

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ADRIANA MICHELI

Fungos com potencial toxigênico associados a grãos ardidos de milho

Maringá

2016

ADRIANA MICHELI

Fungos com potencial toxigênico associados a grãos ardidos de milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de Concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Dauri José Tessmann

Co-Orientador: Álvaro Figueiredo dos Santos

Maringá

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

Micheli, Adriana
M623f Fungos com potencial toxigênico associados a grãos ardidos de milho / Adriana Micheli. -- Maringá, 2016.
72 f. : il. color., figs., tabs.
Orientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann.
Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Figueiredo dos Santos.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.
1. Milho (*Zea mays* L.) - Grãos ardidos - Fungos - Análise. 2. Blotter test. 3. Análise filogenética. I. Tessmann, Dauri José, 1962-, orient. II. Santos, Álvaro Figueiredo dos, coorient. III Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 23.ed. 633.15

MBT-004013

ADRIANA MICHELI

**FUNGOS COM POTENCIAL TOXICOGÊNICO ASSOCIADOS A GRÃOS ARDIDOS
DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, na Área de Concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 20 de abril de 2016.

Prof. Dr. **Dauri José Tessmann**
Presidente



Prof^a. Dr^a. **Adriana Gonela**
Membro



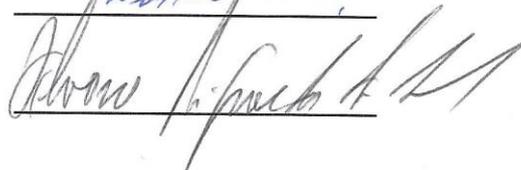
Prof^a. Dr^a. **Kátia Regina Freitas Schwan Estrada**
Membro



Prof. Dr. **William Mário de Carvalho Nunes**
Membro



Pesq. Dr. **Álvaro Figueredo dos Santos**
(vídeo conferência)
Membro



DEDICATÓRIA

À minha mãe **Sueli**,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual de Maringá**, por meio do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade do aprendizado e realização do doutorado. Ao **Professor Dauri José Tessmann**, pelo apoio, amizade e confiança.

À **Fundação ABC** que contribuiu à realização deste trabalho, em especial à equipe do **Laboratório de Entomologia e Fitopatologia** que não mediu esforços para auxiliar na execução das atividades.

Ao colega **Rudimar Molin** por ceder as amostras dos experimentos de campo para análise. Aos colegas **Paulo Gallo**, **Carlos André Schipanski** e **Rodrigo Tsukahara** pelo auxílio na interpretação dos resultados.

Ao Professor **Hilton Thadeu do Couto** pelo apoio nas análises estatísticas.

À colega de curso **Cleilton Novais da Silva** pelo auxílio prestado nas análises moleculares.

Fungos com potencial toxigênico associados a grãos ardidos de milho

RESUMO

A ocorrência de grãos ardidos é um indicador importante da qualidade do milho. Embora diversos fungos com potencial toxigênico estejam associados a grãos ardidos, pouco se sabe em relação à composição das espécies fúngicas e dos fatores que influenciam a composição dessas espécies nas diferentes regiões produtoras de milho do país. Tais informações são importantes no estudo de medidas de redução de grãos ardidos e micotoxinas no milho. Assim, este estudo analisou as espécies de fungos com potencial toxicogênico em amostras de grãos ardidos, oriundas de duas safras e três locais de cultivo, e onze híbridos de milho. Para a quantificação dos fungos presentes nas amostras foi utilizado o teste de Blotter, com a identificação morfológica dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e das espécies *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis*) e *S. macrospora* (= *D. macrospora*). A identificação das espécies de *Fusarium* foi realizada por PCR com *primers* espécie-específicos e sequenciamento parcial do gene *tef-1*. Isolados das espécies *F. verticillioides*, *Fusarium* sp., outras espécies do complexo *F. fujikuroi* e espécies não identificadas foram caracterizados filogeneticamente com base em sequências de DNA do gene *tef-1* (~ 650 pb). Os resultados da incidência de fungos nas amostras de grãos ardidos pelo teste de Blotter foram analisados como experimento fatorial, com os seguintes fatores: safra (2011/12 e 2012/13), local (Arapoti, Castro e Tibagi) e híbridos de milho (onze híbridos comerciais). Foram observados efeitos significativos ($P \leq 0,05$) de safra, local e genótipos, e das interações entre esses fatores, na incidência de todos os fungos analisados exceto para *S. maydis*, para o qual o efeito do fator safra não foi significativo. A incidência de fungos nos grãos ardidos não está relacionada com a incidência de grãos ardidos nas amostras analisadas. Os índices de incidência de *Fusarium* spp. variaram de 8,6 a 19,9%; de *S. macrospora* de 0 a 22,4%; de *S. maydis* de 0,5 a 2,9%; de *Penicillium* spp. de 1,6 a 6,9 e de *Aspergillus* spp. de 0,1 a 2,5%. A identificação molecular de espécies de *Fusarium*, realizada com base na análise de culturas monospóricas obtidas de grãos ardidos de dois híbridos na safra 2012/13 e de quatro híbridos na safra 2014/15, em dois locais (Castro e Arapoti), revelou que em ambas as safras, a espécie predominante foi *F. verticillioides* (92,6 e 92,3%) em Arapoti e (56,7 e 51,6%) em Castro; seguido por *Fusarium* sp. (7,4 e 7,7%) em Arapoti e (20,0 e 18,8%) em Castro, outras espécies do complexo *F. fujikuroi* (0,0 %) em Arapoti e (13,3 e 28,1%) em Castro, *F.*

proliferatum (0,0%) em Arapoti e (3,3 e 0,0%) em Castro, *Fusarium incarnatum* (0,0%) em Arapoti e (0,0 e 1,6%) em Castro. A análise filogenética com base em sequencias de DNA do gene *tef-1 α* não mostrou evidências de estruturação de *F. verticillioides* em subpopulações; enquanto que para *Fusarium* sp. e outras espécies do complexo *F. fujikuroi* houve evidências de estruturação em subpopulações.

Palavras-chave: Blotter test. Grãos ardidos. Fungos. PCR.

Fungi with toxicogenic potential associated with corn rot grains

ABSTRACT

The occurrence of rot or stained grains is an important indicator of the quality of maize. Several fungi with toxicogenic potential are associated with damaged kernels, however little is known regarding the composition of species and the factors that influence the composition of species in the different regions that produce corn in the country. Such information is important in the study of measures of reduction of rot grains and mycotoxins in maize. This study analyzed the fungal species with toxicogenic potential in samples of rot grains, from different hybrids grown in three locations in Paraná, in two crops. For quantification of genera and species of fungi present in the samples was employed Blotter test with morphological identification of *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* and species *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis*) and *S. macrospora* (= *D. macrospora*). The identification of *Fusarium* species was performed by PCR with species-specific primers and partial sequencing of TEF-1 gene. Isolates of the species *F. verticillioides*, *Fusarium* sp., other species of *F. fujikuroi* complex and non-identified species were phylogenetically characterized by DNA sequences of the TEF-1 gene (~ 650 pb). The analysis of the incidence of fungi in rot grain samples by Blotter test were subjected to statistical analysis of factorial experiments, in which the factors considered were: crop year (2011/12 and 2012/13), local (Arapoti, Castro and Tibagi) and corn hybrids (eleven commercial hybrids). There was a significant effect ($p \leq 0.05$) of the crop, location and genotypes, and the interactions between these factors, on the incidence of all the fungi analyzed except to *S. maydis*, for which the effect of the crop year were not significant. The incidence of fungi in rot grains is not related with the incidence of rot grains in the analyzed samples. The rates of these fungi ranged from 8.6 to 19.9% for *Fusarium* spp; 0 to 22.4% for *S. macrospora*; 0.5 to 2.9% *S. maydis*; 1.6 to 6.9 for *Penicillium* spp; and from 0.1 to 2.5% for *Aspergillus* spp. The molecular identification of *Fusarium* species was based on spore isolates obtained from analysis of rot grains of two hybrids in the crop 2012/13 and four hybrids in the crop 2014/15 at two sites (Castro and Arapoti), showed that for both crops, the predominant species was *F. verticillioides* (92.6 and 92.3%) in Arapoti, and (56.7 and 51.6%) in Castro, followed by *Fusarium* sp. (7.4 to 7.7%) in Arapoti, and (20.0 and 18.8%) in Castro, other species of the *F. fujikuroi* complex (0.0%) in

Arapoti, and (13.3 to 28.1%) in Castro, *F. proliferatum* (0.0%) in Arapoti and (3.3 and 0.0%) in Castro, *Fusarium incarnatum* (0.0%) in Arapoti and (0.0 and 1.6%) in Castro. The phylogenetic analysis based on DNA sequences of the TEF-1 gene did not show evidence of structuring of *F. verticillioides* in subpopulations; while for *Fusarium* sp.e other species of *F. fujikuroi* complex was evidence of structure in subpopulations.

Keywords: Blotter test. Rot grains. Fungi. PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fungos produtores de micotoxinas, micotoxicoses e espécie animal mais sensível.....	12
Tabela 2	Correlação entre a ocorrência de grãos ardidos e a incidência de fungos (%)	38
Tabela 3	Análise de variância de experimento fatorial de incidência de <i>Aspergillus</i> sp. (ASPER), <i>Penicillium</i> spp. (PENIC), <i>Fusarium</i> spp. (FUSAR), <i>Stenocarpella macrospora</i> (SMACRO) e <i>S. maydis</i> (SMAY) em grãos ardidos de milho, com os fatores: safra agrícola, local de cultivo e genótipo (híbrido) comercial de milho.....	38
Tabela 4	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o local, safra 2011/12.....	39
Tabela 5	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o local, safra 2012/13.....	39
Tabela 6	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o local.....	40
Tabela 7	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com a safra.....	40
Tabela 8	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido na safra 2011/12.....	42
Tabela 9	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido na safra 2012/13.....	43
Tabela 10	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido em Castro – PR.....	43
Tabela 11	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido em Arapoti – PR.....	44
Tabela 12	Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido em Tibagi – PR.....	44
Tabela 13	Local e ano de coleta dos isolados obtidos em grãos ardidos de milho.....	58
Tabela 14	Identificação molecular de espécies de isolados de <i>Fusarium</i> obtidos de grãos ardidos em dois híbridos de milho nos municípios de Castro e Arapoti, Paraná, na safra 2012/13.....	59
Tabela 15	Identificação molecular de espécies de isolados de <i>Fusarium</i> obtidos de grãos ardidos em quatro híbridos de milho nos municípios de Castro e Arapoti, Paraná, na safra 2014/15.....	60

Tabela 16	Identificação molecular utilizando primers com especificidade para espécies de <i>Fusarium</i> , de isolados de grãos ardidos em dois híbridos de milho nos municípios de Castro e Arapoti, Paraná, na safra 2012/13.....	63
Tabela 17	Identificação molecular utilizando primers com especificidade para espécies de <i>Fusarium</i> , de isolados de grãos ardidos em dois híbridos de milho nos municípios de Castro e Arapoti, Paraná, na safra 2014/15.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Grãos ardidos em milho.....	6
Figura 2	Colônias de fungos em placa de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) A. Colônia de <i>S. maydis</i> , B. Colônia de <i>S. macrospora</i>	8
Figura 3	Podridão de Diplodia ou Podridão branca da base da espiga.....	10
Figura 4	Podridão de Fusarium ou Podridão rosada da base da espiga.....	19
Figura 5	Podridão de Giberela ou Podridão rosada da ponta da espiga.....	20
Figura 6	Espiga de milho com grãos infectados com <i>Aspergillus</i> spp.....	21
Figura 7	Espiga de milho com grãos infectados com <i>Penicillium</i> spp.....	23
Figura 8	Localização geográfica dos três locais, sendo: (2) Arapoti, (3) Tibagi e (4) Castro,Paraná.....	33
Figura 9	Temperaturas médias anuais nos três locais, sendo: (1) Castro, (2) Arapoti e (3) Tibagi, Paraná.....	34
Figura 10	Teste de Blotter realizado para identificação de fungos associados à grãos ardidos de milho.....	36
Figura 11	Temperatura média do ar (°C) e precipitação pluvial (mm) observada entre 01 de setembro de 2011 e 30 de abril de 2012, nos municípios de Castro, Arapoti e Tibagi, Paraná.....	41
Figura 12	Temperatura média do ar (°C) e precipitação pluvial (mm) observada entre 01 de setembro de 2012 e 30 de abril de 2013, nos municípios de Castro, Arapoti e Tibagi, Paraná.....	41
Figura 13	Cultura monospórica de um isolado de <i>Fusarium</i> spp. para posterior extração de DNA.....	54
Figura 14	Árvore filogenética de isolados de <i>Fusarium verticillioides</i>	67
Figura 15	Árvore filogenética de isolados de <i>Fusarium</i> sp., outras espécies do complexo <i>F. fujikuroi</i> e espécies não identificadas.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	A cultura do milho no Brasil.....	3
2.2	Grãos ardidos de milho.....	5
2.3	Principais fungos toxicogênicos associados à grãos ardidos de milho.....	7
2.3.1	O gênero <i>Stenocarpella</i>	7
2.3.1.1	A podridão de <i>Diplodia</i> ou podridão branca da base da espiga.....	9
2.3.2	O gênero <i>Fusarium</i>	13
2.3.2.1	Identificação de espécies de <i>Fusarium</i> através de técnicas moleculares.....	17
2.3.2.2	Doenças causadas por <i>Fusarium</i> spp. no milho.....	18
2.3.2.2.1	Podridão de <i>Fusarium</i> ou podridão rosada da base da espiga.....	18
2.3.2.2.2	Podridão de <i>Giberela</i> ou podridão rosada da ponta da espiga.....	19
2.3.3	O gênero <i>Aspergillus</i>	20
2.3.4	O gênero <i>Penicillium</i>	22
2.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
3	CAPÍTULO 1 Fungos associados a grãos ardidos de milho oriundos do Sul do Paraná.....	28
3.1	RESUMO.....	29
3.2	ABSTRACT.....	30
3.3	INTRODUÇÃO.....	31
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.4.1	Dados das amostras.....	33
3.4.2	Desenho experimental e análise dos dados.....	35
3.4.3	Incidência de fungos associados aos grãos ardidos.....	35
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.6	CONCLUSÕES.....	46

3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
4	CAPÍTULO 2 Identificação molecular e caracterização filogenética de espécies de <i>Fusarium</i> associadas a grãos ardidos de milho.....	48
4.1	RESUMO.....	49
4.2	ABSTRACT.....	50
4.3	INTRODUÇÃO.....	51
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.4.1	Dados das amostras.....	53
4.4.2	Obtenção de isolados monospóricos de <i>Fusarium</i> spp.....	53
4.4.3	Extração de DNA de isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	55
4.4.4	Identificação molecular.....	55
4.4.5	Análise de dados.....	56
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.5.1	Identificação da espécie.....	58
4.5.2	Caracterização filogenética.....	65
4.6	CONCLUSÕES.....	69
4.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
5	CONCLUSÕES FINAIS	72

INTRODUÇÃO GERAL

O milho é um importante cereal para alimentação humana e animal em todo o mundo. Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, após EUA e China, com a produção de 83 milhões de toneladas na safra 2015/16 (CONAB, 2016).

Os grãos de milho podem ser danificados por insetos e fungos. As injúrias nos grãos que resultam do ataque de fungos e que ocasionam a alteração da cor, fermentação em toda a área do germe ou em qualquer outra parte do endosperma são conhecidos como grãos ardidos (DINIZ, 2002). A presença de grãos ardidos ou mofados é quantificada e descontada no momento da comercialização de grãos, o que implica na redução da rentabilidade econômica para os produtores.

Os fungos que atacam os grãos de milho e que causam grãos ardidos, também podem produzir micotoxinas, as quais são deletérias a saúde humana e animal. Nesse sentido é importante destacar que o Brasil está implementando uma regulamentação progressiva dos limites máximos tolerados de micotoxinas em alimentos no período de 2011 a 2017, estabelecida pela ANVISA através da Resolução RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011, e inclui grãos de milho e seus subprodutos. As micotoxinas alvo são aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A, deoxinivalenol, fumonisinas (B1 + B2) e zearalenona.

Os principais fungos que causam grãos ardidos pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Stenocarpella*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais também são produtores de micotoxinas. Por exemplo, *Aspergillus flavus* é produtor de aflatoxinas; os fungos do complexo *Fusarium fugikuroi*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium subglutinans* produzem fumonisinas, o complexo *Fusarium graminearum* produz micotoxinas tricotecenos como: deoxinivalenol e nivalenol; *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* produzem diplodinas e *Penicillium* spp. produzem ocratoxinas (DESJARDINS, 2006).

A literatura científica sobre a composição de espécies fúngicas associadas a grãos ardidos no Brasil é limitada e não é recente, ficando restrita a identificação morfológica dos fungos. Não obstante o avanço em termos de ferramentas para identificação molecular existe poucos estudos com esta abordagem molecular na identificação de fungos associados a grãos de milho no Brasil. Ademais, o conhecimento da composição de fungos associados a grãos ardidos permite a adoção de medidas que visam a redução de grãos ardidos e micotoxinas.

Assim, este estudo explorou a hipótese de que as espécies fúngicas com potencial toxigênico associado a grãos ardidos sofre influência do local onde é produzido, do ano de cultivo e pelo genótipo de milho. Este estudo está apresentado em dois capítulos, em que o primeiro teve por objetivo analisar a influência de fatores como ano e local de cultivo, assim como do genótipo de milho, na composição de espécies de fungos com potencial toxigênicos presentes em grãos ardidos de milho no sul do Paraná. No segundo capítulo, o objetivo foi realizar a identificação molecular das espécies de *Fusarium* de isolados obtidos de amostras de grãos ardidos e proceder a caracterização filogenética de isolados de *F. verticillioides* e outras espécies de *Fusarium* com base em sequencias de DNA de uma porção do gene *tef-1* (GEISER et al, 2004).

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura de milho no Brasil

O milho é uma gramínea pertencente à Família das Poaceae, Tribo *Maydeae*, Gênero *Zea*, cientificamente denominado *Zea mays* L., originada do Teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrad.). É um cereal cultivado em grande parte do mundo, com grande importância na alimentação humana e na produção animal. Na safra 2014/15 foram cultivados 15.466,6 mil hectares desse cereal, com produtividade de 5.400 quilos por hectare (CONAB, 2016), o que permite ao Brasil ocupar a terceira posição dentre os principais produtores mundiais de milho, atrás dos Estados Unidos e China.

