

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PREVALÊNCIA, PERFIL TOXIGÊNICO E AGRESSIVIDADE DE ESPÉCIES DE
FUSARIUM ASSOCIADAS AOS GRÃOS DE MILHO DO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL

Raquel Stumpf
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase em Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Stumpf, Raquel

Prevalência, perfil toxigênico e agressividade de espécies de fusarium associadas aos grãos de milho do Estado do Rio Grande do Sul / Raquel Stumpf. -- 2011.

xiii, 118 f.

Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte.
Coorientador: Juliano dos Santos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Milho. 2. Fusarium. 3. Doença de planta. I. Del Ponte, Emerson Medeiros, orient. II. Santos, Juliano dos, coorient. III. Título.

RAQUEL STUMPF
Engenheira Agrônoma - UFRGS

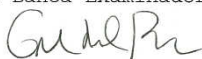
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

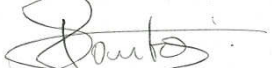
MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

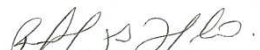
Aprovado em: 08.04.2011
Pela Banca Examinadora



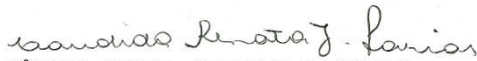
EMERSON MEDEIROS DEL PONTE
Orientador - PPG Fitotecnia



JULIANO DOS SANTOS
Co-orientador
Bolsista Pós-doutorado CNPq
EMBRAPA Clima Temperado-Pelotas/RS



RAFAEL GOMES DIONELLO
PPG Fitotecnia

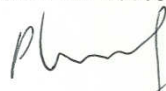


CÂNDIDA RENATA JACOBSEN DE FARIAS
UFPel



RICARDO TREZZI CASA
UDESC -Lages/SC

Homologado em: 30.05.2011
Por



PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

Dedico

*Aos meus pais pelo apoio incondicional e orientação em todos os aspectos da vida.
Ao meu irmão e minha irmã, que apesar da distância, sei que estão sempre ao meu
lado me ajudando.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer:

Ao meu orientador por acreditar e confiar em mim, além de não permitir que eu desistisse jamais.

Em especial aos dois grandes amigos que fiz durante essa caminhada, Larissa e Juliano. Farão parte da minha vida sempre, mesmo que alguns quilômetros estejam entre nós.

Ao meu colega e amigo Piérri por toda ajuda, conselhos e orientação. Devo a ti todo o respeito por me transformar em uma profissional melhor.

Aos demais colegas de laboratório que certamente contribuíram, de uma forma ou outra, para a conclusão desse trabalho. A amizade de vocês significa muito para mim. A Bruna, Rita, Camila, Marcela, Thiago, Henrique, André, Felipe, Leilane e Milena.

A Cleiltan por toda ajuda para que a parte molecular do trabalho pudesse ser realizada.

Ao professor Dauri Tessmann por abrir as portas de seu laboratório e por me proporcionar novos conhecimentos. Meu sincero obrigado.

Ao professor Machinski e ao Flávio, do Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudos integral, ao CNPq pelo apoio financeiro (Edital 64-2008) para a realização do projeto e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela infraestrutura e excelência de ensino.

À família Silveira Martins que me adotaram e que agora são minha outra família. Em especial a Giselda e Luiz, meus pais de coração e alma. A Sabrina, Maurício e Carol, mais três irmãos em minha vida.

E por fim, a minha família, símbolo constante de perseverança, honestidade e carinho. Pai, Mãe, Lu, Rafa, Dani e Paula, amo muito vocês!

PREVALÊNCIA, PERFIL TOXIGÊNICO E AGRESSIVIDADE DE ESPÉCIES DE *FUSARIUM* ASSOCIADAS AOS GRÃOS DE MILHO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL¹

Autor: Raquel Stumpf
Orientador: Emerson Medeiros Del Ponte
Co-orientador: Juliano dos Santos

