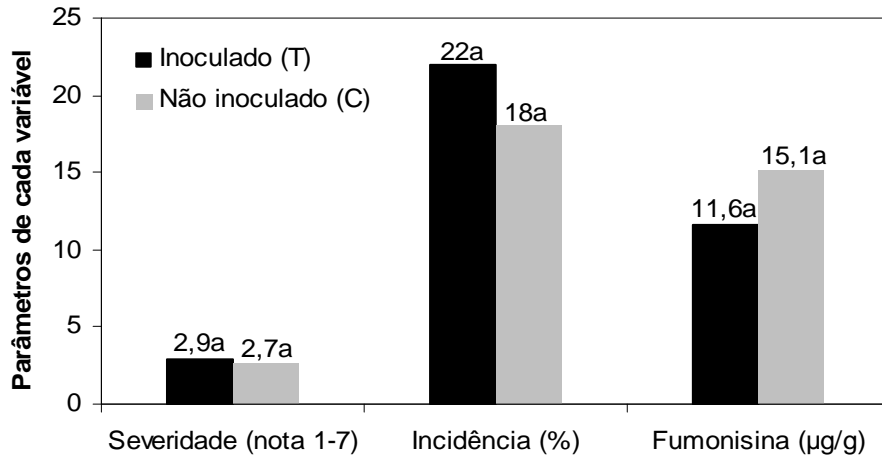


Figura 4 – Eficiência da inoculação de *F. verticillioides* (T) em relação a infecção natural (C) para a avaliação da severidade de podridão de espiga, incidência de grãos ardidos e níveis de fumonisinas.

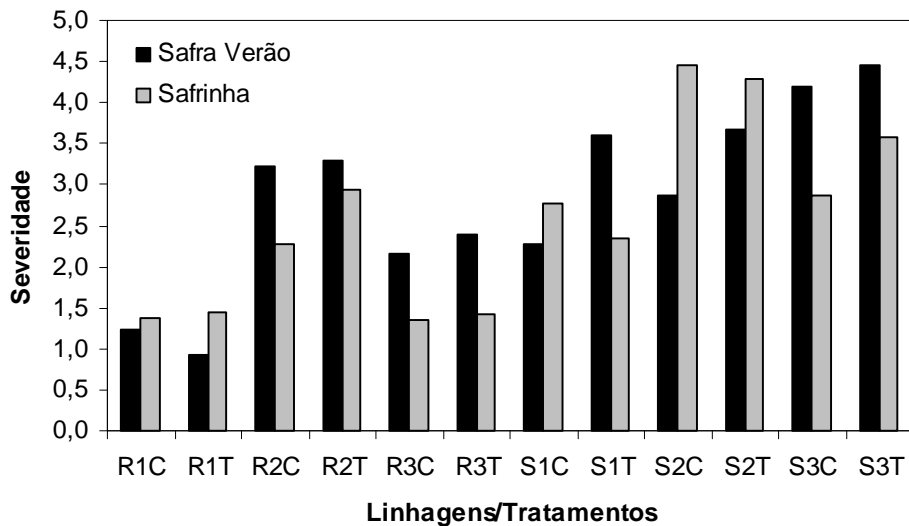


Figura 5 - Severidade de podridão da espiga em três linhagens de milho resistentes (R1, R2 e R3) e três linhagens suscetíveis (S1, S2 e S3) submetidas a inoculação (T) com *Fusarium verticillioides* e infecção natural (controle: C) na safra verão e safrinha de 2008 e avaliada por escala de notas