Uma das principais características na produção brasileira é o cultivo de milho em duas safras anuais. A primeira, denominada de safra, realizada na época tradicional, que varia entre o início de setembro na Região Sul até os meses de outubro a novembro (Sudeste e Centro-Oeste) e início de ano (Nordeste). A segunda safra, ou comumente chamada ‘safrinha’, ocorre do final do verão ao final do outono. O cultivo da segunda safra ocorre principalmente na região Centro-Sul do Brasil, sendo os principais produtores os estados do Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Na Região Sul o Paraná se apresenta como o segundo maior produtor nacional do cereal na segunda safra. Entretanto, a área cultivada de milho tem diminuído ao longo dos anos, sendo que no Paraná houve uma redução de 22% na safra de 2015.

A produção total das duas safras (2015/16) no Brasil chegou a 83.519,1 mil toneladas de grãos. Os estados da região Centro-Sul do país são responsáveis por 24,7 % da produção nacional de milho. Para a realidade da região dos Campos Gerais do Paraná, o milho tornou-se expressivo dentro da matriz agrícola, ocupando uma área de 146.020 ha, de um total de 3.725,1 ha do Estado do Paraná (SEAB, 2016), representando 16,2 % da área plantada. O uso de tecnologia moderna e investimento em insumos são as principais características regionais e como resultado direto os níveis de produtividade em alguns casos superam os 12.000 kg ha⁻¹. Devido a isso a média de produtividade estadual alcança 8.936 kg ha⁻¹, superando a média nacional, que é de 5.170 kg ha⁻¹.

O presente estudo foi realizado na área de atuação da Fundação ABC, onde a produtividade média na safra de milho em 2014 foi 10.019 kg ha⁻¹ enquanto que a média nacional foi 4,7 mil kg ha⁻¹. Na safra 2011/12 a área plantada de milho foi de aproximadamente 103 mil ha; na safra 2012/13 90,2 mil ha e na safra 2014/15 foi de 94,8 mil ha.

A Fundação ABC é uma instituição de caráter particular, sem fins lucrativos, mantida pela contribuição dos produtores e por parcerias em trabalhos de pesquisa com empresas privadas, além de serviços de análises de solos, bromatologia, sistema de informações geográficas e ambientais e sementes. Fundada em 23 de outubro de 1984, é uma das pioneiras no desenvolvimento do sistema de plantio direto no país. Os trabalhos de pesquisa objetivam dar amparo tecnológico aos produtores rurais filiados às Cooperativas Capal, Frísia e Castrolanda.

As Cooperativas ABC se beneficiam das técnicas e sistemas desenvolvidos pela Fundação ABC garantindo uma atualização técnica constante dos 3.825 associados, abrangendo 67 municípios em uma área de 428 mil hectares, além de uma bacia leiteira de 1,2 milhões de litros diários. Os trabalhos de pesquisa agropecuária aplicada são realizados nos Campos Demonstrativos e Experimentais localizados em Ponta Grossa-PR, Tibagi-PR, Arapoti-PR e Itaberá-SP. Estas unidades atendem as necessidades regionais cujos resultados são extrapolados para regiões de abrangências desses pólos (Fundação ABC Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário, 2009).

Aproximadamente 66% do milho produzido no país é destinado à fabricação de ração animal, enquanto 20% é utilizado para consumo humano direto, principalmente em propriedades rurais e 8% é destinado à indústria. O 6% restantes são representados pelas perdas durante o beneficiamento, armazenamento e transporte na produção de sementes (FIGUEIRA et al., 2003).

Em países desenvolvidos, o consumo 'per capita' anual de grãos atinge aproximadamente 1000 kg, sendo 70 kg ingeridos diretamente na dieta e 930 kg indiretamente na forma de ração utilizada na produção de carne e leite. Em países asiáticos em desenvolvimento, o consumo 'per capita' é de 150 kg, sendo quase totalmente ingeridos sob forma de grãos 'in natura'.

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

Além disso, devido ao longo período de plantio nas diferentes regiões produtoras do Brasil, a cultura permanece no campo durante praticamente o ano todo, o que acarreta uma produção permanente de inóculo dos mais diversos patógenos que afetam a cultura, causando a morte de plântulas e podridão de sementes, podridões de raízes, doenças foliares que causam a redução de área foliar e diminuição da capacidade fotossintética, podridões de colmo e de espiga que comprometem a qualidade dos grãos (SILVA & SCHIPANSKI, 2007).

2.2. Grãos ardidos de milho

O termo ‘grãos ardidos’, em Fitopatologia, refere-se aos grãos atacados por fungos. Porém, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA define ‘grãos ardidos’ de uma forma mais abrangente, como sendo grãos atacados por patógenos e/ou que sofreram algum tipo de injúria que levou a alteração da cor, fermentação em toda a área do germe ou em qualquer outra parte do endosperma. Os fungos podem causar redução do potencial de germinação, geração de focos de aquecimento e de migração de umidade na massa de grãos, aceleração das trocas químicas (DINIZ, 2002), redução nos conteúdos de carboidratos, proteínas e açúcares, perda de peso, descoloração e necrose (JULIAN et al., 1995) (Figura 1).

Dentre os fungos produtores de grãos ardidos em milho, estão *Drechslera zeicola*, *Cladosporium herbarum*, *Ustilago maydis*, *Nigrospora oryzae*, *Colletotrichum graminicola*, *Cephalosporium* spp., *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris* spp., *Fusarium* spp., entre outros.



Figura 1 - Grãos ardidos em milho (Foto: C. A. Schipanski, 2011).

Alguns fungos, além de ocasionarem grãos ardidos, também são capazes de produzir micotoxinas em grãos infectados no campo ou durante o armazenamento, como *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Fusarium verticillioides* (sin. *Fusarium moniliforme*), *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporothrichioides*, *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, entre outros (PINTO, 2005; 2006; DESJARDINS, 2006). Estima-se que 10 a 30% dos grãos colhidos se percam por infecções promovidas pelo desenvolvimento de fungos anualmente (LINO et al, 2004).

Entre os fatores que podem influenciar as podridões de espigas estão (1) Injúrias nas espigas – danos causados por insetos favorecem a entrada de patógenos na espiga; (2) Clima – regiões que apresentam altas precipitações pluviométricas no período compreendido entre a fecundação e a colheita têm maior probabilidade de desenvolver as podridões de espigas; (3) População de plantas – o uso de elevadas populações de plantas predispõem as podridões de espigas; (4) Genética – híbridos comerciais utilizados atualmente oferecem diferentes níveis de resistência às podridões das espigas; (5) Características agrônômicas – espigas não decumbentes ou mal empalhadas com palhas frouxas, permitem a penetração e acúmulo de água da chuva e de esporos das podridões de espigas nos espaços entre as palhas, favorecendo o apodrecimento; (6) Práticas de manejo – alternância entre o ganho e a perda de umidade

após a maturação fisiológica favorecem as podridões de espigas. Evitar atrasos na colheita contribui bastante para a redução das podridões de espigas; (7) Monocultura – o cultivo sucessivo de milho sob o sistema de plantio direto contribui para o aumento do inoculo dos patógenos causadores das podridões de espigas. A adoção da rotação de culturas, mesmo sendo sob o sistema de plantio direto, pode contribuir para a redução das podridões de espigas; (8) Fungicidas – a utilização de fungicidas visando o controle das doenças foliares pode ter influência indireta na redução das podridões de espigas. Porém, os resultados obtidos não apresentam alta frequência de sucesso na redução (SILVA & SCHIPANSKI, 2007).

2.3. Principais fungos toxicogênicos associados à grãos ardidos de milho

2.3.1. O gênero *Stenocarpella*

Os fungos *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berkeley) Saccardo; *S. zae* (Schweinitz) Leveille] e *S. macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle] pertencem a Classe Ascomycetes, Ordem Diaporthales. Estas duas espécies apresentam no campo apenas a fase anamórfica (imperfeita ou assexuada) (CASA et al., 2006).

As duas espécies podem ser distinguidas uma da outra com base na forma, tamanho, cor e número de células dos esporos e pela coloração das colônias em meio de cultura (Figura 2). Em revisão de literatura realizada por Casa et al. (2006), Sutton (1966), revisando “Coelomycetes”, propôs que as duas espécies *D. maydis* e *D. macrospora*, encontradas em colmos, sementes e folhas do milho, fossem incluídas no gênero *Stenocarpella* Syd., baseado na conidiogênese como uma característica taxonômica. Por outro lado, em 1985, na revista “Plant Disease”, foi publicada uma lista de Nomes Comuns de Doenças de Plantas (Committee on Standardization of Common Names for Plant Disease, 1985), na qual o gênero *Diplodia* era preferido para identificar as espécies em discussão. Alguns pesquisadores da África do Sul e nos Estados Unidos adotam *Stenocarpella* para identificar as espécies e este gênero também foi aceito em publicações da Sociedade Americana de Fitopatologia (American Phytopathological Society – APS). Sutton (1966) justifica que as características de conidiogênese levaram as espécies a serem incluídas em um gênero distinto de *Diplodia*, pois *Stenocarpella* apresenta células conidiogênicas enteroblásticas e fialídicas e *Diplodia*, células

conidiogênicas holoblásticas. Assim, optou-se por utilizar o gênero *Stenocarpella* neste estudo.

Segundo Casa et al. (2006) o fungo *S. maydis* foi descrito pela primeira vez em 1884 nos Estados Unidos, e desde então foi relatado nos cinco continentes. A espécie *S. macrospora* foi relatada pela primeira vez sobre colmos de milho no ano de 1896 em Auburn, Alabama, Estados Unidos. No Brasil, a ocorrência de *S. macrospora* foi relatada pela primeira vez por Johann (1935) no Estado de São Paulo causando podridão em sementes. No Brasil, os danos e as perdas causadas exclusivamente por *S. maydis* e *S. macrospora* ainda não foram quantificados. Sabe-se, porém, que os fungos contribuem para a produção de grãos ardidos (CASA et al. 2006). Latterell & Rossi (1980), comparando a patogenicidade dos fungos, verificaram que *S. macrospora* é mais agressivo que *S. maydis* durante os estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Rhededer et al. (1990) relataram uma associação negativa entre as espécies crescendo no mesmo lugar, sendo que *S. macrospora* restringiu o crescimento de *S. maydis* em plântulas.

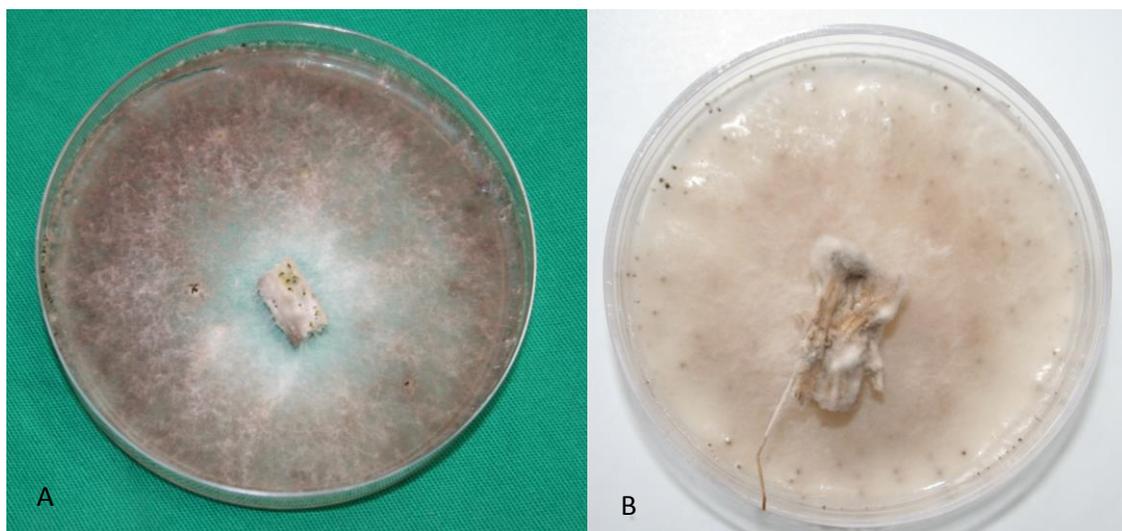


Figura 2 - Colônias de fungos em placa de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) A) Colônia de *S. maydis*. B) Colônia de *S. macrospora*.

2.3.1.1 A podridão de Diplodia ou podridão branca da base da espiga

A podridão de Diplodia ou podridão branca da base da espiga está presente em todas as regiões de cultivo de milho, porém é mais significativa no sul. É considerada a mais

destrutiva das podridões de espiga. Tem grande importância devido a produção de substâncias tóxicas chamadas micotoxinas, causadoras de ‘Diplodiose’ em animais. A significativa redução do valor nutritivo e da palatabilidade dos grãos pode restringir o seu uso como alimento.

O clima seco nos primeiros estádios de desenvolvimento da cultura, seguido de chuvas antes da polinização favorecem a infecção da espiga. As espigas são mais suscetíveis durante um período de três semanas após a polinização, em condições de clima úmido e temperatura entre 28 – 30° C. O desenvolvimento da doença cessa quando a umidade dos grãos atinge 21 – 22%. A infecção é iniciada pela base da espiga. Quando a doença ocorre logo após a polinização a espiga apresenta coloração palha e aspecto mumificado.

Nas infecções tardias as espigas apodrecem, apresentando coloração pardo-acinzentada e esbranquiçada. Quando desempalhada observa-se um micélio branco crescendo entre os grãos no sentido base-ápice da espiga (Figura 3). É comum encontrar picnídios sobre a palha, brácteas florais, sabugo e grãos. Os grãos infectados têm coloração cinza fosco a marrom. Mario & Reis (2001) determinaram em teste de patologia de sementes em papel filtro, que 15 dias após a incubação, as colônias de *S. macrospora* apresentam coloração brancas à bege, enquanto que as de *S. maydis*, originalmente brancas, tornam-se pardo-escuras.

Durante o desenvolvimento e maturação do grão, na colheita, transporte e armazenamento, dependendo das condições ambientais, a presença de algumas espécies de fungos associadas aos grãos pode levar ao acúmulo de metabólitos secundários tóxicos ao homem e aos animais, denominados de micotoxinas. Ao serem consumidas por animais ou pelo homem, pode causar doenças denominadas de micotoxicoses. Por outro lado, a simples presença dos fungos não indica a produção de toxinas. Em geral, as micotoxinas são produzidas no campo ou durante o armazenamento dos grãos.



Figura 3 - Podridão de Diplodia ou Podridão branca da base da espiga de milho (Foto: C. A. Schipanski, 2011).

Os sintomas de micotoxicoses diferem em função da micotoxina consumida e da espécie do animal infectado. O animal que ingeriu o alimento contaminado também fica mais predisposto a ocorrência de outras doenças. A dignose de micotoxicoses pode ser difícil em muitos casos porque os sintomas clínicos da doença não são diagnosticados, principalmente quando mais de uma micotoxina está envolvida. Os animais mais sensíveis às micotoxinas são as aves jovens (frangos de corte, galinhas poedeiras, patos e perus), os suínos (jovens, leitões e porcas em gestação e aleitamento), ovinos jovens e adultos, bovinos (terneiros e vacas leiteiras) e equinos.

Na Tabela 1 estão descritas as principais micotoxinas produzidas pelos fungos associados aos grãos e derivados de milho, suas micotoxicoses e as espécies de animais mais sensíveis às toxinas (REIS et al., 2004). Devido aos diversos efeitos tóxicos e estabilidade térmica, a presença destas toxinas em alimentos é considerada um perigo em potencial para a saúde humana. Produtos alimentícios derivados de carne, leite, ovos e vísceras, tais como queijos e patês devem ser monitorados (REIS, 2011). A FAO/World Health Organization (WHO) estima que 25% de toda a produção de grãos do mundo estejam contaminadas com micotoxinas (LINO et al., 2004).

A micotoxina produzida pelo fungo *Stenocarpella macrospora* é o Diplodiol e não há informações a respeito de micotoxicoses em animais. Já para *S. maydis* não há informações a respeito da micotoxina produzida, porém sabe-se que pode causar micotoxicoses em bovinos, ovinos e patos jovens, doença chamada de diplodiose.

Tabela 1. Fungos produtores de micotoxinas, micotoxicoses e espécie animal mais sensível.

Fungos	Micotoxinas	Micotoxicose – Animal
<i>Aspegillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina	Aves, suínos e bovinos - Potencial carcinogênico, efeitos crônicos em animais incluem má absorção de nutrientes, redução do ganho de peso, hemorragias, nefropatia, incremento à suscetibilidade a infecções devido à imunossupressão, ineficiência da ação de vacinas e fármacos e redução na reprodução
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A	Aves, suínos, bovinos e equinos - Infiltração gordurosa no fígado, necrose renal, nefropatia e formação de células cancerosas e teratogenia
<i>Stenocarpella macrospora</i>	Diplodiol	Sem informação
<i>Stenocarpella maydis</i>	Não identificada	Ovinos, bovinos, pato jovem (diplodiose)
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona	Suínos – irritação dermal e desequilíbrio hormonal (hiperestrogenismo); em machos jovens ocorre o inchamento das glândulas mamárias e atrofia testicular; as fêmeas imaturas sexualmente apresentam inchamento e avermelhamento da vulva e em alguns casos prolapso da vagina e do reto
	Toxina T-2 (Tricotecenos)	Aves – mau desenvolvimento, diarreia, fraqueza das pernas, lesão oral, empenamento anormal, redução de ganho de peso, redução na produção e qualidade dos ovos (casca fina), sensibilidade a machucaduras e pigmentação deficiente na carcaça Suínos jovens – refuga de alimento, diarreia, irritação dermal, hemorragia no trato intestinal
	Desoxinivalenol (DON) (Tricotecenos)	Aves – lesão oral Suínos – diminui consumo de alimento, redução do ganho de peso, diarreia, irritação dermal, hemorragia intestinal, refugo do alimento e vômitos
<i>Fusarium verticillioides</i> (sin. <i>Fusarium moniliforme</i>)	Fumosinina	Equinos – severos sinais nervosos que podem levar até a morte do animal; uma lesão típica é a leucoencefalo malácia (ELEM – equine leucoencephalomalacia) Suínos – edema pulmonar
<i>Penicillium viridicatum</i> e <i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A	Aves, Suínos, bovinos e equinos – ver <i>A. ochraceus</i>

Fonte: Reis et al., 2004.