RESUMO

A maior preocupação com micotoxinas em grãos de milho tem ganhado importância devido às podridões da espiga causadas por *Fusarium* spp. Este estudo teve como objetivos: 1) levantar a incidência de *Fusarium* spp. e determinar níveis de fumonisinas em grãos de milho (safra 2009 e 2010) em municípios do estado do Rio Grande do Sul; 2) identificar as espécies de *Fusarium* associadas com os grãos; 3) determinar o potencial toxigênico dos isolados por método molecular e 4) avaliar características fisiológicas e patogênicas em uma seleção de 12 isolados. Vinte e nove amostras de grãos foram avaliadas quanto à incidência de espécies dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *G. zaeae*, além de fumonisina (FB1 e FB2), por HPLC. Foi observada uma dominância de espécies do complexo *G. fujikuroi* (96%), em comparação à *G. zaeae* (18%). Análises químicas mostraram a presença de FB1 em 27/29 amostras (média = 1,38 µg.g⁻¹) e FB2 em 13/29 amostras, (média de 0,42 µg.g⁻¹). Foram obtidos 304 isolados monospóricos em quatro populações (regional 2009; regional 2010; Cruz Alta e Veranópolis), os quais foram identificados com base na morfologia e PCR usando *primers* específicos para *G. fujikuroi* (*F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*) e *G. zaeae* (*F. graminearum* = Fg). PCR foi usada para detectar o gene FUM+, preditivo da síntese de fumonisina e os genes *Tri3* e *Tri12*, preditivos dos genótipos tricotecenos: 3-ADON, 15-ADON e NIV. *F. verticillioides* foi encontrada em maior prevalência (86,8%), seguido de *F. graminearum* (6,9%), *F. subglutinans* (1,3%) e *F. proliferatum* (0,7%). Em 30/264 isolados de *F. verticillioides* o gene FUM+ não foi detectado. Em 12 isolados de *F. graminearum* houve dominância do genótipo NIV (8/12), seguido de 15-ADON (3/12) e 3-ADON (1/12). Todos os isolados selecionados para avaliação das características fisiológicas e patogênicas mostraram diferenças na taxa de crescimento micelial (TCM) e sensibilidade ao tebuconazole. Os isolados de *F. verticillioides* apresentaram os menores valores de TCM e mais alta sensibilidade ao fungicida, seguido dos isolados Fg NIV e Fg 15-ADON. Todos foram eficientes na infecção das sementes com efeitos negativos na germinação e emergência de plântulas. Ambas as espécies colonizaram o colmo de plantas de 20 dias, com destaque para um isolado Fg NIV. A análise multivariada permitiu identificar três grupos distintos de isolados.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (118p.) Abril, 2011.

PREVALENCE, TOXIGENIC PROFILE AND AGGRESSIVENESS OF *FUSARIUM* SPECIES ASSOCIATED WITH CORN KERNELS FROM RIO GRANDE DO SUL STATE²

Author: Raquel Stumpf
Adviser: Emerson Medeiros Del Ponte
Co-adviser: Juliano dos Santos

ABSTRACT

The increasing concern to mycotoxins in maize kernels is related to a frequent occurrence of epidemics of ear rot of corn caused by *Fusarium* spp in Brazil. This study aimed to: 1) assess the incidence of *Fusarium* spp. and determine fumonisin levels in maize samples (harvest seasons 2009 and 2010) from several municipalities of the Rio Grande do Sul state, Brazil; 2) identify *Fusarium* species associated with the maize kernels; 3) determine the toxigenic potential of isolates using molecular markers; and 4) evaluate the physiological and pathogenic characteristics in a group 12 selected isolates. Twenty-nine commercial grain samples were evaluated for the incidence of *Gibberella fujikuroi* and *G. zae* species complex, and fumonisin (FB1 and FB2) levels by using HPLC. We observed a dominance of *G. fujikuroi* (96%) over *G. zae* (18%) species. Chemical analysis showed the presence of FB1 in 27/29 samples (mean = 1,38 µg.g⁻¹) and FB2 in 13/29 samples (mean 0,42 µg.g⁻¹). A sample of 304 single-spore isolates was obtained and separated into four populations (regional 2009, regional 2010, Cruz Alta and Veranópolis), which were identified based on morphology and PCR using specific primers for three species of the *G. fujikuroi* complex (*F. verticillioides*, *F. subglutinans* and *F. proliferatum*) and *G. zae* (*F. graminearum* sensu lato). PCR was also used to detect FUM+ gene, predictive of fumonisin synthesis and *Tri3* and *Tri12* genes, predictive of three trichothecene genotypes: 3-ADON, 15-ADON and NIV. *F. verticillioides* was found in higher prevalence (86,8%), followed by *F. graminearum* (6.9%), *F. subglutinans* (1.3%) and *F. proliferatum* (0,7%). FUM+ gene was not detected in 30/264 *F. verticillioides* isolates. For the 12 *F. graminearum* isolates, NIV was the dominant genotype (8/12), followed by 15-ADON (3/12) and 3-ADON (1/12). All isolates selected for assessment of physiological and pathogenic characteristics showed differences in mycelial growth rate (MGR) and sensitivity to tebuconazole. All *F. verticillioides* isolates had the lowest MGR and a much higher sensitivity to the fungicide, followed by 15-ADON and NIV isolates. All isolates successfully infected and colonized the seeds, with negative effects on seed viability and seedling emergence. Both species colonized the stems of 20-days old plants using a toothpick inoculation method, and one *F. graminearum* NIV strain was the most aggressive. Multivariate analysis identified three distinct groups of isolates.

²Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (118p.) April, 2011.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 A cultura do milho	5
2.2 Doenças na cultura do milho.....	7
2.3 Doenças em espiga causadas por <i>Fusarium</i>	8
2.3.1 Podridão de fusarium ou fusariose.....	10
2.3.1.1 Etiologia da doença e variabilidade do patógeno	10
2.3.1.2 Distribuição geográfica do patógeno.....	12
2.3.1.3 Ciclo e epidemiologia da podridão de fusarium.....	13
2.3.1.4 Sintomatologia da podridão de fusarium.....	15
2.3.2 Podridão de giberela.....	15
2.3.2.1 Etiologia e variabilidade do patógeno	15
2.3.2.2 Distribuição geográfica do patógeno.....	17
2.3.2.3 Ciclo e epidemiologia da podridão de giberela	18
2.3.2.4 Sintomatologia da podridão de giberela	19
2.4 Estratégias de manejo das podridões por <i>Fusarium</i> spp. em milho.....	19
2.5 Micotoxinas de <i>Fusarium</i> spp. na cultura do milho.....	22
2.5.1 Tricotecenos	23
2.5.2 Fumonisinas	25
2.5.3 Métodos de detecção e quantificação de micotoxinas	27
2.5.4 Distribuição geográfica das micotoxinas em milho.....	28
2.5.5 Legislação vigente para micotoxinas em grãos de milho	31
2.6 Métodos moleculares para identificação de espécies e perfil toxigênico de fungos.....	32
2.6.1. Identificação molecular de <i>Fusarium</i> spp.	33
2.6.2. Caracterização molecular do perfil toxigênico de <i>Fusarium</i> spp.	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Área de estudo e amostragem	36
3.2 Detecção e quantificação de fumonisina em grãos de milho	36
3.3 Incidência de grãos ardidos e <i>Fusarium</i> spp. em milho.....	37
3.4 Isolamento de <i>Fusarium</i> spp.	38
3.5 Identificação morfológica e preservação dos isolados.....	39
3.6 Produção de biomassa fúngica e extração de DNA	40
3.7 Identificação das espécies por PCR	41
3.8 Identificação de genes codificantes de toxinas por PCR	42
3.9 Caracterização fisiológica e patogênica de isolados de <i>Fusarium</i> spp.	44
3.9.1 Isolados selecionados.....	44
3.9.2 Avaliação da sensibilidade ao fungicida tebuconazole.....	45

	Página
3.9.3 Avaliação do crescimento micelial	46
3.9.4 Avaliações de patogenicidade	46
3.9.4.1 Eficiência de infecção, colonização e redução de viabilidade das sementes	46
3.9.4.2 Redução de emergência de plântulas	49
3.9.4.3 Patogenicidade e agressividade em colmos	49
3.10 Análises estatísticas	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Levantamento de <i>Fusarium</i> spp. e micotoxinas em grãos de milho	53
4.1.1. Incidência de grãos ardidos e <i>Fusarium</i> spp.	53
4.1.2. Detecção e quantificação de fumonisinas	57
4.2 Levantamento de espécies de <i>Fusarium</i> spp. associados aos grãos de milho no Rio Grande do Sul	63
4.3. Detecção dos genes codificantes de toxinas em <i>Fusarium</i> spp.	70
4.4 Caracterização fisiológica e patogênica de isolados de <i>Fusarium</i> spp.	74
4.4.1 Análises univariadas	75
4.4.1.1 Taxa de crescimento micelial	76
4.4.1.2 Sensibilidade a fungicida	77
4.4.1.3 Eficiência de infecção de sementes	79
4.4.1.4 Redução da viabilidade de sementes	82
4.4.1.5 Redução da emergência de plântulas	83
4.4.1.6 Agressividade em colmos	84
4.4.2 Análise multivariada	85
5 CONCLUSÕES	96
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
7 APÊNDICES	111