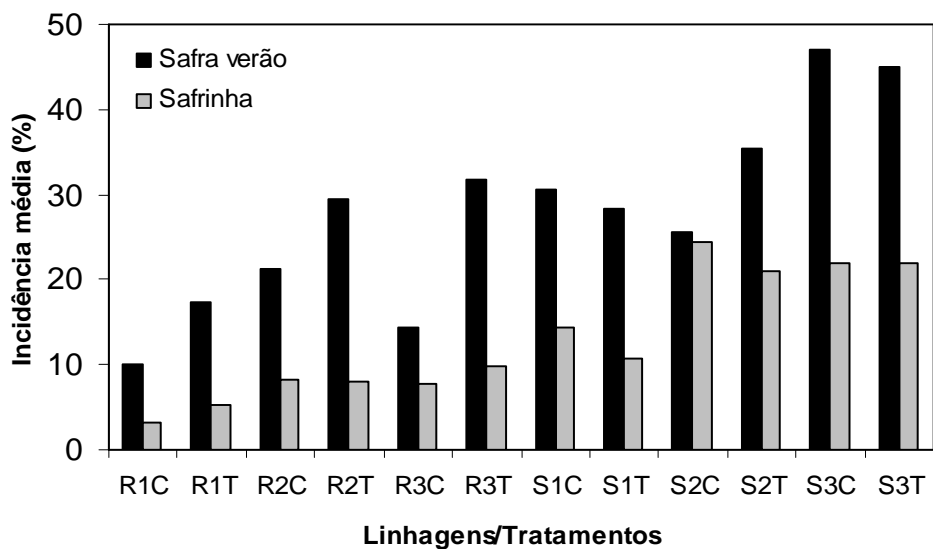


Figura 6 - Incidência de grãos ardidos em três linhagens de milho resistentes (R1, R2 e R3) e três linhagens suscetíveis (S1, S2 e S3) submetidas à inoculação (T) com *F. verticillioides* e infecção natural (controle: C) na safra verão e safrinha de 2008

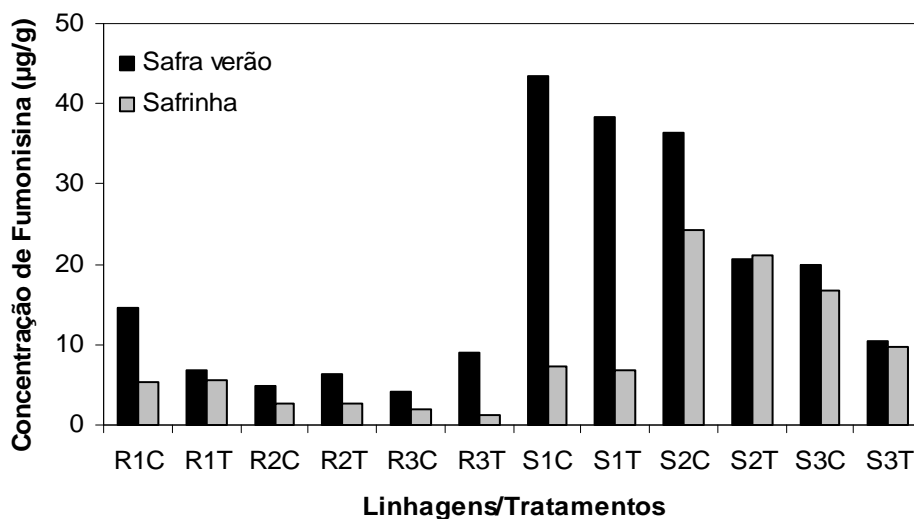


Figura 7 - Níveis de fumonissina ( $B_1$ ,  $B_2$  e  $B_3$ ) em três linhagens de milho resistentes (R1, R2 e R3) e três linhagens suscetíveis (S1, S2 e S3) submetidas a inoculação artificial (T) e infecção natural (controle: C) de *F. verticillioides* na safra verão e safrinha de 2008.