2.3.2. O gênero *Fusarium*

Os fungos do gênero *Fusarium* pertencem à Ordem Hypocreales do Filo Ascomycota, no Reino Fungi (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Espécies do gênero *Fusarium* podem apresentar variações nas características morfológicas, estruturais e fisiológicas. Essas variações podem explicar a habilidade das espécies desse gênero em ocupar diversos nichos ecológicos em diferentes regiões. O trabalho base para taxonomia do gênero foi realizado por Wollenweber e Reinking (1935), intitulado “Die Fusarien”, no qual as espécies foram organizadas em 16 seções que incluem 65 espécies, 55 variedades e 22 *formae specialis*. Na mesma linha, Snyder e Hansen (1945) propuseram uma classificação baseada em nove espécies e várias *formae specialis*. Em seguida, Booth (1971) propôs um sistema baseado em 44 espécies com 12 seções; Gerlach & Nirenberg (1982) reconheceram 78 espécies. Nelson et al. (1983) reconheceram 40 espécies e, recentemente, Leslie e Summerell (2006) reconheceram 70 espécies. (LESLIE & SUMMERELL, 2006). No Brasil, a revisão mais completa sobre *Fusarium* foi realizada por Ventura (1999; 2000).

Devido as mudanças no novo Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (ICNafp) adotado no Congresso Internacional de Melbourne na Austrália em 2011, a criação de nomes para a fase anamórfica e teleomórfica não está mais permitida para *Fusarium* e outros fungos depois de 1 de janeiro de 2013, e os nomes para fase anamórfica e teleomórfica já existentes deverão ser unificadas (AOKI et al., 2014).

Os principais patógenos de plantas são reconhecidos em quatro complexos de espécies, sendo (1) Espécies do Complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC) que induzem a doença Bakanae do arroz, podridão de espiga do milho, o cancro do pinheiro e contaminantes de grãos de milho e outros cereais com micotoxinas fumonisinas, são elas *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. sacchari* (E.J. Butler & Hafiz Khan) W. Gams, *F. fujikuroi* Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Tousson & Marassas, *F. thapsinum* Klittich, J.F. Leslie, P.E. Nelson & Marassas, *F. nygamai* L.W. Burgess & Trimboli, *F. circinatum* Nirenberg & O'Donnell, *F. konzum* Zeller, Summerell & J.F. Leslie, *F. xylarioides* Steyaert, *F. musae* van Hove, Waalwijk, Logrieco & Ant. Moretti, *F. temperatum* Scaufl. & Munaut., e *F. tuiense* Lima, Pfenning & Leslie; (2) Espécies do

Complexo *Fusarium graminearum* (FGSC) que causam podridão da espiga do trigo e cevada e contaminam grãos com micotoxinas tricotecenos, são elas *F. graminearum* Schwabe, *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *F. cerealis* (Cooke) Sacc. (Syn. *F. crookwellense* L.W. Burgess, P.E. Nelson & Toussoun), *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. sporotrichioides* Sherb., *F. poae* (Peck) Wollenw.; (3) Espécies do Complexo *Fusarium oxysporum* (FOSC) que são responsáveis pelas podridões vasculares; e (4) Espécies do Complexo *Fusarium solani* (FSSC), causam podridões de raiz em diversos hospedeiros (AOKI et al, 2014).

As culturas desse gênero são caracterizadas por crescimento rápido da colônia, com aspecto aveludado e levemente cotonoso. Após 7 a 10 dias de incubação a 25° C em meio de cultura, o fungo pode apresentar características de pigmentação do micélio com diferentes padrões de cores, sendo estas importantes características para identificação das espécies (BOOTH, 1971; NELSON et al., 1983).

Espécies de *Fusarium* podem formar três tipos de esporos conhecidos como microconídios, macroconídios e clamidósporos (NELSON et al., 1983). Algumas espécies produzem os três tipos, enquanto outras não. Macroconídios são produzidos em células especializadas chamadas de esporodóquios (NELSON et al., 1994). Os microconídios são produzidos em micélio aéreo. Estes podem ser produzidos em células conidiogênicas do tipo monofiálides (apenas uma abertura de onde originam os conídios) ou polifiálides (mais de uma abertura (BURGESS et al., 1994), sendo que os microconídios podem apresentar várias formas e tamanhos. O terceiro tipo de esporo, o clamidósporo, possui parede espessa e pode servir como estrutura de resistência no solo quando não há hospedeiro disponível (NELSON et al., 1994).

Estas estruturas são utilizadas como critérios de identificação de espécies. As espécies mais comumente associadas às doenças em milho, como *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, do Complexo *Fusarium fujikuroi*, apresentam características comuns, como esporodóquio de cor alaranjada e ausência de clamidósporos; porém, *F. verticillioides* possui células conidiogênicas apenas do tipo monofiálides e microconídios em cadeias longas; *F. proliferatum* dispõe de células conidiogênicas em monofiálides e polifiálides e, microconídios em cadeias curtas; a espécie *F. subglutinans*, apresenta células do tipo monofiálides e polifiálides. A espécie *F. graminearum* apresenta características bem distintas das acima citadas, como presença de clamidósporos, ausência de microconídios e macroconídios

presentes em abundância, sendo facilmente distinguível das espécies do complexo *F. fujikuroi* (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Embora as características das espécies do complexo *F. fujikuroi* sejam distintas morfológicamente das espécies do complexo *F. graminearum*, fazer a diferenciação entre espécies através destas características consome muito tempo e necessitam de elevado nível de conhecimento. Sendo assim, métodos baseados no DNA podem contribuir para o reconhecimento destas espécies e de espécies indistinguíveis morfológicamente. Técnicas moleculares têm sido usadas com sucesso para identificação de algumas espécies de fungos e para detecção de genes de biossíntese de micotoxinas (JURADO et al, 2010).

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg – fase sexual *Gibberella intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert. Sinonímias comuns: *Gibberella fukijuroi* mating population, *Gibberella fukijuroi* var. *intermedia*. Distribuição mundial em uma variedade de substratos agrícolas e não agrícolas. Causa doenças em milho, sorgo, manga e aspargo. *Fusarium proliferatum* é provavelmente confundido com *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. thapsinum* e *F. verticillioides*. Produz fumonisinas em altas quantidades (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Fusarium subglutinans (Wollenweber e Reinking) Nelson, Toussoun e Marasas – fase sexual *Gibberella subglutinans* Nelson, Toussoun e Marasas. Sinonímias comuns: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium sacchari* var. *subglutinans*; *Gibberella fujikuroi* mating population E. Patógeno do milho e foi encontrado primeiramente em regiões frias onde o milho é cultivado. Pode sobreviver em restos culturais de milho na superfície do solo ou enterrado por pelo menos 21 meses. Produz pouca fumonisina ou nenhuma (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg – fase sexual *Gibberella moniliformis* Wineland. Sinonímias comuns: *Fusarium moniliforme*, *Gibberella fujikuroi* mating population A. Patógeno do milho e pode ser encontrado em todas as regiões onde o milho é cultivado. Se *F. verticillioides* estiver presente na semente, a chance de a semente estar infectada por *Aspergillus* spp., *F. graminearum*, *F. subglutinans* e *Diplodia maydis* é menor. Sementes contaminadas com *F. verticillioides* apresentam menos mixotoxinas produzidas por outros fungos, p. ex. aflatoxinas. Este fungo foi isolado de teosinto, indicando que a associação entre este fungo e o milho vem de longa data e possivelmente tem importância evolucionária. Comumente ocorre como endofítico no milho e pode proteger a planta contra o

ataque de outros fungos. A proporção de infecções assintomáticas em sementes de milho depende do genótipo do hospedeiro. O fungo *Trichoderma* pode servir de controle biológico para este fungo. Fumonisinas são as mais importantes micotoxinas produzidas por este fungo, e algumas linhagens podem produzi-las em níveis muito elevados (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Fusarium graminearum Schwabe – fase sexual *Gibberella zae* Schwein (Petch). Sinonímias comuns: *Fusarium graminearum* Grupo 2. Cosmopolita. Encontrado primeiramente em milho, trigo e cevada, mas também é conhecido em outras plantas anuais e perenes. Linhagens de milho variam amplamente na sua sensibilidade a *F. graminearum*, com linhagens resistentes a *F. graminearum* usualmente resistentes a *D. maydis* também. Sementes de milho infectadas com *F. graminearum* são menos infectadas com *F. verticillioides*. Isolados de *F. graminearum* podem produzir 3 importantes micotoxinas, zearalenona, nivalenol e deoxinivalenol. Estudos filogenéticos determinaram que *F. graminearum* constitui um complexo com pelo menos 16 espécies distintas filogeneticamente (AOKI et al, 2014).

Isolados do complexo *F. graminearum* variam quanto ao fenótipo químico (quimiotipo) em relação aos tricoteceno-B. Métodos moleculares têm sido usados para genotipar isolados, pela presença de alelos de genes relacionados à síntese de micotoxinas (DESJARDINS, 2008 citado por KUHNEM JÚNIOR et al., 2013). Estudos populacionais do complexo *F. graminearum* no Brasil mostraram a ocorrência de múltiplas espécies desse complexo, associadas com trigo e cevada, com consistência entre as espécies e o genótipo tricoteceno: *F. meridionale* apresenta o genótipo NIV e *F. graminearum sensu stricto* (s.s.) o genótipo 15-ADON, sendo este último a espécie predominante nos dois cereais de inverno (>80%) (ASTOLFI et al., 2012; 2011).

Stumpf et al. (2013) e Casa et al. (1998) citados por Kuhnem Júnior et al. (2013) relatam que *F. graminearum* é mais frequente em milho no sul do Brasil, quando comparado à região central do país, possivelmente pela maior quantidade de inóculo, uma vez que no Sul é mais comum a sucessão trigo-milho. As temperaturas médias e máximas de 26° C e mínimas de 16° C são consideradas ótimas para infestação de grãos de milho por *F. graminearum* em condições de campo (MOLIN, 1999). Pozzi et al. (1995), em avaliação realizada em grãos de milho armazenados durante um ano, em Ribeirão Preto, São Paulo, em sacos de 60 kg, com umidade entre 12,3 e 17,8 %, constataram correlação significativa e

positiva entre a população de *Fusarium* spp. e a umidade de grãos, bem como, correlação negativa com os fatores umidade relativa do ar de 64 a 97,5%, temperatura mínima média do ar de 18,4° C, temperatura máxima média de 24,1° C, chuva próximo a 337mm, e tempo de armazenamento. Ressalta-se que os autores não detectaram zearalenona, e que as duas espécies predominantes de *Fusarium*, em ordem decrescente, foram *F. moniliforme* (= *F. verticillioides*) e *F. proliferatum*.

Segundo a literatura, zearalenona causa hiperestrogenismo em suínos, pseudo-prenhez, infertilidade, alteração no ciclo do cio, natimortos, ‘splay leg’ em leitões durante a gestação, aborto em matrizes e atrofia de ovários em suínos em lactação (DIECKMAN & GREEN, 1992). Em bovinos os efeitos são menos severos, porém pode levar a infertilidade e a queda na produção de leite (MILLER, 1995) e em aves causa hiperestrogenismo (LAZZARI, 1997). Na espécie humana, a toxina é considerada carcinogênica (MILLER, 1995).

A micotoxina desoxinivalenol provoca recusa de ingestão alimentar e vômito em animais (DIEKMAN & GREEN, 1992), causa enterite e diarreia, diminui a fertilidade de matrizes, aumenta a taxa de mortalidade de leitões na fase de amamentação e compromete o sistema imunológico de suínos (LAZZARI, 1997). As aves embora mais tolerante a esta toxina podem sofrer redução na qualidade de ovos e no ganho de peso. Os bovinos toleram bem a micotoxina, no entanto, tem-se observado casos de redução na ingestão alimentar e na taxa de natalidade (MILLER, 1995).

As doenças causadas pelos fungos do gênero *Fusarium* spp. em milho são a podridão de Fusarium ou podridão rosada da base da espiga e a podridão de Gibberela ou podridão rosada da ponta da espiga.

2.3.2.1. Identificação de espécies de *Fusarium* através de técnicas moleculares

O gênero *Fusarium* contém aproximadamente 300 espécies filogeneticamente distintas que foram descobertas via filogenia molecular. A taxonomia do gênero foi baseada primeiramente em caracteres fenotípicos, entretanto nas últimas duas décadas estudos moleculares que empregam dados da sequência de DNA revolucionaram a compreensão sobre a diversidade de espécies e as relações filogenéticas dentro do gênero (AOKI et al, 2014).

Com base nesta informação a identificação de espécies de *Fusarium*, não pode ser realizada apenas em caracteres morfológicos; e com o desejo de facilitar a identificação na rotina dos laboratórios, muitas espécies podem ser identificadas através de marcadores moleculares. Para fitopatologistas e outros cientistas que necessitam de identificações assertivas de isolados de *Fusarium*, o uso de banco de dados como *Fusarium-ID* e *Fusarium MLST*, dois websites dedicados a identificação molecular de espécies de *Fusarium* podem encorajar a identificação por pesquisadores não especialistas no gênero (GEISER et al., 2014).

O uso do gene do fator de alongação 1- α (TEF), o qual codifica uma parte essencial das proteínas da maquinaria da tradução, tem sido amplamente utilizado e possui alta utilidade filogenética porque é (1) altamente informativo em nível de espécies de *Fusarium*; (2) cópias não-ortólogas do gene não foram detectadas no gênero; e (3) primers universais foram desenhados e funcionam em toda amplitude do gênero. Este gene aparenta ser cópia-única em *Fusarium*, e apresenta um alto nível de polimorfismo na sequência entre espécies estreitamente relacionadas, mesmo em comparação com porções ricas de introns de genes codificadores de proteínas tais como a calmodulina, beta-tubulina e histona H3 (GEISER et al., 2014).

2.3.2.2. Doenças causadas por *Fusarium* spp. no milho

2.3.2.2.1. Podridão de *Fusarium* ou podridão rosada da base da espiga

É considerada a doença mais comum das podridões de espiga e pode ser encontrada em todas as regiões produtoras de milho. Devido ao apodrecimento parcial das espigas, a redução da produtividade é menor quando comparada com a podridão de *Diplodia*. Híbridos de milho doce, assim como híbridos que apresentam alta concentração de lisina e nervura principal da folha de coloração parda são mais suscetíveis ao patógeno. Os patógenos que causam esta podridão são, *Fusarium verticillioides* (sin. *Fusarium moniliforme*), *Fusarium subglutinans* e *Fusarium proliferatum*, são responsáveis pela produção de fumonisina. Os grãos apresentam coloração avermelhada, isolados ou agrupados, distribuídos aleatoriamente na espiga. Isso se deve a infecção dos grãos imaturos pelo estilo-estigma (Figura 4). Com o desenvolvimento da doença um mofo pulverulento ou cotonoso cresce sobre os grãos infectados. Pode infectar a base da espiga através de orifícios feitos por lagartas. Em alguns grãos, há o aparecimento de estrias brancas, causadas pela ação do fungo no pericarpo. As

espigas são mais suscetíveis a esta doença 2 dias após a emissão dos estigmas e menos suscetíveis até 40 dias após.



Figura 4 - Podridão de Fusarium ou podridão rosada da base da espiga. (Foto: C. A. Schipanski, 2012)

2.3.2.2.2 Podridão de Giberela ou podridão rosada da ponta da espiga

Ocorre frequentemente na região Sul do Brasil devido ao cultivo dos cereais de inverno, que produzem grande quantidade de inóculo da doença. Esta podridão causa significativa redução do valor nutritivo e na qualidade dos grãos, e em híbridos suscetíveis podem ocorrer perdas significativas de produtividade. Favorecida pelo clima ameno e úmido, e por chuvas frequentes após a polinização. A doença é mais severa quando ocorrem chuvas entre o período de 14 a 21 dias após o florescimento. A infecção inicia pela ponta da espiga, principalmente após danos causados por insetos ou pássaros. Apresenta um mofo de coloração avermelhada a marrom-avermelhada na ponta da espiga que se desenvolve em direção à base (Figura 5). É muito comum a palha estar firmemente ligada a espiga devido ao crescimento do micélio do fungo entre as brácteas e os grãos. Sobre os tecidos colonizados podem ser formados peritécios. A infecção precoce causada por este fungo pode apodrecer

completamente a espiga. O agente causal é o fungo *Gibberella zeae* (anamorfo *Fusarium graminearum*).



Figura 5 - Podridão de Giberela ou podridão rosada da ponta da espiga. (Foto: C. A. Schipanski, 2012)

2.3.3. O gênero *Aspergillus*

A podridão da espiga denominada podridão por *Aspergillus* é causada pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Estas espécies são morfologicamente similares sendo as únicas que produzem aflatoxina, uma micotoxina carcinogênica. *A. flavus* é a espécie predominante em milho e outros cereais enquanto que *A. parasiticus* é predominante em amendoim (HORN et al., 2014). Ambos pertencem à seção *Flavi* e produzem esclerócios em cultura. Embora *A. alutaceus* também produza ocratoxina A em grãos de milho e trigo, o inverso ocorre para *Penicillium verrucosum* (MADHYASTHA et al., 1990).

A podridão ocasionada por este fungo causa pouco dano na maioria das safras devido a colonização do mesmo estar restrita a poucos grãos. É mais severa em ambientes com altas temperaturas e umidade. Grãos infectados apresentam massas de esporos amarelos esverdeados sobre e entre eles e colônias mais velhas tornam-se verde escuro a marrom,

porém predomina a coloração amarela em comparação com colônias de outros fungos como *Penicillium* ou *Trichoderma* spp. (Figura 6).



Figura 6 - Espiga de milho com grãos infectados com *Aspergillus* spp.

Embora qualquer parte da espiga possa ser infectada com *A. flavus*, a ponta é o local mais comum. A esporulação é evidente em grãos injuriados. Entretanto, o fungo pode estar presente em grãos sem esporulação visível, embora estes grãos infectados geralmente pareçam descoloridos. *A. flavus* é um fungo termotolerante, por isso é mais provável que sobreviva a altas temperaturas e sobre condições de seca, comparado com outros fungos e bactérias. Este fungo sobrevive no inverno sob restos culturais e no solo. O fungo é disseminado pelo vento e insetos. Pode crescer sobre o tecido e debaixo dele em sementes. Danos ocasionados por insetos predisõem os grãos a infecção pelo fungo. Plantas sob estresse (hídrico, térmico, entre outros) parecem ser mais suscetíveis a infecção por *A. flavus* (PATAKY, 2000).