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Sequência de *primers* descritos para as espécies de *Fusarium* que ocorrem em milho e tamanho de fragmento amplificado..... 42
2. Sequência de *primers*, gene alvo e fragmento amplificado para isolados de *F. verticillioides* e *F. graminearum* visando à identificação de genes preditivos da síntese de fumonisina e tricotecenos, respectivamente..... 43
3. Informações sobre os isolados de *Fusarium* spp. associados ao milho no estado do Rio Grande do Sul e que foram utilizados nos ensaios para caracterização fisiológica e patogênica..... 44
4. Incidência de fungos dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *Gibberella zeae* e grãos ardidos em amostras de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 no estado do Rio Grande do Sul..... 54
5. Concentração de fumonisina em amostras de grãos de milho das safras 2009 e 2010 no estado do Rio Grande do Sul..... 59
6. Número e frequência (%) de espécies de *Fusarium* identificadas por PCR, em duas populações regionais e duas populações locais, obtidas de grãos de milho produzido no estado do Rio Grande do Sul, Brasil..... 65
7. Genótipo toxigênico, em número e frequência, para isolados de *Fusarium* spp. em quatro populações do estado do Rio Grande do Sul – Brasil..... 71
8. Análise de *deviance* e significância das causas de variação quando da comparação individual de 12 isolados, ou quando esses foram agrupados segundo a espécie - *Fusarium verticillioides* (6 isolados) ou *F. graminearum* (6 isolados) - ou segundo dois genótipos tricotecenos em *F. graminearum* (*Fg*)- 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados)..... 75

9. Valores médios dos 12 isolados para as variáveis: taxa de crescimento micelial (TCM), DL50, eficiência de infecção e redução da viabilidade de sementes (%), redução da emergência de plântulas (%) e tamanho de lesão no colmo de plantas de milho (híbrido Pioneer 30F53) inoculadas com tais isolados..... 76
10. Análise de componentes principais para variáveis que representam características fisiológicas e patogênicas em um grupo de doze isolados fúngicos, sendo seis de *Fusarium verticillioides* e seis de *Fusarium graminearum*..... 86
11. Coeficiente de correlação entre as variáveis e componentes principais da caracterização fisiológica e patogênica em um grupo de doze isolados, sendo seis de *Fusarium verticillioides* e seis de *Fusarium graminearum*..... 87

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. A – Cadeias longas com microconídios de <i>F. verticillioides</i> ; B – Falsas cabeças de <i>F. subglutinans</i> ; C - Cadeia curta com microconídio de <i>F. proliferatum</i> . Fonte: Leslie & Summerell (2006). D – Colônia de <i>F. verticillioides</i> ; E – Espigas com sintomas de podridão de fusarium e F – Grãos ardidos.....	12
2. A e B – Colônias de <i>F. graminearum</i> ; C – Macroconídios de <i>F. graminearum</i> ; D – Espiga e colmo com sintomas de podridão de giberela.....	16
3. Mapa com indicação do município de origem de 29 amostras de grãos de milho obtidas nas safras 2009 e/ou 2010.....	37
4. Escala para quantificação da intensidade de colonização de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de milho, onde 1= baixa, 2= média e 3= alta.....	48
5. A - Amplificação espécie-específica com os primers Vert1/2 para <i>F. verticillioides</i> (578 pb), safra 2009; B - Sub1/2 para <i>F. subglutinans</i> (631 pb), safra 2009; C - Prol1/2 para <i>F. proliferatum</i> (585 pb), safra 2010 e D - Fg16F/R para <i>F. graminearum</i> sensu lato (450 pb), safra 2009.....	64
6. A - Amplificação Multiplex-PCR <i>Tri3</i> para determinar 3-ADON (243 pb), 15-ADON (610 pb) e NIV (840 pb); B - Multiplex-PCR <i>Tri12</i> para determinar 3-ADON (410 pb), 15-ADON (670 pb) e NIV (840 pb) e C - gene codificante FUM53R/F para fumonisina (354 pb). Todos os isolados são da safra 2009.....	71
7. Taxa de crescimento micelial média (mm/dia) para grupos de isolados por espécies: <i>F. verticillioides</i> (6 isolados) e <i>F. graminearum</i> (6 isolados) (A) ou para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de <i>F. graminearum</i> (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartílico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição.....	77