Tabela 4 - Severidade de podridão na espiga, variância da severidade, incidência de grãos sintomáticos, teste de sanidade e determinação da concentração de fumonisina em linhagens de milho infectadas por *Fusarium verticillioides* através de infecção natural e inoculação artificial nas safras verão e safrinha de 2008

Linhagem Tratamento	Safrinha 2008			Safrinha 2008		
	Severidade <sup>x</sup> podridão de espiga	Incidência de grãos sintomáticos (%)	Fumonisinas (µg/g)	Severidade <sup>x</sup> podridão de espiga	Incidência de grãos sintomáticos (%)	Fumonisinas (µg/g)
R1	1,2 A a	13,7 A a	10,7 B a	1,5 A a	4,2 A a	5,4 A abc
R2	3,3 A bc	25,3 B ab	5,5 B a	2,7 A ab	8,0 A ab	2,7 A ab
R3	2,3 A ab	23 B ab	6,6 B a	1,3 A a	8,8 A ab	1,5 A a
S1	3,4 A bc	29,4 B b	41,0 B c	2,7 A ab	12,6 A ab	7,2 A bc
S2	3,3 A bc	30,5 A b	28,6 A bc	4,5 B c	22,7 A b	22,7 A d
S3	4,3 B c	46,0 A b	15,0 A ab	3,0 A b	22,0 A b	13,2 A cd

As diferenças entre safras estão representadas por letras maiúsculas e as diferenças entre linhagens estão representadas por letras minúsculas  
<sup>x</sup> Severidade de podridão de espiga causada por *F. verticillioides* em espigas avaliadas durante a colheita através de uma escala de nota, onde 1 = sem sintomas, 2 = 1 a 3%, 3 = 4 a 10%, 4 = 11 a 25%, 5 = 26 a 50%, 6 = 51 a 75% e 7 = 76 a 100% de sintomas na espiga (REID et al., 1999)

### 3.5 Conclusões

1 - As linhagens R2 e R3 comportaram-se como mais resistentes a produção de fumonisinas nas duas safras.

2 - A linhagem R1 comportou-se como mais resistente a podridão da espiga e incidência de grãos ardidos nas duas safras.

3 - Não houve correlação entre severidade de podridão da espiga, incidência de grãos ardidos e níveis de fumonisinas.

4 - Fatores genéticos que afetam a infecção no grão operaram independentes daqueles que afetam a produção de fumonisinas.

### Referências

AFOLABI, C.G.; OJIAMBO, P.S.; EKPO, E.J.A.; MENKIR, A.; BANDYOPADHYAY, R. Evaluation of maize inbred lines for resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in grain in tropical Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 3, p. 279-286, 2007.

BLUHM, B.H.; WOLOSHUK, C.P. Amylopectin induces fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium verticillioides* during colonization of Maize kernels. **Molecular Plant-microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 12, p. 1333-1339, 2005.

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

BUSH, B.J.; CARSON, M.L.; CUBETA, M.A.; HAGLER, W.M.; PAYNE, G.A. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 88-93, 2004.

BUTRÓN, A.; SANTIAGO, R.; MANSILLA, P.; PINTOS-VARELLA, C.; ORDÁS, A.; MALVAR, R.A. Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 6113-6117, 2006.

- CASTRO, M.F.P.M.; SHEPARD, G.S.; SEWRAN, V.; VICENTE, E.; MENDONÇA, T.A.; JORDAN, A.C. Fumonisin in brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 7, p. 693-699, 2004.
- CLEMENTS, M.J.; MARAGOS, C.M.; PATAKY, J.K.; WHITE, D.J. Sources of resistance to fumonisin accumulation in grain and *Fusarium* ear kernel rot of corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 251-260, 2004.
- CLEMENTS, M.J.; KLEINSCHMIDT, C.E.; MARAGOS, C.M.; PATAKY, J.K.; WHITE, D.G. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 147-153, 2003.
- COLVIN, B.M.; HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, Den Haag, v.117, p. 79-82, 1992.
- DESJARDINS, A.E. ***Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2006. 260 p.
- DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R. Fumonisin B<sub>1</sub>-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 5773-5780, 2000.
- DESJARDINS, A.E.; PLATTNER, R.D.; LU, M.; CLAFLIN, L.E. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 953-958, 1998.
- DREPPER, W.J.; RENFRO, B.L. Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, p. 952:956, 1990
- EMBRAPA MILHO E SORGO. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br>>. Acesso em: 01 maio 2006.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; COELHO, A.R.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisin. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.
- HEADRICK, J.M.; PATAKY, J.K. Resistance to kernel infection by *Fusarium moniliforme* in inbred lines of sweet corn and the effect of infection on emergence. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, n. 11, p. 887-892, 1989.
- HENDRICKS, K. Fumonisin and neural tube defects in South Texas. **Epidemiology**. Baltimore, v. 10, p. 198-200, 1999.