A ocorrência de aflatoxina B1 já foi relatada em leite bovino (DIEKMAN & GREEN, 1992); em galinhas, as micotoxinas interferem no funcionamento do sistema renal, aumentam o consumo de proteínas, diminuem a pigmentação de carcaças, aumentando a condenação, alteram o metabolismo de vitaminas, diminuem a produção de ovos, reduzem o crescimento e a conversão alimentar e incrementam a mortalidade (JONES et al., 1982). Fiorentin et al.

(1986) constataram um surto de aflatoxicose em suínos, que estava associado a ingestão de ração, cujo componente milho continha 2.000 ng. G⁻¹ de aflatoxina B1, além da presença de *A. flavus* e *A. parasiticus*, no município de Concórdia, SC e Santos et al. (1986) relataram um surto de aflatoxicose em suínos na Zona da Mata, no estado de Minas Gerais.

Molin (1999), em sua revisão, relata que a biossíntese de aflatoxinas ocorre em ambientes com temperaturas entre 8 °C e 42 °C (ótimo de 25 a 28 °C), temperaturas alternadas de 32 a 38 °C / 21 a 26 °C e umidade elevada nos substratos. Plantas estressadas por temperaturas altas e ambientes com baixa precipitação pluvial; a ação dos insetos sobre os grãos; a ação mecânica sobre os grãos durante a colheita; o estágio de maturidade dos grãos de milho e a presença de microrganismos também podem interferir na síntese das toxinas.

Embora altas temperaturas (32 a 38 °C) seguidas por temperaturas baixas (21 a 26 °C) favoreçam a infecção dos estilo-estigmas de milho por *A. flavus* (JONES et al., 1980), outros fatores como maturidade dos grãos (KAWASHIMA et al, 1993), estresse por seca, falta ou excesso de nitrogênio (PAYNE, 1992) e a presença de outros fungos como *Aspergillus niger*, *Rhizopus oligosporus* e *Neurospora* spp., interfiram na contaminação por aflatoxinas.

2.3.4. O gênero *Penicillium*

Várias espécies de *Penicillium* podem ser isoladas de grãos na colheita, porém *Penicillium oxalicum* Currie & Thom é o único que causa a podridão da espiga após inoculação. Outras espécies, incluindo *P. chrysogenum*, *P. glaucum*, *P. cyclopium* e *P. funiculosum*, também ocorrem comumente (PATAKY, 2000).

A Podridão de *Penicillium* ocorre primariamente em espigas com injúrias mecânicas ou ocasionadas por insetos. O sinal característico é o mofo pulverulento verde ou verde azulado sobre e entre os grãos, usualmente na ponta da espiga (Figura 7). Se o grão é armazenado com altos níveis de umidade (> 18%), o fungo pode invadir o grão e descolorir o embrião.



Figura 7 - Espiga de milho com grãos infectados com *Penicillium* spp. (Foto: C. A. Schipanski, 2013)

Os efeitos da ocratoxina A podem variar de toxicoses crônicas até morte dos animais contaminados, dependendo da quantidade ingerida (DIEKMAN & GREEN, 1992). Em revisão de literatura realizada por Molin (1999), a ocratoxina A tem potencial carcinogênico para suínos, teratogênico para aves, camundongos, e depressão clínica desidratação e redução de peso em ruminantes. Ela pode ser encontrada nos produtos derivados de carne de suínos, aves e baixa probabilidade de detecção no leite.

Ramakrishna et al. (1996) verificou que a produção de ocratoxina por *P. verrucosum* foi inibida, de modo geral, e as vezes significativamente, quando na presença de *A. flavus*. Sua síntese não foi acentuadamente afetada pela presença de *Fusarium sporotrichioides*, verificando-se em alguns momentos, o aumento temporário da ocratoxina A durante o período de incubação.

Pozzi et al. (1995) observou que *Penicillium* spp. predominou em amostras com umidade entre 12,3 e 13,6 %, não havendo correlação significativa entre a população do fungo e os fatores abióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. Fourth edition. John Wiley e Sons. 1996. 869p.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D.M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v.80, n.3, p.189-201, 2014.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237p.
- BURGESS, L.W. et al. **Laboratory manual for *Fusarium* research**, University of Sydney, 1994. 133p.
- CASA, R.T. ***Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* associados à sementes de milho**. 1997. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.427-439, 2006.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 22 de mar. 2016.
- DIEKMAN, M.A.; GREEN, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v.70, p.1615-1627, 1992.
- DINIZ, S.S. de S. **Micotoxinas**. Maringá: Livraria e Editora Rural, 2002. 181p.
- DESJARDINS, A.E. ***Fusarium* Mycotoxins, Chemistry, Genetics and Biology**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2006. 260p.
- EARLE, F.S. New species of fungi imperfect of Alabama. **Bulletin Torrey Botanical Club**, v. 24, p. 28-32, 1897.
- FIGUEIRA, E.L.Z. et al. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.
- FIorentin, L. et al. Aflatoxicose em suínos. Relato de uma ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 38, p. 11-16, 1986.
- FUNDAÇÃO ABC Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário. Fundação ABC 25 anos de pesquisa a serviço do produtor. Castro, 2009. 152p.
- GEISER, D.M. et al. **FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium***. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, p.473-479, 2004.
- GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium*: a pictorial atlas**. **Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt for land und forstwirtschaft**, 405p, 1982.
- HORN, W.B. et al. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus* sclerotia naturally produced in corn. **Phytopathology**, v.104, p.75-85, 2014.

- JOHANN, H. *Diplodia macrospora* em milho no Brasil. **Plant Disease Reporter**, v.19, p.9-10, 1935.
- JONES, F.T.; HAGLER, W.H.; HAMILTON, P.B. Association of low of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. **Poultry Science**, v.61, p.861-868, 1982.
- JULIAN, A.M. et al. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre-an-post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, v.129, p.5-16, 1995.
- JURADO, M. et al. Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. **Food Microbiology**, v.27, p.50-57, 2010.
- KAWASHIMA, K.; SIRIACHA, P.; KAWASUGI, S. Infection of Thai maize with *Aspergillus flavus*. **JARQ**, v.27, p.55-60, 1993.
- KUHNEM JÚNIOR, P.R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, v.43, p.583-588, 2013.
- LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: Ed. do Autor, 1997. 134p.
- LATTERELL, F.M.; ROSSI, A.E. *Stenocarpella macrospora* (= *Diplodia macrospora*) and *S. maydis* (= *D. maydis*) compared as pathogens of corn. **Plant Disease**, v.67, p.725-729, 1980.
- LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Ames, Iowa: Blackwell Professional, 2006. 388p.
- LINO, C.M.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.99, n.552, p.181-192, 2004.
- MADHYASTHA, S.M. et al. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1505-1510, 1990.
- MARIO, J.L.; REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.670-672, 2001.
- MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. **Journal of Stored Product Research**, v.31, p.1-16, 1995.
- MOLIN, R. **Avaliação de micotoxinas em grãos de milho nos estádios fenológicos próximos a colheita**. 1999. 68p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1999.
- NELSON, P.E.; TOUSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium* species: An illustrated manual for identification**. University Park, Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University Press, 1983. 183p.

- PAYNE, G.A. Aflatoxin in mayze. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, p.423-440, 1992.
- PATAKY, J.K. Fungal Stalk Rots. In: White, D. G. **Compendium of Corn Diseases**. Minnesota, The American Phytopathological Society, 2000. 78p.
- PINTO, N.F.J.A. **Grãos ardidos em milho**. (Circular Técnica, 66). Embrapa, Sete Lagoas, 6p, 2005.
- POZZI, C.R. et al. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**, v.12, p.313-319, 1995.
- RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J.E. Colonization of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. **Journal of Food Protection**, v.59, p.1311-1317, 1996.
- REIS, E.M., CASA, R.T., BRESTOLIN, A.C.R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Lages: Graphel, 2004.
- REIS, E.M. **Seminário sobre Giberela em cereais de inverno: coletânea de trabalhos**. Passo Fundo: Berthier, 264p, 2011.
- RIBEIRO, N.A. et al. A. Incidência de podridões de colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v.35, p.1003-1009, 2005.
- RHEDEDER, J.P. et al. Incidence of *Fusarium* and *Diplodia* species and other fungi in naturally infected grain of South African maize cultivars. **Phytophylactica**, v. 22, p. 97-102, 1990.
- SANTOS, J.L. de et al. de. Aflatoxicose em suíno: ocorrência de surtos na Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.38, p.167-172, 1986.
- SILVA, O.C.; SCHIPANSKI, C.A. **Manual de identificação e manejo das doenças do milho**. Castro: Fundação ABC, 2007. 116p.
- SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. The species concept in *Fusarium* with reference to discolor and other sections. **American Journal Botanical**, v.32, p.657-666, 1945.
- STUMPF, R. et al. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. **Brazilian Journal of Microbiology**, (no prelo), 2013.
- SUTTON, B.C.; WATERSON, J.M. *Diplodia maydis*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. **Commonwealth Mycological Institute**, v.84, p.1-2, 1966.
- VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte I – História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.271-298, 1999.
- VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II – Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.8, p.303-338, 2000.

WOLLENWEBER, H.W.; REIKING, O.A. **Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung e Bekämpfung.** Berlin, Paul Parey, 1935.

CAPÍTULO 1

Fungos associados a grãos ardidos de milho oriundos do sul do Paraná

Fungos associados a grãos ardidos de milho oriundos do sul do Paraná

RESUMO

A ocorrência de grãos ardidos é um indicador importante da qualidade do milho. Embora diversos fungos com potencial toxigênico estejam associados a grãos ardidos, pouco se sabe em relação à composição das espécies fúngicas e dos fatores que influenciam a composição dessas espécies nas diferentes regiões produtoras de milho do país. Tais informações são importantes no estudo de medidas de redução de grãos ardidos e micotoxinas no milho. Assim, este estudo analisou a composição de espécies de fungos com potencial toxicogênico em amostras de grãos ardidos, oriundas de duas safras e três locais de cultivo, e onze genótipos de milho. Para a quantificação dos fungos presentes nas amostras foi utilizado o Blotter test, com a identificação morfológica dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e das espécies *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis*) e *S. macrospora* (= *D. macrospora*). Os resultados da incidência de fungos nas amostras de grãos ardidos por Blotter test foram analisados como experimento fatorial, com os seguintes fatores: safra (2011/12 e 2012/13), local (Arapoti, Castro e Tibagi) e genótipos de milho (onze híbridos comerciais). Foram observados efeitos significativos ($P \leq 0,05$) de safra, local e genótipos, e das interações entre esses fatores, na incidência de todos os fungos analisados exceto para *S. maydis*, para o qual o efeito do fator safra não foi significativo. A incidência de fungos nos grãos ardidos não está relacionada com a incidência de grãos ardidos nas amostras analisadas. Os índices de incidência de *Fusarium* spp. variaram de 8,6 a 19,9%; de *S. macrospora* de 0 a 22,4%; de *S. maydis* de 0,5 a 2,9%; de *Penicillium* spp. de 1,6 a 6,9 e de *Aspergillus* spp. de 0,1 a 2,5%. A safra, o local e o híbrido de milho tem influência na incidência de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *S. macrospora*. Destes fatores o primeiro não teve influência sobre *S. maydis*. A maior incidência sobre as amostras de grãos ardidos analisadas foi do gênero *Fusarium* spp. (14,0%), seguido de *S. macrospora* (8,3%), os demais fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *S. maydis* tiveram baixa incidência nos grãos ($> 3,4\%$).

Palavras-chave: Blotter test. Grãos ardidos. Fungos.

Fungi associated with corn rot grains from South Paraná

ABSTRACT

The occurrence of rot or stained grains is an important indicator of the quality of maize. Several fungi with toxigenic potential are associated with damaged kernels, however little is known regarding the composition of species and the factors that influence the composition of species in the different regions that produce corn in the country. Such information is important in the study of measures of reduction of rot grains and mycotoxins in maize. This study analyzed the composition of fungal species with toxicogenic potential in samples of rot grains, from different hybrids grown in three locations in Paraná, in two crops. For quantification of genera and species of fungi present in the samples was employed Blotter test with morphological identification of *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* and species *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis*) and *S. macrospora* (= *D. macrospora*). The analysis of the incidence of fungi in rot grain samples by Blotter test were subjected to statistical analysis of factorial experiments, in which the factors considered were: crop year (2011/12 and 2012/13), local (Arapoti, Castro and Tibagi) and corn genotypes (eleven commercial hybrids). There was a significant effect ($p \leq 0.05$) of the crop, location and genotypes, and the interactions between these factors, on the incidence of all the fungi analyzed except to *S. maydis*, for which the effect of the crop year were not significant. The incidence of fungi in rot grains is not related with the incidence of rot grains in the analyzed samples. The rates of these fungi ranged from 8.6 to 19.9% for *Fusarium* spp; 0 to 22.4% for *S. macrospora*; 0.5 to 2.9% *S. maydis*; 1.6 to 6.9 for *Penicillium* spp; and from 0.1 to 2.5% for *Aspergillus* spp. The crop year, local and genotypes have influence on the incidence of *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *S. macrospora*. These factors the first did not influence on *S. maydis*. The major incidence on the rot grains samples analyzed was *Fusarium* spp. (14,0%), followed by *S. macrospora* (8,3%), and the other fungi *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *S. maydis* had low incidence on grains ($> 3,4\%$).

Keywords: Blotter test. Rot grains. Fungi.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é, depois do trigo, o segundo cereal mais importante usado na alimentação humana e animal no mundo todo e pode ter sua produtividade afetada por fungos que infectam os grãos (Ottoni, 2008).

Os fungos que atacam os grãos de milho e que causam grãos ardidos, também podem produzir micotoxinas, as quais são prejudiciais a saúde humana e animal. Os principais fungos que causam grãos ardidos pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Stenocarpella*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais são produtores de micotoxinas (PINTO, 2005; 2006; DESJARDINS, 2006).

A podridão de Diplodia ou podridão branca da base da espiga, causada pelos fungos *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* está presente em todas as regiões de cultivo de milho, porém é mais significativa no Sul e mais destrutiva das podridões de espiga. No Brasil, os danos e as perdas causadas exclusivamente por *S. maydis* e *S. macrospora* ainda não foram quantificados. Porém, sabe-se que os fungos contribuem para a produção de grãos ardidos. O clima seco nos primeiros estádios de desenvolvimento da cultura, seguido de chuvas antes da polinização favorecem a infecção da espiga (CASA et al. 2006).

As podridões da espiga causadas por fungos do gênero *Fusarium* sp. são as mais conhecidas e mais comuns. A Podridão de Fusarium ou podridão rosada da base da espiga é causada por fungos do Complexo de Espécies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium verticillioides* (sin. *Fusarium moniliforme*), *Fusarium subglutinans* e *Fusarium proliferatum*, responsáveis pela produção de fumonisinas; enquanto que a Podridão de Giberela ou podridão rosada da ponta da espiga é causada por fungos do Complexo de Espécies de *Fusarium graminearum* (FGSC), responsáveis pela produção de tricotecenos (AOKI et al, 2014). Estas podridões são responsáveis por perdas significativas devido à redução na qualidade dos grãos.

As podridões ocasionadas por fungos do gênero *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. causam pouco dano na maioria das safras, pois a colonização do fungo está restrita a poucos grãos. A podridão de *Aspergillus* sp. é mais severa em ambientes com altas temperaturas e umidade, enquanto que a Podridão de *Penicillium* ocorre primariamente em espigas com injúrias mecânicas ou ocasionadas por insetos (PATAKY, 2000).

A literatura científica sobre a composição de espécies fúngicas associadas a grãos ardidos no Brasil é limitada e não é recente, ficando restrita a identificação morfológica dos fungos. Não obstante o avanço em termos de ferramentas para identificação molecular, existem poucos estudos com esta abordagem molecular na identificação de fungos associados a grãos de milho no Brasil. O conhecimento da composição de fungos associados a grãos ardidos permite a adoção de medidas que visam a redução de grãos ardidos e micotoxinas. A hipótese explorada neste estudo foi de que o local, o ano de cultivo e o híbrido são fatores determinantes da composição de espécies de fungos toxigênicos em grãos de milho. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a influência de fatores como ano e local de cultivo, assim como do genótipo de milho, na composição de espécies de fungos com potencial toxigênico presentes em grãos ardidos de milho no Sul do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Dados das amostras – As amostras de grãos ardidados analisadas, são provenientes de ensaios do Setor de Fitotecnia da Fundação ABC, conduzidos em 2 safras, em 3 locais e com onze híbridos. Os locais de cultivo foram os campos experimentais da Fundação ABC, localizados nos municípios de Castro, Arapoti e Tibagi, no estado do Paraná. A localização dos campos experimentais é a seguinte: (1) Arapoti-PR: Lat 24° 11' S Long 49° 51' A altitude 902 m; (2) Tibagi-PR: Lat 24° 31' S Long 50° 22' O altitude 802 m e (3) Castro-PR: Lat 24° 51' S Long 49° 56' O altitude 1001 m (Figura 8). Os locais foram selecionados porque apresentam condições climáticas distintas, com temperaturas médias anuais variando entre 17 a 21° C (Figura 9).