8. Doses (ppm) de tebuconazole em teste de sensibilidade para dois isolados de *Fusarium verticillioides* (A e C) e dois de *F. graminearum* apresentando genótipo Nivalenol (B) e 15-acetildesoxinivalenol (D)..... 78
9. Dose inibidora média (DL50) de tebuconazole para o crescimento fúngico de isolados para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum*. No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartilício (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição..... 78
10. Frequências de classes de colonização de sementes de milho observada em teste do papel de filtro aos 2, 4 e 6 dias de incubação de sementes de milho inoculadas artificialmente com seis isolados de *Fusarium verticillioides* (01Fv, 02Fv, 03Fv, 04Fv, 05Fv e 06Fv) e seis isolados de *F. graminearum* (07FgNiv, 08FgNiv, 09FgNiv, 10FgNiv, 11Fg15A, 12Fg15A), por meio da técnica da restrição hídrica, sendo mantidas por cinco dias em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz..... 80
11. Teste para detecção de fungos em substrato de papel com sementes de milho, híbrido Pioneer 30F53, tratadas com termoterapia e não inoculadas (testemunha) no segundo (A) e no sexto dia (C) de incubação e com sementes inoculadas com *Fusarium verticillioides* no segundo dia de incubação (B) e *F. graminearum* no sexto dia de incubação (D) usando a técnica da restrição hídrica..... 80
12. Eficiência média de infecção (incidência de sementes na classe mais alta de infecção - semente totalmente colonizada no segundo dia de incubação) de sementes de milho (híbrido Pioneer 30F53) - por isolados agrupados por espécies: *F. verticillioides* (6 isolados) e *F. graminearum* (6 isolados) (A) ou agrupados em dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum* (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartilício (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição..... 81

13. Redução média da viabilidade de sementes de milho (híbrido Pioneer 30F53), em relação à testemunha não inoculada, quando inoculadas com isolados agrupados por espécies: *F. verticillioides* (6 isolados) e *F. graminearum* (6 isolados) (A) ou para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum* (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartílico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição..... 82
14. Redução média da emergência de plântulas de milho (híbrido Pioneer 30F53), em relação à testemunha não inoculada, quando inoculadas com isolados agrupados por espécies: *F. verticillioides* (6 isolados) e *F. graminearum* (6 isolados) (A) ou para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum* (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartílico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição..... 83
15. Teste de agressividade em colmos de milho (híbrido Pioneer 30F53): Testemunhas (A), inoculação com palitos, de plantas com 20 dias, com isolados de *Fusarium* (B, C e D). Tamanho de lesão em colmo de milho inoculado com o isolado 07FgNiv da espécie *Fusarium graminearum* com genótipo tricoteceno nivalenol (E e F)..... 84
16. Comprimento da lesão em colmos de plantas de milho (híbrido Pioneer 30F53) de 30 dias, inoculadas aos 20 dias após o plantio, com isolados *Fusarium verticillioides* (6 isolados x 5 repetições) e *F. graminearum* (6 x 5) (A) e de isolados *F. graminearum* agrupados segundo genótipos tricotecenos 15-acetildesoxinivalenol (2 x 5) e nivalenol (4 x 5) (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartílico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição..... 85
17. Ordenação das variáveis de caracterização fisiológica e patogênica, onde TCM – taxa de crescimento micelial; EIS – eficiência de infecção de sementes; RVS - redução da viabilidade de sementes; REMER – redução da emergência de plântulas; TLC – tamanho da lesão no colmo e DL50 teb – dose de tebuconazole (A); agrupamento de 12 isolados, sendo seis de *Fusarium verticillioides* (Fv) e seis de *F. graminearum* (Fg) representantes de dois genótipos tricotecenos (B). Cada símbolo geométrico em B identifica um agrupamento..... 88

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de grãos de milho (*Zea mays* L.), ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China. Utilizado extensivamente na alimentação humana e ração animal, o milho é uma cultura de importância econômica e social produzido em praticamente todas as regiões do Brasil. No estado do Rio Grande do Sul, é cultura típica de propriedades com criações de suínos e aves, que são os dois segmentos com maior demanda de milho, a qual não consegue ser atendida com a produção doméstica, exigindo a importação de grãos pelo país.