HERMANN, G.; PINTO, F.T.; KITAZAWA, S.E.; NOLL, I.B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 7-10, 2006.

HOLLEY, R.N.; HAMILTON, P.B.; GOODMAN, M.M. Evaluation of tropical maize germ plasm for resistance to kernel colonization by *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, n. 7, p. 578-580, 1989.

KLEINSCHMIDT, C.E.; CLEMENTS, M.J.; MARAGOS, C.M.; PATAKY, J.K.; WHITE, D.G. Evaluation of food-grade dent corn hybrids for severity of *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in grain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 291-297, 2005.

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

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

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

MULÉ, G.; GONZÁLEZ-JAÉN, M.T.; HORNOK, L.; NICHOLSON, P.; WAALEIJK, C. Advances in molecular diagnosis of toxigenic *Fusarium* species: a review. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, n. 4, p. 316-323, 2004.

MUNKVOLD, G.P.; CARLTON, W.M. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 211-216, 1997.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisins in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.

MUNKVOLD, G.P.; HELLMICH, R.L.; RICE, L.G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 130-138, 1999.

MUNKVOLD, G.P.; HELLMICH, R.L.; SHOWERS, W.B. Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 10, p. 1071-1077, 1997.

ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M.; VIZONI, E.; SIGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 63-71, 2006.

OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides* – maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3. p. 1695-1701, 2003.

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

PINTO, N.F.J. Incidência de grãos ardidos em cultivares de milho precoce. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, n. 4, p. 433-436, 2001.

\_\_\_\_\_. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2005. 6 p. (Circular Técnica, n.66).

PINTO, N.F.J.A.; VERGAS, E.A.; PREIS, R.A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 304-306, 2007.

PLACINTA C.M.; D'MELLO; J.P.F.; MACDONALD A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 21-37, 1999.

REID, L.M.; NICOL, R.W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J.D.; YOUNG, J.C.; ATEWART, D.W.; SCHAAF SMA, A.W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 1028-1037, 1999.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 253-257, 1992.

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

RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1003-1009, 2005.

REYNOSO, M.M.; TORRES, A.M.; CHULZE, S.N. Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating populations among the *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize. **Micological Research**, Amsterdam, v. 108, p. 154-160, 2004.

ROBERTSON, L.A.; KLEINSCHMIDT, C.E.; WHITE, D.G.; PAYNE, G.A.; MARAGOS, C.M.; HOLLAND, J.B. Heritabilities and correlations of *Fusarium* ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 353–361, 2006.

ROSS, P.F.; RICE, L.G.; OSWEILER, G.D.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; WILSON, T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 117, p. 109–114, 1992.

SARTORI, A.F.; REIS, E.M.; CASA, R.T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 456-458, 2004.

SUMMERELL, B.A.; SALLEH, B.; LESLIE, J.F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 117-128, 2003.

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

TRENTO, S.M.; IRGANG, H.H.; REIS, E.M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.

VARGAS, E.A.; CASTRO, P.L.; SILVA, C.M.G. Co-occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, zearalenona and fumonisin B<sub>1</sub> in Brazilian corn. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

WARREN, H.L. Comparison of normal and high lysine maize inbreds for resistance to kernel rot caused by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 68, p. 1331-1335, 1978.