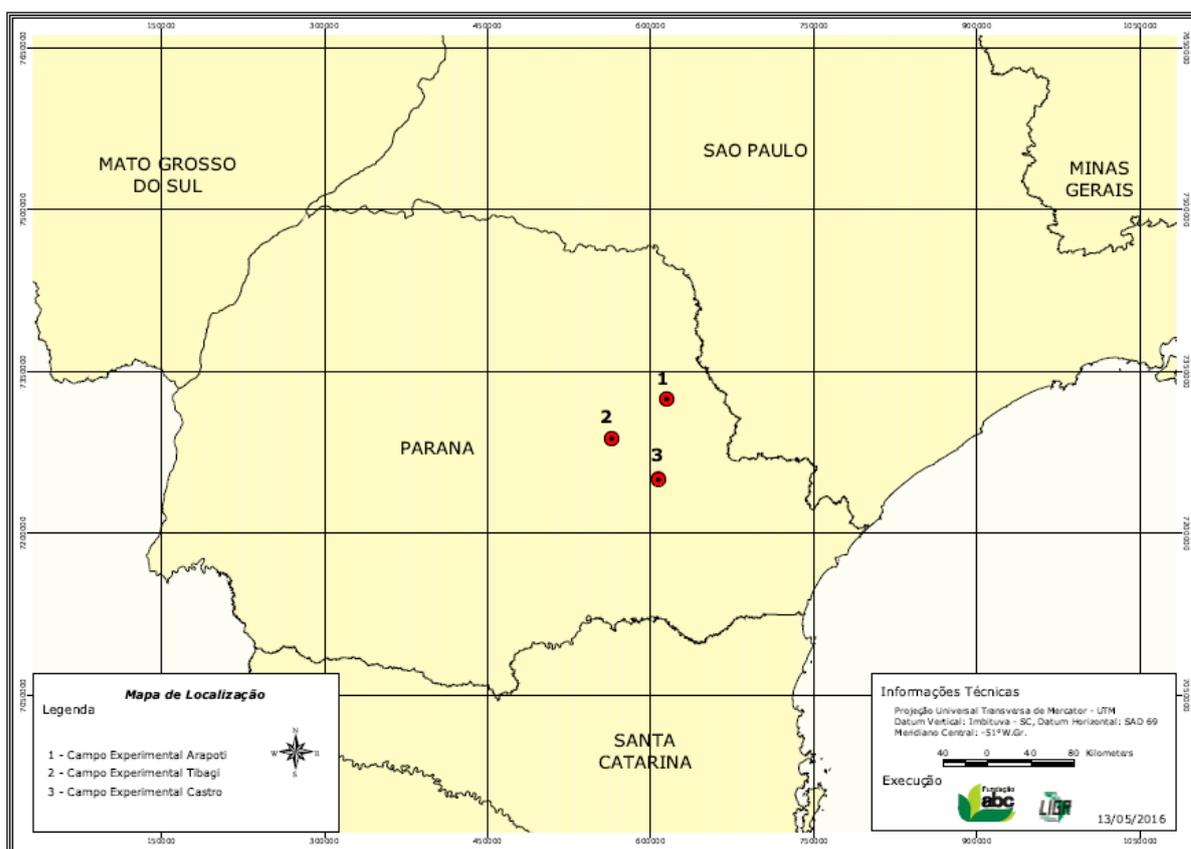


Figura 8 - Localização geográfica dos três locais, sendo: (1) Arapoti, (2) Tibagi e (3) Castro, Paraná (Fonte: LIGA Fundação ABC, 2015).

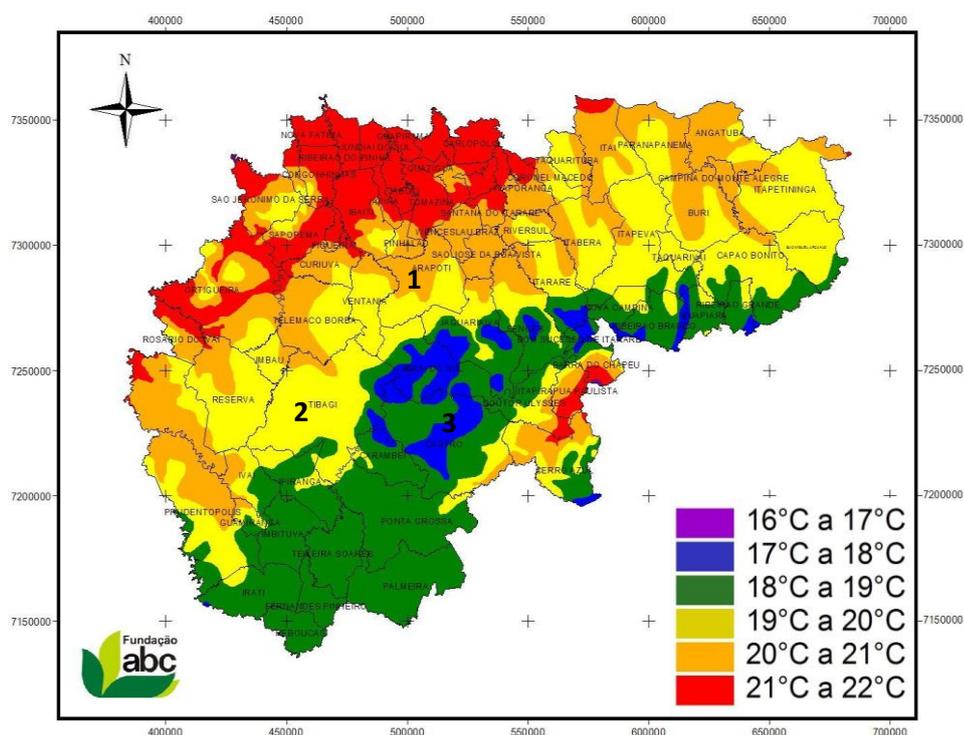


Figura 9 - Temperaturas médias anuais nos três locais, (1) Arapoti, (2) Tibagi e (3) Castro, Paraná. (Fonte: SMA Fundação ABC, 2015)

As safras analisadas foram 2011/12 e 2012/13. Na safra 2011/12 a semeadura em Castro ocorreu em 27/9/11, em Arapoti 26/9/11 e em Tibagi 22/9/11. As colheitas foram realizadas entre 21/3 a 03/4/12; 21 a 29/3/12 e 21/3 a 03/4/12 respectivamente. Na safra 2012/13 as semeaduras ocorreram em 20/9/12, 25/9/12 e 22/9/12 e as colheitas em 26/3/13, entre 28/3 a 15/4/13 e 26/3 a 09/4/13 respectivamente para Castro, Arapoti e Tibagi.

Os 11 híbridos analisados foram: BG 7046, BG 7051H, CD 324 PRO, Celeron TL, DKB 240 PRO, DOW 2A550 Hx, Formula TL, P 1630H, P 2530, P30F53 Hnsr, P 32R22H.

As amostras de espigas de milho contendo grãos ardidos ou manchados foram debulhadas manualmente para a coleta de grãos ardidos e após a trilha manual e homogeneização das amostras colhidas, foi separada uma amostra de 250 gramas de cada híbrido, e foram selecionados grãos, com sintomas de ardidos ou manchados (> 25% da área do grão afetada) e, em seguida, feita a pesagem. Os valores foram expressos em % de incidência. Os grãos sintomáticos foram enviados ao Laboratório de Sementes da Fundação ABC (LabEF) para identificação dos fungos associados.

3.4.2. Desenho experimental e análise dos dados – o delineamento experimental foi fatorial (duas safras, três locais de cultivo e 11 híbridos de milho). As variáveis foram inicialmente testadas para a homogeneidade da variância pelo teste de Box- Cox utilizando software SAS.

No caso da presença de heterogeneidade da variância, a variável foi transformada antes de realizar a análise de variância, em conformidade com a recomendação do teste de Box-Cox. A análise de variância foi realizada pelo procedimento PROC GLM do software estatístico SAS. A análise de correlação foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de Spearman e o PROC CORR, do software SAS.

Os resultados para *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp, *S. macrospora*, *S. maydis* foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e para *Fusarium* spp. a transformação dos dados permitiu a estabilização da variância e foi realizado teste paramétrico (Zar, 1999).

3.4.3. Incidência de fungos associados aos grãos ardidos – Para análise da incidência de fungos por híbrido, local e safra, foram utilizadas 100 sementes de cada amostra, divididas em cinco repetições. Foi utilizado o teste de Blotter, com quatro folhas de papel filtro (80 gramas) umedecidos em água pura esterilizada e colocados em gerboxes (10,5 x 10,5 x 4,0 cm) para incubação em sala climatizada ($20 \pm 2^{\circ}$ C), com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias (Figura 10).

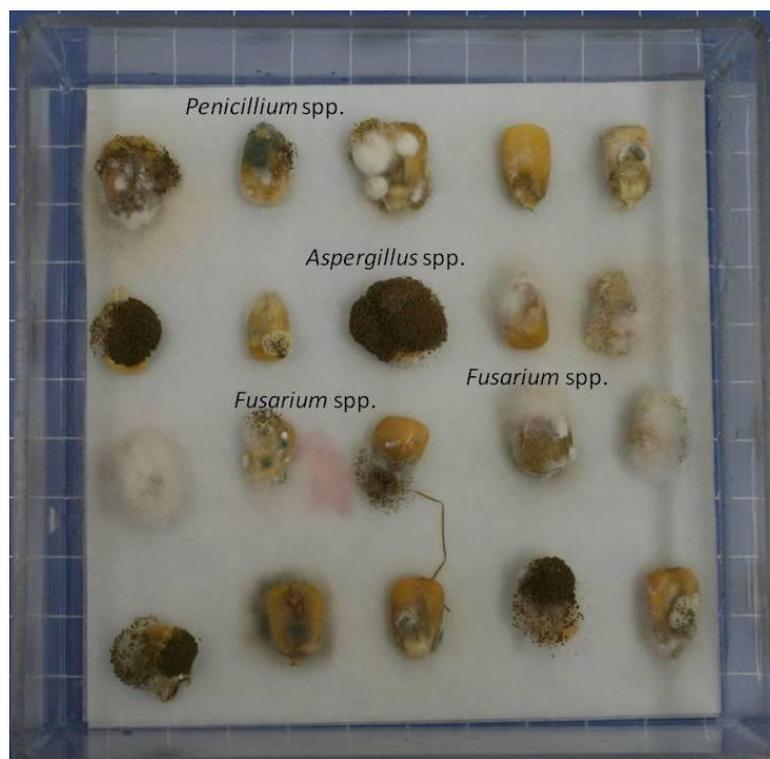


Figura 10 - Teste de Blotter realizado para identificação de fungos associados à grãos ardidos de milho.

Após esse período os grãos foram analisados sob estereomicroscópio para identificação dos fungos associados. Os fungos *S. maydis* e *S. macrospora* foram diferenciados através dos conídios, sendo que *S. maydis* apresenta conídios pardo-oliva a pardos, cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, medindo 15-34 x 5-8 μm , bicelulados e comumente com um septo (0-2). *S. macrospora* apresenta conídios semelhantes aos descritos para *S. maydis*, porém seus esporos são 2-3 vezes maiores, medindo 44-82 x 7,5-11,5 μm e apresentando 1-2 septos (1-3) (CASA et al., 2006). As espécies *S. macrospora* e *S. maydis* são facilmente identificadas por caracteres morfológicos, enquanto que o mesmo não é válido para as espécies de *Fusarium* spp.

Para identificação de *Fusarium* spp. foram agrupadas todas as espécies, não diferenciando cores ou formação de macroconídios, microconídios e clamidósporos. Embora muitos trabalhos utilizem a identificação através de caracteres morfológicos para as principais espécies que ocorrem em milho, muitas vezes ocorrem mais de uma espécie do complexo *Fusarium fujikuroi* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*) por grão, sendo necessário o isolamento monospórico e posterior análise molecular, pois os fungos das três

espécies formam esporodóquio de coloração alaranjada e *F. proliferatum* e *F. subglutinans* apresentam tanto monofiálides como polifiálides.

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram facilmente diferenciados pela estrutura dos conidióforos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incidência média de grãos ardidos nas amostras de milho foi de 2,9%, com variação de 0,1 a 12,6%. Não se observou correlação significativa ($P \leq 0,05$) entre a incidência de grãos ardidos e a incidência de fungos nos grãos (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre a ocorrência de grãos ardidos e a incidência de fungos (%).

	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
Grãos ardidos	-0,121 ^{NS}	-0,138 ^{NS}	-0,181 ^{NS}	0,020 ^{NS}	-0,055 ^{NS}
<i>Aspergillus</i> spp.	-	0,022 ^{NS}	-0,156 *	-0,126 *	0,164 *
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	0,202 *	0,033 ^{NS}	-0,081 ^{NS}
<i>S. macrospora</i>	-	-	-	0,044 ^{NS}	-0,201 *
<i>S. maydis</i>	-	-	-	-	-0,141 *

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade; NS, não significativo ao nível de 5% de probabilidade

A análise dos dados revelou efeitos significativos ($P \leq 0,05$) de safra, local e genótipos, e das interações entre esses fatores, na incidência de todos os fungos analisados, exceto para *S. maydis*. Para essa espécie o efeito do fator safra não foi significativo (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância de experimento fatorial da incidência de *Aspergillus* sp. (ASPER), *Penicillium* spp. (PENIC), *Fusarium* spp. (FUSAR), *Stenocarpella macrospora* (SMACRO) e *S. maydis* (SMAY) em grãos ardidos de milho, com os fatores: safra agrícola, local de cultivo e híbrido de milho.

Fonte da Variação	Graus de Liberdade	Pr > F				
		ASPER	PENIC	FUSAR	SMACRO	SMAY
Safra	1	0,0037*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,3933 ^{NS}
Local	2	0,0165*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
Safra x local	2	0,0009*	0,0001*	0,0019*	0,0001*	0,0001*
Genótipo	10	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
Safra x genótipo	10	0,0008*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0535*
Local x genótipo	20	0,0131*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*
Safra x local x genótipo	20	0,0755 ^{NS}	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*

* significativo, ao nível de 5% de probabilidade; NS, não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Na safra 2011/12 verificou-se maior incidência de *Fusarium* spp. em Arapoti e Tibagi (18,12 e 19,87 %) e de *S. macrospora* em Castro e Tibagi (22,36 e 18,82 %) ($p = 0,001$). Para os fungos *S. maydis* e *Penicillium* spp. as maiores incidências foram em Tibagi (2,89 e 4,60 %) ($p = 0,001$ e 0,05) (Tabela 4). Já na safra 2012/13 a maior incidência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foi em Tibagi (15,62 e 6,93 %) e para *S. macrospora* e *S. maydis* foi em Castro (2,89 e 1,89 %) (Tabela 5).

Tabela 4. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o local, safra 2011/12.

Local	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
Castro	0,26	12,13 b	22,36 a	0,46 c	3,25 b
Arapoti	0,12	18,12 a	9,14 b	1,51 b	2,22 ab
Tibagi	2,49	19,87 a	18,82 a	2,89 a	4,60 a
Teste F	0,49 ns	29,30 ***	63,24 ***	13,30 ***	4,02 *
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	34,95	22,40	16,54	32,60	49,45

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

*=significativo ao nível de 5% de probabilidade

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Tabela 5. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o local, safra 2012/13.

Local	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
Castro	0,09 b	8,65 c	2,89 a	1,89 a	1,56 c
Arapoti	0,93 a	11,87 b	1,88 b	1,27 b	3,22 b
Tibagi	0,36 a	15,62 a	0,00 c	1,58 ab	6,93 a
Teste F	10,65 ***	131,23 ***	83,60 ***	9,31 **	86,92 ***
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	32,67	13,91	20,20	16,50	27,55

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

**=significativo ao nível de 1% de probabilidade

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Na análise conjunta dos três locais, independente da safra, Tibagi teve maior incidência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. (17,74 e 5,76 %), enquanto Castro apresentou maior incidência de *S. macrospora* (12,62 %) (Tabela 6). Esses resultados corroboram com os obtidos por Ramos et al. (2010), que analisando grãos e sementes provenientes de várias regiões produtoras do país, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, encontrou a maior incidência dos fungos *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp.

Tabela 6. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o local.

Local	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
Castro	0,17 b	10,39 c	12,62 a	1,18 b	2,41 b
Arapoti	0,53 a	14,99 b	5,51 c	1,39 a	2,72 b
Tibagi	1,43 ab	17,74 a	9,41 b	2,23 a	5,76 a
Teste F	3,28 *	98,29 **	53,57 ***c	9,55 **	12,19 **
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	33,67	19,29	18,55	25,45	37,01

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

*=significativo ao nível de 5% de probabilidade

**=significativo ao nível de 1% de probabilidade

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Analisando as safras, independente do local, a safra 2011/12, apresentou incidência significativamente maior de *Fusarium* spp. e *S. macrospora* (16,71 e 16,77 %) (Tabela 7). Esse resultado pode ser devido a safra 2011/12 ter apresentado médias de temperatura mais baixas no início da cultura (Castro 14° C, Arapoti 18° C e Tibagi 17° C) quando comparada com a safra 2012/13 (Castro 17° C, Arapoti 19° C e Tibagi 19° C). A safra 2011/12 apresentou temperaturas mais elevadas no final do ciclo da cultura. Castro apresentou temperatura mais baixa com relação a Tibagi e Arapoti, nas duas safras (Figuras 11 e 12).

Tabela 7. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com a safra.

Safra	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
2011/12	0,96 a	16,71 a	16,77 a	1,62 a	3,36 b
2012/13	0,46 b	12,05 b	1,59 b	1,58 a	3,90 a
Teste F	7,06 **	104,31 **	1552,13 **	0,34 *	28,45 **
Média Geral	0,48	14,033	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	33,67	19,29	18,55	25,45	37,01

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

*=significativo ao nível de 5% de probabilidade

**=significativo ao nível de 1% de probabilidade

Com relação aos índices pluviométricos, é possível observar maiores índices durante o mês de outubro nos três locais na safra 2011/12 quando comparado com o mesmo mês na safra 2012/13. Estes eventos climáticos podem ter contribuído para a maior incidência de fungos na safra 2011/12.

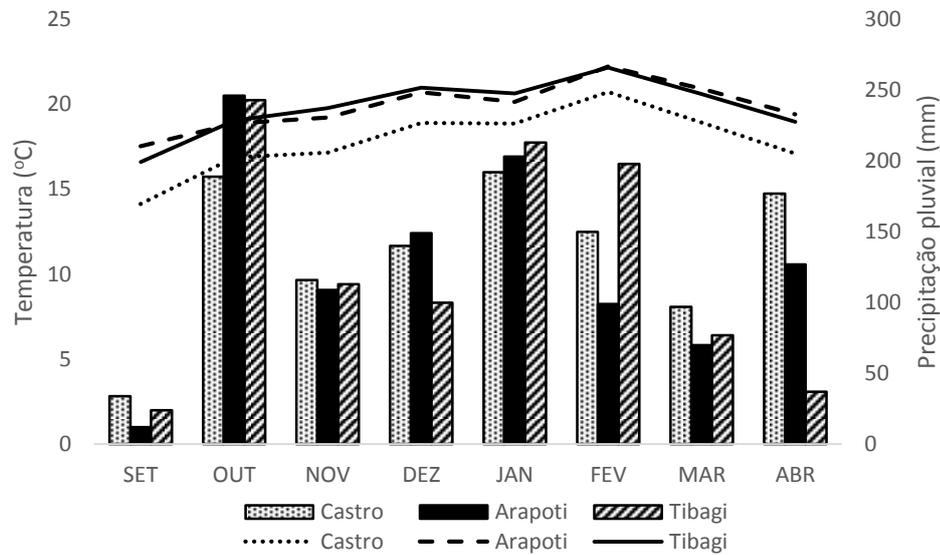


Figura 11. Temperatura média do ar (°C) e precipitação pluvial (mm) observada entre 01 de setembro de 2011 e 30 de abril de 2012, nos municípios de Castro, Arapoti e Tibagi, Paraná.

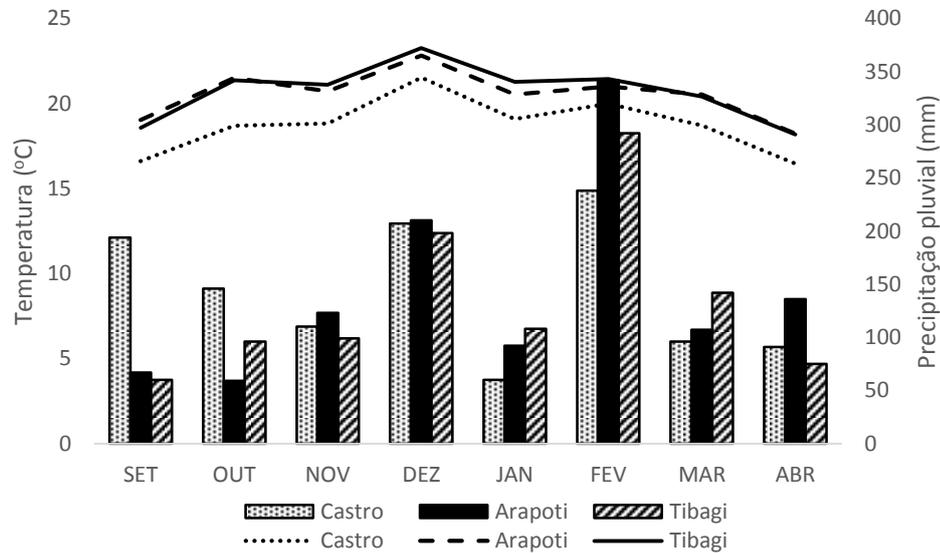


Figura 12. Temperatura média do ar (°C) e precipitação pluvial (mm) observada entre 01 de setembro de 2012 e 30 de abril de 2013, nos municípios de Castro, Arapoti e Tibagi, Paraná.

Os híbridos de milho também apresentaram diferenças significativas na incidência de fungos. Na safra 2011/12 o híbrido P30F53Hnsr apresentou maior incidência de *S.*

macrospora (31,25 %), *Fusarium* spp. (24,31 %) e *S. maydis* (5,56 %) (Tabela 8), enquanto que este mesmo híbrido na safra 2012/13, embora ainda tenha apresentado alta incidência de *Fusarium* spp. (12,73 %), não apresentou incidência de *S. macrospora* (0,00) (Tabela 9). A resposta dos híbridos de acordo com o local (Tabelas 10, 11 e 12) apenas o híbrido P30F53Hnsr apresentou o mesmo comportamento à *Fusarium* spp. em dois locais (Castro e Arapoti), mas não foi possível inferir que o local influenciou a resposta do híbrido.

Tabela 8. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido na safra 2011/12

Híbrido	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
BG7046	0,20	16,40 bcd	12,80 bc	1,73 abc	1,60 ab
BG7051H	0,24	18,53 abc	17,71 ab	1,54 abc	4,22 ab
CD 324	0,08	15,87 bcd	15,12 bc	1,42 abc	2,92 ab
CeleronTL	0,10	11,57 d	14,51 bc	0,21 bc	6,97 a
DKB240PRO	0,00	17,44 abcd	22,46 ab	1,63 abc	1,74 ab
DOW2A550Hx	0,00	19,75 ab	17,50 ab	2,50 ab	1,05 b
FormulaTL	0,07	14,14 bcd	14,03 bc	1,35 abc	1,69 ab
P1630H	0,34	14,72 bcd	14,30 bc	0,07 c	3,77 a
P2530	0,14	12,69 cd	15,36 b	1,67 abc	3,17 ab
P30F53Hnsr	0,42	24,31 a	31,25 a	5,56 a	1,14 b
P32R22H	8,96	18,36 abcd	9,45 c	0,13 bc	8,64 ab
Teste F	1,15 ns	5,69 ***	6,19***	3,70 **	3,51 *
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	34,95	22,40	16,54	32,60	49,45

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

*=significativo ao nível de 5% de probabilidade

**=significativo ao nível de 1% de probabilidade

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Outros trabalhos também encontraram diferenças significativas na composição de espécies presentes em grãos de milho. Mendes et al. (2011) em experimentos realizados nas safras 2006/07 e 2007/08 em Lavras, MG, verificaram diferenças significativas na incidência dos fungos *F. verticillioides* e *S. macrospora* de acordo com a safra e híbrido. Marques et al. (2009) encontraram diferenças na ocorrência dos fungos *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* em função dos teores de umidade em grãos de milho de híbridos diferentes, em duas safras, no município de Astorga no Paraná.

Tabela 9. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido na safra 2012/13

Híbrido	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
BG7046	0,00 c	8,20 b	5,60 a	4,80 b	2,73 de
BG7051H	0,41 abc	14,42 a	3,27 bc	1,98 bcd	5,90 a
CD 324	0,20 bc	10,13 b	1,80 bcde	0,60 bcd	4,60 bcde
CeleronTL	0,60 abc	14,20 a	0,00 f	1,27 bcd	4,53 abc
DKB240PRO	0,20 bc	9,35 b	2,43 bcd	3,67 bc	3,64 abcd
DOW2A550Hx	1,80 ab	10,40 b	0,67 f	1,47 bcd	1,67 e
FormulaTL	0,60 abc	13,33 a	0,27 def	0,40 d	1,60 e
P1630H	0,93 a	15,60 a	0,60 cdef	0,00 e	3,20 bcde
P2530	0,00 c	13,93 a	2,47 b	0,00 e	4,87 ab
P30F53Hnsr	0,00 c	12,73 a	0,00 f	2,73 a	7,60 a
P32R22H	0,33 bc	10,20 b	0,40 ef	0,47 cd	2,60 cde
Teste F	5,69 ***	18,45 ***	22,96 ***	23,37 ***	12,54 ***
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	32,67	13,91	20,20	16,50	27,56

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Tabela 10. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido em Castro – PR

Híbrido	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
BG7046	0,30	8,00 def	12,20 ab	0,00 d	2,60 b
BG7051H	0,30	11,90 bcd	13,20 a	0,00 d	7,20 a
CD 324	0,00	4,70 f	11,10 ab	0,10 cd	1,90 bc
CeleronTL	0,00	13,60 ab	7,70 d	0,00 d	2,60 ab
DKB240PRO	0,00	10,72 bcde	21,25 abc	6,12 a	3,20 ab
DOW2A550Hx	0,10	9,50 cdef	8,44 cd	2,20 b	0,33 c
FormulaTL	0,10	4,61 f	10,10 abc	1,72 bc	1,51 bc
P1630H	0,40	13,30 bc	10,00 cd	0,00 d	1,70 bc
P2530	0,10	10,91 bcde	9,87 abc	0,00 d	2,44 b
P30F53Hnsr	0,62	20,37 a	25,00 abc	2,70 ab	1,60 bc
P32R22H	0,00	6,70 ef	10,00 abc	0,10 cd	1,40 bc
Teste F	1,72 ns	11,97 ***	8,11 ***	17,71 ***	6,33 ***
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	32,11	24,98	13,34	20,42	42,72

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Tabela 11. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido em Arapoti – PR

Híbrido	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
BG7046	0,00 b	16,70 abc	5,40 ab	0,00 e	3,00 bcd
BG7051H	0,31 ab	17,03 ab	6,70 abc	4,97 a	2,84 abcd
CD 324	0,21 ab	16,40 abc	1,93 cd	0,00 e	2,64 abcd
CeleronTL	0,76 ab	14,05 bcd	7,81 ab	2,21 bc	4,41 ab
DKB240PRO	0,21 ab	12,48 de	6,09 a	0,11 de	1,46 cd
DOW2A550Hx	2,60 a	15,85 abcd	7,25 ab	0,94 cde	1,52 cd
FormulaTL	0,50 ab	16,70 abc	0,10 d	0,60 cde	1,00 d
P1630H	0,40 ab	13,20 cde	3,20 abc	0,00 e	2,00 bcd
P2530	0,10 ab	10,02 e	6,96 a	0,00 e	4,81 a
P30F53Hnsr	0,00 ab	18,69 a	11,87 a	5,64 ab	3,81 abc
P32R22H	0,70 ab	13,800 bcde	3,30 bcd	0,80 cd	2,40 bcd
Teste F	2,05 *	9,64 ***	8,47 ***	26,30 ***	4,79***
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	35,10	12,30	26,68	21,76	37,83

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

*=significativo ao nível de 5% de probabilidade

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Tabela 12. Ocorrência (%) de fungos associados a grãos ardidos de milho de acordo com o híbrido em Tibagi – PR

Híbrido	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>	<i>Penicillium</i> spp.
BG7046	0,00 b	12,20 bc	10,00 ab	9,80 a	0,90 c
BG7051H	0,36 ab	20,49 a	11,56 a	0,31 c	5,12 ab
CD 324	0,20 ab	17,90 abc	12,34 a	2,93 ab	6,74 ab
CeleronTL	0,30 ab	11,00 c	6,25 bc	0,00 c	10,25 ab
DKB240PRO	0,10 b	16,99 abc	10,00 a	1,72 bc	3,40 bc
DOW2A550Hx	0,00 b	19,87 ab	11,56 a	2,81 bc	2,22 bc
FormulaTL	0,40 ab	19,90 ab	11,25 a	0,31 c	2,42bc
P1630H	1,12 a	18,97 ab	9,16 ab	0,10 c	6,76 a
P2530	0,00 b	19,00 ab	9,90 ab	2,50 bc	4,80 ab
P30F53Hnsr	0,00 b	16,50 abc	10,00 ab	4,10 ab	7,70 ab
P32R22H	13,23 ab	22,33 ab	1,47 c	0,00 c	13,06 abc
Teste F	3,23 *	3,86 **	7,80 ***	10,57 ***	6,40 ***
Média Geral	0,48	14,03	8,26	1,60	3,40
CV exp. (%)	33,18	20,62	15,59	31,30	31,76

Nota: Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% da probabilidade.

*=significativo ao nível de 5% de probabilidade

**=significativo ao nível de 1% de probabilidade

***=significativo ao nível de 0,1% de probabilidade

Na média geral, independente do local e safra, o fungo com maior incidência foi *Fusarium* spp. (14,03%), seguido de *S. macrospora* (8,26 %) e *Penicillium* sp. (3,40 %). Em trabalho realizado por Otoni (2008) houve 100% de incidência de *Fusarium* spp. em 100 amostras analisadas em duas safras 2006 e 2007, variando em níveis de 34 a 91%. Morello et al. (1994) na safra 93/94, no estado de Tocantins, examinando 42 híbridos de ciclo normal, observaram que 15,9 % das espigas de milho apresentavam sintomas de podridão, sendo que 75,5 % estavam infectadas por *Fusarium* sp. e 19,1% por *Stenocarpella* sp. Goulart & Fialho (1999) analisando 313 amostras de grãos de milho em quatro safras (1993/94 a 1996/97) no Mato Grosso do Sul, encontraram *F. moniliforme* (= *F. verticillioides*) em 100% das amostras, com incidência média de 56,7%.

Embora o estudo realizado por Molin (1999) em Castro e Arapoti, na safra 1997/98, não tenha analisado a incidência de espécies de fungos e sim de micotoxinas, ocratoxina e tricotecenos não foram detectadas ao nível de 4 e 100 ng. g⁻¹, o que evidencia baixa incidência dos fungos produtores destas micotoxinas, ou seja, *Aspergillus* spp. e *Fusarium graminearum*. No estudo aqui apresentado, também se verificou a baixa incidência destes fungos, o que pode ser explicado pelas condições ambientais de temperatura e chuva, estágio de maturidade de grãos e competição fúngica de ocorrência natural.

CONCLUSÕES

- A incidência de fungos nos grãos ardidos não está relacionada com a incidência de grãos ardidos nas amostras analisadas;
- A safra, o local e o híbrido de milho tem influência na incidência de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *S. macrospora*. Destes fatores o primeiro não teve influência sobre *S. maydis*;
- A maior incidência sobre as amostras de grãos ardidos analisadas foi do gênero *Fusarium* spp. (14,0%), seguido de *S. macrospora* (8,3%), os demais fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *S. maydis* tiveram baixa incidência nos grãos (> 3,4%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D.M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v.80, n.3, p.189-201, 2014.
- CASA, R.T. ***Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* associados a sementes de milho**. 1997. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.427-439, 2006.
- DESJARDINS, A.E. ***Fusarium* Mycotoxins, Chemistry, Genetics and Biology**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2006. 260p.
- GOULART, A.C.P., FIALHO, W.F.B. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* Sheldon em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, p.216-221, 1999.
- MARQUES, O.J. et al. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, p.667-675, 2009.
- MENDES, M.C. et al. Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos fungos causadores de podridões de espiga. **Ciências agrotec.**, v.35, p.931-939, 2011.
- MORELLO, C. L. et al. Fungos associados à podridão de espigas de milho, ciclo normal, no Estado do Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.272, 1994.
- MOLIN, R. **Avaliação de micotoxinas em grãos de milho nos estádios fenológicos próximos a colheita**. 1999. 68p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1999.
- OTONI, J.R. **Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxicogênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz Eça de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- PATAKY, J.K. Fungal Stalk Rots. In: White, D. G. **Compendium of Corn Diseases**. Minnesota, The American Phytopathological Society, 2000. 78p.
- PINTO, N.F.J.A. **Grãos ardidos em milho**. (Circular Técnica, 66). Embrapa, Sete Lagoas, 6p, 2005.
- RAMOS, A.T.M. et al. Levantamento da microflora presente em grãos ardidos e sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.257-259, 2010.
- ZAR, J. H. **Bioestatistical Analysis**. New Jersey, 1999. 663p.

Capítulo 2

Identificação molecular e caracterização filogenética de espécies de *Fusarium* associadas a grãos ardidos de milho

Identificação molecular e caracterização filogenética de espécies de *Fusarium* associadas a grãos ardidos de milho

RESUMO

Espécies do gênero *Fusarium* são comumente encontradas associadas a grãos ardidos de milho. As espécies mais comumente associadas às doenças em milho, como *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, do complexo *Fusarium fujikuroi*, embora apresentem características distintas morfológicamente das espécies do complexo *F. graminearum*, fazer a diferenciação entre espécies através destas características consome muito tempo e necessitam de elevado nível de conhecimento. Sendo assim, métodos baseados no DNA podem contribuir para o reconhecimento destas espécies e de espécies indistinguíveis morfológicamente. Assim, este estudo realizou a identificação das espécies de *Fusarium* isolados de grãos ardidos provenientes de duas safras (2012/13 e 2014/15) e dois locais (Arapoti e Castro) através da técnica de PCR com *primers* espécie-específicos e sequenciamento parcial do gene *tef-1*. Ademais, isolados das espécies *F. verticillioides* e *Fusarium* sp., outras espécies do complexo *F. fujikuroi* e espécies não identificadas foram caracterizados filogeneticamente com base em sequências de DNA do gene *tef-1* (~ 650 pb). A identificação molecular de espécies de *Fusarium*, realizada com base na análise de culturas monospóricas obtidas de grãos ardidos de dois híbridos na safra 2012/13 e de quatro híbridos na safra 2014/15, em dois locais (Castro e Arapoti), revelou que em ambas as safras, a espécie predominante foi *F. verticillioides* (92,6 e 92,3%) em Arapoti e (56,7 e 51,6%) em Castro; seguido por *Fusarium* sp. (7,4 e 7,7%) em Arapoti e (20,0 e 18,8%) em Castro, outras espécies do complexo *F. fujikuroi* (0,0%) em Arapoti e (13,3 e 28,1%) em Castro, *F. proliferatum* (0,0%) em Arapoti e (3,3 e 0,0%) em Castro, *Fusarium incarnatum* (0,0%) em Arapoti e (0,0 e 1,6%) em Castro. A análise filogenética com base em sequências de DNA do gene *tef-1α* não mostrou evidências de estruturação de *F. verticillioides* em subpopulações; enquanto que para *Fusarium* sp. e espécies do complexo *F. fujikuroi* houve evidências de estruturação em subpopulações.

Palavras-chave: Grãos ardidos. *Fusarium*. PCR. Análise filogenética.

Molecular identification and phylogenetic characterization of *Fusarium* species associated to rot grains in corn

ABSTRACT

Fusarium species are commonly found in rot grains in corn. The most commonly species associated to corn diseases, like *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, from *Fusarium fujikuroi* complex, even show distinct characteristics from *F. graminearum* species complex, to do the differentiation between species from these characteristics takes much time and need high level of knowledge. Thus, DNA-based methods can contribute to the recognition of these species and species morphologically indistinguishable. This study analysed the identification of *Fusarium* species isolated from rot grains from two crop years (2012/13 e 2014/15) and two local (Arapoti e Castro) by PCR with species-specific primers and partial sequencing the *tef-1* gene. Moreover, isolates of the species *F. verticillioides*, *Fusarium* sp., other species of *F. fujikuroi* complex and non-identified species were phylogenetically characterized based on DNA sequences of the *tef-1* (~ 650 pb). The molecular identification of *Fusarium* species, based on the analysis of monosporic culture obtained from rot grains of two hybrids in crop year 2012/13 and from four hybrids in crop year 2014/15, at two places (Castro e Arapoti), revealed that in both crop years, the predominant species was *F. verticillioides* (92.6 and 92.3%) in Arapoti and (56.7 e 51.6%) in Castro; followed by *Fusarium* sp. (7.4 and 7.7%) in Arapoti and (20.0 and 18.8%) in Castro, other species of *F. fujikuroi* complex (0.0%) in Arapoti and (13.3 and 28.1%) em Castro, *F. proliferatum* (0.0%) in Arapoti and (3.3 and 0.0%) in Castro, *Fusarium incarnatum* (0.0%) in Arapoti and (0.0 e 1.6%) in Castro. The phylogenetic analysis based on DNA sequences of the TEF-1 gene did not show evidence of structuring of *F. verticillioides* in subpopulations; while for *Fusarium* sp. e other species of *F. fujikuroi* complex was evidence of structure in subpopulations.

Keywords: Rot grains. *Fusarium*. PCR. Phylogenetic analysis.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Fusarium* são comumente encontradas associadas a grãos ardidos de milho (WHITE, 1999). Entre as espécies, aquelas do complexo de espécies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC), que inclui *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans* e *Fusarium proliferatum*, são as mais comumente encontradas em grãos de milho, em regiões temperadas e são responsáveis pela produção de fumonisinas. Já as espécies do Complexo *Fusarium graminearum* (FGSC), tendo a espécie *F. graminearum* como principal representante, são responsáveis pela produção de tricotecenos, e ocorrem em regiões de clima mais frio e após cultivo de trigo, onde a principal podridão das espigas é causada por *Fusarium graminearum* (KUHNEM JÚNIOR et al. 2013; AOKI et al. 2014).

As espécies mais comumente associadas às doenças em milho, como *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, do complexo *Fusarium fujikuroi*, embora apresentem características distintas morfológicamente das espécies do complexo *F. graminearum*, fazer a diferenciação entre espécies através destas características consome muito tempo e necessitam de elevado nível de conhecimento. Sendo assim, métodos baseados no DNA podem contribuir para o reconhecimento destas espécies e de espécies indistinguíveis morfológicamente. Técnicas moleculares têm sido usadas com sucesso para identificação de algumas espécies de fungos e para detecção de genes de biossíntese de micotoxinas (CHULZE et al. 2000; JURADO et al. 2010). O gene *tef-1 α* vem sendo amplamente utilizado para diferenciação filogenética de espécies de *Fusarium* pois demonstra um elevado grau de polimorfismo quando comparado com outros genes de codificação de proteínas como calmodulina, beta-tubulina e histona H3 (GEISER et al. 2004).

Estudos realizados em vários locais do mundo revelam que a espécie predominante associada a grãos ardidos em milho é *F. verticillioides* (Adejumo et al. 2007; Dorn et al. 2008; Otoni. 2008; Oliveira Rocha et al. 2011).

As condições climáticas para a ocorrência de determinadas espécies devem-se as diferenças na temperatura e umidade, que podem influenciar a fisiologia do fungo e produzir mudanças nas linhagens (MORETTI et al. 2008).

O objetivo do estudo foi realizar a identificação molecular das espécies de *Fusarium* de isolados obtidos de amostras de grãos ardidos e proceder a caracterização filogenética das mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Dados das amostras – As amostras de grãos ardidos analisadas, são provenientes de ensaios do Setor de Fitotecnia da Fundação ABC. Os locais de cultivo foram os campos experimentais da Fundação ABC, localizados nos municípios de Castro e Arapoti, no estado do Paraná. A localização dos campos experimentais é a seguinte: (1) Castro-PR: Lat 24° 51'S Long 49° 56' O, altitude 1001 m e (2) Arapoti-PR: Lat 24° 11'S Long 49° 51' O, altitude 902 m.

Na safra 2012/13 foram analisadas amostras de grãos ardidos de milho dos híbridos DKB 240 PRO e P 1630H; e da safra 2014/15, os híbridos DKB 240 PRO, P 1630H, P 2530 e P 32R22H.

As amostras de espigas de milho contendo grãos ardidos ou manchados foram debulhadas manualmente para a coleta de grãos ardidos e após a trilha manual e homogeneização da amostra colhida, foi separada uma amostra de 250 gramas de cada híbrido, e selecionados os grãos com sintomas de ardidos ou manchados (> 25% da área do grão afetada). Os grãos sintomáticos foram enviados ao Laboratório de Sementes da Fundação ABC (LabEF) para identificação dos fungos associados.

4.4.2 Obtenção de isolados monospóricos de *Fusarium* spp. – Para desenvolvimento dos fungos sobre os grãos ardidos foi utilizado teste de Blotter com 100 sementes de cada amostra, divididas em cinco repetições. O teste de Blotter consiste na incubação dos grãos em caixas tipo gerbox (10,5 x 10,5 x 4,0 cm), com quatro folhas de papel filtro (80 gramas) umedecidos em água pura esterilizada e colocados em sala climatizada (20 ± 2° C), com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

Para obtenção de isolados monospóricos, após o período de incubação, foi realizada a transferência de estruturas fúngicas de *Fusarium* spp. associadas aos grãos para placas de Petri (60 x 15 cm) contendo meio de cultura de Batata Dextrose Agar (BDA), incubadas em sala climatizada (20 ± 2° C), com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após esse período com auxílio de uma pinça previamente esterilizada, pequenas porções da colônia contendo microconídios foram colocadas em tubos de ensaio, contendo 5 mL de água

destilada esterilizada. Os tubos eram agitados e 100 uL da suspensão era vertida em placas de Petri (90 x 15 cm) contendo meio ágar-agua, onde permaneciam 'overnight'. Com auxílio de microscópio estereoscópico, conídios germinados foram transferidos isoladamente para novas placas de Petri contendo meio BDA para obtenção de colônia pura. As placas foram mantidas em sala climatizada ($20 \pm 2^\circ \text{C}$), com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Após o crescimento do fungo e confirmação de que a colônia estava pura, os isolados foram utilizados para extração de DNA (Figura 13).

Os locais selecionados para estas avaliações foram Castro e Arapoti. Embora Tibagi tenha apresentado maior incidência de *Fusarium* spp., conforme observado nas duas safras (2011/12 e 2012/13) (Tabela 5), Castro e Arapoti estão geograficamente mais distantes entre si (aproximadamente 130 km), com peculiaridades climáticas distintas, para avaliação do efeito do clima sobre as espécies de *Fusarium* associadas aos grãos ardidos.



Figura 13. Cultura monospórica de um isolado de *Fusarium* sp. para extração de DNA. (Foto: D. Tasiar)

4.4.3 Extração de DNA de isolados de *Fusarium* spp. – O DNA de isolados monospóricos foi extraído segundo protocolo CTAB, descrito por Doyle & Doyle (1987), com modificações. O micélio do fungo foi raspado da superfície da placa com uma espátula côncava e triturado com nitrogênio líquido até se tornar um pó fino. Logo após esse pó foi transferido para um microtubo plástico tipo eppendorf, de 1,5 mL e adicionados 700 µL da solução tampão de extração (CTAB 2%; 15 uL de 2-βmercaptoetanol). O tubo contendo o material foi incubado a 65° C por 15 minutos em banho seco. Após, foram adicionados 520 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) submetendo a uma agitação em vórtex por 1 min e em seguida a uma centrifugação a 11.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante (500 µL) foi transferido para um novo microtubo e adicionados 5 µL de uma suspensão de RNase de 20 mg/mL, 500 µL de isopropanol gelado e 250 µL de acetato de amônio 7,5M para remoção dos polissacarídeos. Os microtubos foram invertidos suavemente por mais ou menos 20 vezes, sendo novamente centrifugados por mais 10 min a 11.000 rpm. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70% gelado. A amostra foi novamente centrifugada por 5 min a 11.000 rpm, o sobrenadante foi descartado novamente e o precipitado foi seco com papel toalha comum esterilizado. Foram adicionados 100 µL de tampão TE (pH 7,6) para ressuspender o precipitado e os microtubos foram armazenados em geladeira por 24 horas antes da reação de PCR.

4.4.4 Identificação molecular – Os isolados foram submetidos a quatro reações de PCR com o objetivo de confirmar se os isolados pertenciam aos gêneros *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium subglutinans* ou *Fusarium graminearum* através de pares de primers desenvolvidos baseados na sequência parcial do gene calmodulina. As reações para identificação de espécie seguiram o protocolo proposto por Mulè et al. (2004). O volume total das reações de amplificação foi de 24 µL, contendo 1,0 µL de DNA (5 ng), 0,5 µL de cada primer a uma concentração de 10 µM (*F. verticillioides* VER1F: 5' CTTCTGCGATGTTTCTCC 3' e VER2R: 5' AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA 3'; *F. proliferatum* PRO1F: 5' CTTTCCGCCAAGTTTCTTC 3' e PRO2R: 5'TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG 3'; *F. subglutinans* SUB1F: 5' CTGTCGCTAACCTCTTTATCCA 3' e SUB2R: 5' CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA 3'; *F. graminearum* FG1F: 5'

CTCCGGATATGTTGCGTCAA 3' FG2R: 5' GGTAGGTATCCGACATGGCAA 3'), 0,125 µL *Taq* DNA polimerase 5U/µL, 2,5 µL de Buffer 10X, 0,75 de MgCl₂ 50mM, 0,05 µL de dNTPs 10mM e 19,5 µL de água. O protocolo de amplificação do PCR foi de 1 ciclo inicial de 5 minutos a 95° C (desnaturação), seguido de 35 ciclos por 30 segundos a 95° C (desnaturação), 30 segundos a 52° C (anelamento) e 30 segundos a 72° C (extensão), e um ciclo final de 4 minutos a 72° C. A identificação por primers com especificidade para espécies de *Fusarium* foi complementada pela identificação por sequenciamento de uma porção do gene fator de alongação 1-α (*tef-1α*) (~ 650 pb). As sequências foram editadas utilizando o programa BioEdit v7.0.9.0 e comparadas no banco de dados *Fusarium* ID v1.0 (<http://isolate.fusariumdb.org/blast.php>), por meio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL, 1990). A amplificação do gene *tef-1α* dos isolados foi realizada utilizando os primers: Ef-1 (forward: 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse: 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') gerando um fragmento de 691 pb. As condições de ciclo para *tef-1α* foram: 94 °C, por 1 minuto; 34 ciclos; 94 °C, por 30 segundos; 62 °C, por 45 segundos; 72 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 5 minutos (O'DONNELL et al., 1998). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, com posterior visualização realizada em um transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit GenElute PCR Clean-up Kit (Sigma-Aldrich) para serem enviados para sequenciamento no Laboratório de Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Os fragmentos gênicos foram sequenciados nas direções senso e antisenso.

4.4.5 Análise de dados – As espécies foram analisadas utilizando o teste de qui-quadrado (χ^2) através do comando PROC FREQ, no programa SAS.

A caracterização filogenética das espécies foi realizada mediante alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos gerados utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (THOMPSON et al, 1994), implementado pelo programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2011). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente utilizando o programa BioEdit.

A análise filogenética foi realizada pelos métodos de *Máxima parcimônia* e *Máxima verossimilhança*, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, através do programa

Mega6 (TAMURA et al., 2011). Foram inferidas árvores filogenéticas mostrando o relacionamento entre os isolados e/ou espécies encontradas.

Para gerar as árvores, cada espécie foi comparada com duas linhagens do banco de dados *Fusarium-ID*. As espécies de *Fusarium* não identificadas, aquelas identificadas como outras espécies do complexo *F. fujikuroi* e as aquelas que não se assemelharam a nenhuma sequência foram comparadas com duas sequências de referência de *F. proliferatum* (FD_01378 e FD_01379), uma sequência de *F. subglutinans* (FD_01160) e duas sequências de *F. verticillioides* (FD_01387 e FD_01388).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Identificação da espécie – Foram identificados 147 isolados de *Fusarium* spp. oriundos de dois híbridos de milho na safra 2012/13 e de quatro híbridos na safra 2014/15, de dois locais, Castro e Arapoti (Tabela 13).

Tabela 13. Local e ano de coleta dos isolados obtidos em grãos ardidos de milho.

Isolado	Local	Ano de Coleta
45, 47, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 499, 501, 503, 505, 507, 509, 511, 513, 515, 517, 537, 539, 541, 543, 545, 547, 549, 551, 553	Castro	2013
1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 485, 487, 489, 491, 493, 495, 497, 519, 521, 523, 525, 527, 529, 531, 533, 535	Arapoti	2013
281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349, 351, 355, 357, 359, 361, 363, 365, 367, 369, 371, 373, 375, 377, 379, 381, 383, 385, 387, 389, 391, 393, 395, 397, 399, 401, 403, 405, 407, 409, 411, 413	Castro	2015
209, 211, 213, 215, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 353, 421, 423	Arapoti	2015

Os resultados da identificação dos isolados mediante BLAST Search de sequências de DNA do gene *tef-1 α* no banco de dados *Fusarium-ID* é mostrada na Tabela 14.

Tabela 14. Identificação de isolados de *Fusarium* obtidos de grãos ardidos mediante BLAST search de sequências de DNA de uma porção do gene *tef-1α* com o banco de dados *Fusarium-ID* e similaridade com sequências de referência obtidas no *Fusarium-ID*.

Isolado	% Identidade	Espécie	Strain de Referência
1, 3, 15, 17, 21, 45, 65, 67, 209, 211, 213, 215, 243, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 287, 289, 291, 295, 301, 303, 305, 307, 309, 315, 317, 319, 321, 329, 331, 333, 335, 339, 341, 345, 353, 363, 369, 371, 373, 375, 385, 387, 389, 391, 393, 397, 409, 411, 421, 423, 485, 487, 489, 491, 497, 499, 503, 509, 511, 513, 515, 517, 519, 521, 523, 525, 529, 531, 535, 539, 541, 543, 549, 553.	84,2 a 99,8	<i>Fusarium verticillioides</i>	FD_01388_EF-1a
5, 7, 13, 19, 495, 507, 533	92,9 a 98,9	<i>Fusarium verticillioides</i>	FD_01387_EF -1a
9,11	93,3	<i>Fusarium verticillioides</i>	FD_01760_EF-1a
47, 527, 545, 547	88,6 a 98,3	<i>Fusarium</i> sp.	FD_01856_EF-1a
51, 53, 55, 245, 247, 323, 325, 327, 337, 355, 361, 377, 379, 383, 401, 403, 405, 493, 537	88,9 a 99,8	<i>Fusarium</i> sp.	FD_01857_EF-1a
57,59	-	-	-
61, 283, 285, 293, 297, 299, 347, 349, 351, 357, 359, 367, 381, 395, 399, 407, 501, 505	91,7 a 98,2	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	FD_01757_EF-1a
63	96,6	<i>Fusarium proliferatum</i>	FD_01389_EF-1a
281, 365	87,9 a 98,2	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	FD_01759_EF-1a
343	97,3	<i>Fusarium incarnatum</i>	FD_01679_EF-1a
413	96,5	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	FD_01774_EF-1a
551	99,5	Complexo <i>F. fujikuroi</i>	FD_01149_EF-1a

Os 57 isolados obtidos em 2013 foram identificados primeiramente utilizando primers específicos para espécies de *Fusarium*, protocolo desenvolvido por Mulè et al. (2014) e posteriormente foram identificados com base em sequencias de DNA do gene *tef-1α*, submetidas a BLAST Search no *Fusarium-ID* (Tabela 15).

Tabela 15. Identificação molecular de espécies de isolados de *Fusarium* obtidos de grãos ardidos de milho por PCR com oligonucleotídeos primers com especificidade* para *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* e *F. graminearum*, e por PCR/sequenciamento de uma porção do gene *tef-1 α* mediante BLAST search no Fusarium-ID.

Isolado	Local	Primers específicos	Sequenciamento
1	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
3	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
5	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
7	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
9	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
11	Arapoti	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. verticillioides</i>
13	Arapoti	<i>F. subglutinans</i>	<i>F. verticillioides</i>
15	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
17	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
19	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
21	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
45	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
47	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>Fusarium</i> sp.
51	Castro	<i>F. proliferatum</i>	<i>Fusarium</i> sp.
53	Castro	<i>F. proliferatum</i>	<i>Fusarium</i> sp.
55	Castro	<i>F. proliferatum</i>	<i>Fusarium</i> sp.
57	Castro	<i>F. proliferatum</i>	-
59	Castro	<i>F. proliferatum</i>	-
61	Castro	<i>F. subglutinans</i>	Complexo <i>F. fujikuroi</i>
63	Castro	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. proliferatum</i>
65	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
67	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
485	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
487	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
489	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
491	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
493	Arapoti	<i>F. proliferatum</i>	<i>Fusarium</i> sp.
495	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
497	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
499	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
501	Arapoti	<i>F. subglutinans</i>	Complexo <i>F. fujikuroi</i>
503	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
505	Arapoti	<i>F. subglutinans</i>	Complexo <i>F. fujikuroi</i>
507	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
509	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>

Tabela 15, cont.

511	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
513	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
515	Arapoti	Não amplificou	<i>F. verticillioides</i>
517	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
519	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
521	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
523	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
525	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
527	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
529	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
531	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
533	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
535	Arapoti	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
537	Castro	<i>F. proliferatum</i>	<i>Fusarium</i> sp.
539	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
541	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
543	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
545	Castro	Não amplificou	<i>Fusarium</i> sp.
547	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
549	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>
551	Castro	Não amplificou	Complexo <i>F. fujikuroi</i>
553	Castro	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. verticillioides</i>

* Protocolo desenvolvido por Mulè et al. (2004).

Surpreendentemente, não houve concordância entre a identificação utilizando primers específicos e BLAST Search para 13 isolados: 11, 13, 47, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 493, 501, 505 e 537. Cinco isolados (51, 53, 55, 493 e 537) identificados como *F. proliferatum* utilizando primer específico, foram identificados como *Fusarium* sp. e dois (57 e 59) não encontraram correlação com nenhuma sequência depositada. Dois isolados (11 e 13) que foram identificados como *F. subglutinans* utilizando primers específicos, foram identificados como *F. verticillioides* através do sequenciamento.

Outros três isolados (61, 501 e 505) identificados como *F. subglutinans*, foram identificados como pertencente ao complexo *Fusarium fujikuroi* através do sequenciamento. O isolado 47 foi identificado como *F. verticillioides* utilizando primer específico e como *Fusarium* sp. através do sequenciamento. Dos três isolados (515, 545 e 551) que não

amplificaram com nenhum primer específico, um foi identificado como *F. verticillioides*, outro como *Fusarium* sp., e o terceiro como outra espécie do complexo *F. fujikuroi*. Esses resultados apontam a necessidade da validação de primers devolvidos por Mulè (2004) para identificação de espécies de *Fusarium* spp.

Analisando os dados estatisticamente, o teste de qui-quadrado (χ^2) mostrou que a composição das espécies não diferiu significativamente de um ano para o outro. De outro modo, a composição de espécies diferiu entre os locais Arapoti e Castro ($P \leq 0,05$).

Verificou-se que em ambas safras e locais (Tabelas 16 e 17), a espécie predominante foi *F. verticillioides* (92,6 e 92,3%) em Arapoti e (56,7 e 51,6%) em Castro; seguida por *Fusarium* sp. (7,4 e 7,7%) em Arapoti e (20,0 e 18,8%) em Castro, outras espécies do complexo *F. fujikuroi* (0,0 %) em Arapoti e (13,3 e 28,1%) em Castro, *F. proliferatum* (0,0%) em Arapoti e (3,3 e 0,0%) em Castro, *Fusarium incarnatum* (0,0%) em Arapoti e (0,0 e 1,6%) em Castro.

Notadamente, apenas dois dentre 147 isolados (57 e 59) não se assemelharam a nenhuma espécie depositada no banco de dados *Fusarium-ID*, ambos de Castro obtidos na safra 2012/13. Outra informação relevante é que nenhum isolado de *F. graminearum* foi encontrado neste estudo. O único isolado de *F. proliferatum* encontrado foi em Castro na safra 2012/13 e o único isolado de *F. incarnatum* encontrado também foi em Castro na safra 2014/15.

Tabela 16. Identificação molecular de espécies de isolados de *Fusarium* obtidos de grãos ardidos em dois híbridos de milho nos municípios de Castro e Arapoti, Paraná, na safra 2012/13.

Local	N	<i>F. verticillioides</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>F. proliferatum</i>	Outras espécies do complexo <i>F. fujikuroi</i>	Não identificado
Arapoti	27	25 (92,6%)	2 (7,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Castro	30	17 (56,7%)	6 (20,0%)	1 (3,3%)	4 (13,3%)	2 (6,7%)
Total	57	42 (73,7%)	8 (14,0%)	1 (1,8%)	4 (7,0%)	2 (3,5%)

Tabela 17. Identificação molecular de espécies de isolados de *Fusarium* obtidos de grãos ardidos em quatro híbridos de milho nos municípios de Castro e Arapoti, Paraná, na safra 2014/15.

Local	N	<i>F. verticillioides</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>F. proliferatum</i>	Outras espécies do complexo <i>F. fujikuroi</i>	<i>F. incarnatum</i>
Arapoti	26	24 (92,3%)	2 (7,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Castro	64	33 (51,6%)	12 (18,8%)	0 (0,0%)	18 (28,1%)	1 (1,6%)
Total	90	57 (63,3%)	14 (15,6%)	0 (0,0%)	18 (20,0%)	1 (1,1%)

Estes resultados corroboram com os resultados encontrados no Brasil por Otoni (2008) onde a identificação molecular de 100 isolados de *Fusarium* spp. encontradas em grãos de milho provenientes das principais regiões produtoras do Brasil (Sul, Sudeste e Centro-Oeste), durante os anos 2006 e 2007, mostraram que 60% dos isolados pertenciam a *F. verticillioides*. Ainda no Brasil, Oliveira Rocha, et al. (2011) identificaram 96 isolados de *Fusarium*

verticillioides, de um total de 100 isolados de 200 amostras de grãos de milho de quatro diferentes regiões, utilizando o gene *tef-1α*. Adejumo et al. (2007) analisando 180 amostras de milho na Nigéria, encontraram 71% de incidência de *F. verticillioides*. Da mesma forma, Ribeiro et al. (2005) também encontraram maior percentual de *F. verticillioides* associado a grãos ardidos em diferentes híbridos e sistema de manejo da cultura em Santa Catarina, porém neste estudo as identificações foram realizadas apenas através de caracteres morfológicos.

O fato de não ter sido encontrado nenhum isolado de *F. graminearum* neste trabalho, pode ser devido à colheita dos grãos não ter sido atrasada, pois segundo trabalho realizado por Santin et al. (2004), o retardamento da colheita de grãos de milho influenciou no aumento da incidência de *F. graminearum* e na redução da incidência de *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*), indicando que esta espécie tem habilidade de se desenvolver em grãos de milho com baixo teor de umidade, enquanto que *F. verticillioides*, apresentou elevada incidência em grãos com alto teor de umidade. Trento et al. (2002) também confirmaram que a menor incidência de *F. graminearum* em dois sistemas de cultivo, monocultura e rotação de culturas, deve-se ao baixo índice de precipitação pluvial ocorrido durante o período entre os estádios de florescimento e o início de desenvolvimento de grãos. Segundo Miller (1994), citado por Trento et al. (2002), *F. graminearum* requer períodos de altas temperaturas e umidade contínua durante os estádios de floração e início de desenvolvimento de grãos.

Dorn et al. (2008) realizando estudo em duas regiões distintas na Suíça, relataram incidência significativamente maior de *F. verticillioides* nas amostras de grãos analisadas, sendo que na região norte, houve predominância de *F. graminearum* após *F. verticillioides*, e na região sul, de *F. subglutinans* após *F. verticillioides*. Segundo os autores *F. subglutinans* e *F. graminearum* são favorecidos por temperaturas mais baixas, e adicionalmente *F. graminearum* é favorecido por climas úmidos.

Vários trabalhos realizados na Argentina demonstraram que a prevalência de espécies de *Fusarium* em grãos de milho depende de condições geográficas e climáticas. *F. subglutinans* foi a espécie predominante em zonas frias e temperadas como o Norte da Argentina a qual tem um média anual variando entre 18° a 24° C (CHULZE et al. 2000, REYNOSO et al. 2002, TORRES et al. 2001), porém o mesmo não foi observado neste trabalho, pois a prevalência dos isolados identificados foi de *F. verticillioides*, e nenhum dos

isolados identificados como *F. subglutinans* através de primers específicos, teve confirmação desta espécie por meio do sequenciamento.

4.5.2 Caracterização filogenética – A árvore filogenética inferida com base em sequências de DNA do gene *tef-1* de isolados de *F. verticillioides* demonstraram que os isolados deste trabalho se agruparam com linhagens de referência de *F. verticillioides* (FD_01387, FD_01388), formando um clado com suporte estatístico de 40% (bootstrap). Embora a árvore tenha mostrado ramificações internas, o suporte estatístico para essas ramificações foi baixo, assim essas ramificações não foram consideradas para efeito de significado biológico (Figura 14). Isso demonstra não haver aparente estruturação de subpopulações nesta espécie na região compreendida pelo estudo.

Por outro lado, a árvore filogenética inferida com isolados não identificados de *Fusarium*, outras espécies do complexo *F. fujikuroi* e espécies que não se assemelharam a nenhuma sequência depositada no banco de dados *Fusarium-ID*, demonstrou três distintos cladogramas. Os isolados 527 e 547 de Arapoti e Castro, da safra 2013, formaram um clado com 100% de suporte estatístico e se assemelharam as sequências de referência de *F. verticillioides* (Figura 15).

A maioria dos isolados do complexo *F. fujikuroi* assemelhou-se ao isolado de *F. subglutinans* (FD_01160) formando um clado com estruturação de 99%. Os isolados de *Fusarium* sp., assemelharam-se à sequência de referência de *F. proliferatum* (FD_01378 e FD_1379), formando um clado com estruturação de 100%. Isso sugere certo nível de estruturação na população de isolados não identificados deste estudo. Estudos posteriores serão necessários para melhor caracterização dos isolados. Até o momento a espécie *F. temperatum* descrita por SCAUFLAIRE et al. (2011) ainda não foi reportada no Brasil. De modo que estudos posteriores poderão esclarecer melhor essa questão (Figura 14).

O gene *tef-1 α* é amplamente utilizado para diferenciação filogenética de espécies de *Fusarium*, pois demonstra um elevado grau de polimorfismo quando comparado com outros genes de codificação de proteínas como calmodulina, beta-tubulina e histona H3 (GEISER et al, 2004).

Seria interessante amplificar outra sequência do gene ITS e comparar as sequências do gene *tef-1 α* e região ITS combinadas para melhorar a caracterização destas sequências. As condições climáticas para a ocorrência de determinadas espécies devem-se as diferenças na temperatura e umidade, que podem influenciar a fisiologia do fungo e produzir mudanças nas linhagens (MORETTI et al. 2008).

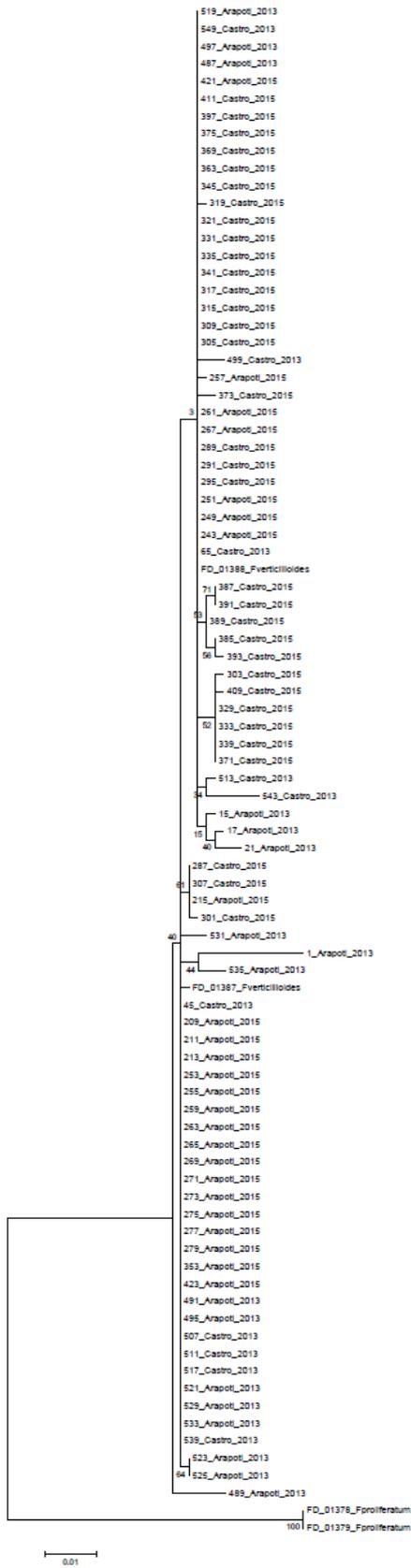


Figura 14. Árvore filogenética de isolados de *Fusarium verticillioides*.

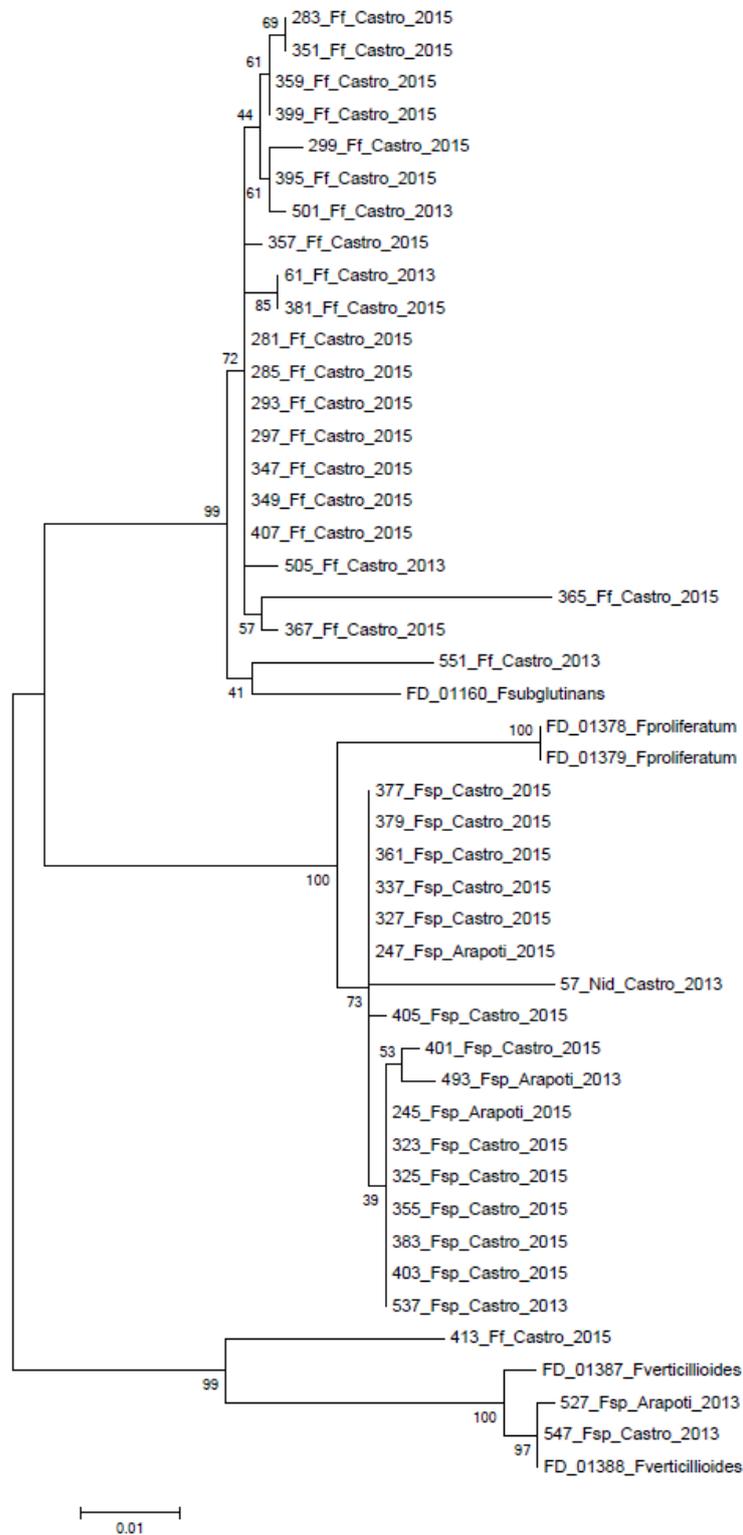


Figura 15. Árvore filogenética de isolados não identificados de *Fusarium*, outras espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* e espécies não identificadas.

CONCLUSÕES

- A composição das espécies de *Fusarium* não diferiu significativamente de um ano para o outro, no entanto diferiu entre os locais, Arapoti e Castro;
- A espécie predominante nos dois locais do estudo foi *F. verticillioides*, seguido em menor quantidade por *Fusarium* sp., *F. proliferatum*, outras espécies do complexo *F. fujikuroi* e *F. incarnatum*;
- A análise filogenética com base em sequências de DNA do gene *tef-a* não mostrou evidências de estruturação de *F. verticillioides* em subpopulações; enquanto que para *Fusarium* sp. e outras espécies do complexo *F. fujikuroi* houve evidências de estruturação em subpopulações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEJUMO, O.T., HETTWER, U., KARLOWSKY, P. Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.350-357, 2007.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D.M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, v.80, n.3, p.189-201, 2014.
- CHULZE, S.N. et al. Genetic variation in *Fusarium* section Liseola from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5312-5315, 2000.
- DORN, B. et al. *Fusarium* species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection. **European Journal of Plant Pathology**, v.125, p.51-61, 2009.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- FUMERO, M.V.; REYNOSO, M.M.; CHULZE, S. *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* isolated from maize in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, n.199, p.86-92, 2015.
- GEISER, D.M. et al. **FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium***. *European Journal of Plant Pathology*, v.110, p.473-479, 2004.
- JURADO, M. et al. Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. **Food Microbiology**, v.27, p.50-57, 2010.
- KUHNEM JÚNIOR, P.R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, v.43, p.583-588, 2013.
- MORETTI, A. et al. Cryptic subspecies and beauvericin production by *Fusarium subglutinans* from Europe. **International Journal of Food Microbiology**, n.127, p.312-315, 2008.
- MULÈ, G. et al. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for the identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 495-502, 2004.
- O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Journal of Applied Biological Sciences**, v.95, n.3, p.2044-2049, 1998.
- OLIVEIRA ROCHA, L. de et al. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from grains of different geographic origins in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p.9-11, 2011.

OTONI, J.R. **Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxicogênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido.** 2008. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz Eça de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

REYNOSO, M.M.; TORRES, A.M.; RAMIREZ, M.L.; RODRIGUEZ, M.I.; CHULZE, S. & MAGAN, N. Efficacy of anti-oxidant mixtures on growth, fumonisin production and hydrolytic enzyme production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* *in vitro* on maize-based media. **Mycological Research.**, v.106, p.1093-1099.

RIBEIRO, N.A. et al. A. Incidência de podridões de colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v.35, p.1003-1009, 2005.

SANTIN, J.A. et al. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, p.182-192, 2004.

SCAUFLAIRE, J.; GOURGUE, M.; MUNAUT, F. *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. **Mycologia**, v.103, n.3, p.586-597, 2011.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.28, p.2731-2739, 2011.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TORRES, A.M. et al. *Fusarium* species (section Liseola) and its mycotoxins in maize harvested in northern Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v.18, p.836-843, 2001.

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**, v.27, p.609-613, 2002.

VARELA, C. et al. First report of *Fusarium temperatum* causing seedling blight and stalk Rot on maize in Spain. **Plant Disease**, v.97, p.1252-1253, 2013.

WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases.** American Phytopathological Society: St. Paul, Minnesota. 1999. 79p.

WULFF, E.G. et al. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxicogenicity. **Environmental Microbiology**, v.12, n.3, p.649-657, 2010.

CONCLUSÕES FINAIS

- A ocorrência dos fungos, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *S. macrospora* e *S. maydis* em grãos ardidos de milho é influenciada pelo ano e local de cultivo e pelo genótipo de milho. O mesmo não ocorre em relação a *Aspergillus* spp.;
- Com base nos dois anos do estudo, os fungos predominantes foram *Fusarium* spp., seguidos de *S. macrospora*, *Penicillium* spp. e *S. maydis*;
- A espécie de *Fusarium* predominante foi *F. verticillioides*, seguido de *Fusarium* sp.;
- A análise filogenética com base em sequências de DNA do gene *tef-a* revelou que não existem evidências de que *F. verticillioides* esteja estruturado em subpopulações.