As variadas condições climáticas de um país de dimensões continentais como o Brasil propicia o plantio de duas safras anuais de milho, diferenciando-o dos principais produtores do mundo. Em face da heterogeneidade das condições de cultivo no país, é comum a ocorrência de um ou mais fatores limitantes à produção, como baixa fertilidade do solo, condições climáticas adversas, uso de material com baixo potencial produtivo ou o ataque de pragas e doenças. Dentre as principais doenças do milho no Brasil, destacam-se aquelas causadas por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Cercospora*, *Puccinia*, *Stenocarpella* e *Colletotrichum* que atacam a parte aérea da planta (Casa & Reis, 2003; EMBRAPA, 2009). Além dos fatores bióticos e abióticos relacionados ao ciclo das doenças, outros como a infestação de insetos e condições ambientais dos grãos no campo e no armazenamento interferem no crescimento e produção de metabólitos secundários por esses microrganismos (Vargas, 2010).

Um complexo de espécies de *Fusarium* causa podridões do colmo e de espigas no milho. Nas espigas, a doença conhecida como podridão de giberela é causada por *F. graminearum* (teleomorfo = *Gibberella zeae*) enquanto que a podridão de fusarium, ou fusariose, é causada por espécies do complexo *Gibberella fujikuroi*, especialmente os anamorfos *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* (Munkvold, 2003).

A importância dessas doenças para a cultura do milho já é reconhecida, no entanto a diversidade das espécies de *Fusarium* envolvidas na etiologia da doença é apontada como um fator que dificulta a obtenção de híbridos resistentes às podridões de espigas e do colmo. A identificação de espécies de *Fusarium* é realizada, tradicionalmente, com base em aspectos morfológicos. Além de ser uma tarefa que requer experiência por parte de quem analisa, pode gerar inconsistências ou inacurácia na identificação devido à variabilidade dos caracteres fenotípicos.

A taxonomia de fungos vem evoluindo no sentido de serem aceitos diferentes critérios para definir o conceito de espécie. A identificação que era baseada apenas em aspectos morfológicos, hoje abrange critérios de identificação com base em conceitos biológicos e filogenéticos. Para esse último, o desenvolvimento de técnicas moleculares têm sido imprescindíveis. Relações filogenéticas, como por exemplo, dentro do complexo *G. fujikuroi* ampliaram o leque de espécies descobertas através de informações obtidas mediante sequenciamento de genes específicos, o que também tem levado ao desenvolvimento de *primers* específicos para espécies. Desta forma, a técnica de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* = PCR) também tem sido de grande auxílio na identificação de espécies de *Fusarium* pertencentes aos complexos *G. fujikuroi* e *G. zeae* em cereais.

Um dos impactos decorrentes das podridões de espigas por espécies de *Fusarium*, além da redução do rendimento, é a produção de metabólitos secundários

como as micotoxinas que tem envolvimento na intoxicação de humanos e animais consumidores de grãos ou subprodutos. Micotoxinas produzidas por *Fusarium* incluem representantes das classes dos tricotecenos e zearalenona, ambos produzidos por *F. graminearum*, além das fumonisinas que são produzidas por *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*. A presença de micotoxinas nos grãos de milho constitui um problema de segurança alimentar, uma vez que são frequentes as observações de níveis desses compostos em valores acima dos limiares de risco. Segundo dados fornecidos pela FAO, as perdas mundiais de alimentos contaminados por micotoxinas chega a aproximadamente 100 milhões de toneladas por ano (FAO, 2010).

Embora já se tenha reconhecido a importância econômica das podridões de espigas e os problemas gerados pela presença das micotoxinas nos grãos de milho, poucos são os trabalhos no Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul, direcionados para elucidar questões etiológicas, toxicológicas e epidemiológicas das populações regionais. Além disso, as preocupações para atender padrões estabelecidos no comércio internacional e nacional de grãos com a adoção de níveis de tolerância em muitos países tornam urgentes os esclarecimentos relacionados às características populacionais de *Fusarium* presentes no Rio Grande do Sul e no Brasil. Do ponto de vista da produção, o conhecimento sobre a diversidade de espécies do patógeno é, dentre os fatores de risco, um dos menos explorados, mas de suma importância na definição das estratégias de manejo para resistência e controle químico.

Dessa forma, os objetivos do trabalho foram: (1) realizar um levantamento da incidência de espécies de *Fusarium* e níveis de fumonisinas em grãos de milho produzidos em duas safras em diferentes locais no estado do Rio Grande do Sul; 2) identificar, com base em critérios morfológicos e moleculares, as espécies de *Fusarium* em populações de isolados obtidas das amostras de grãos; (3) determinar o

potencial toxigênico dos isolados por meio de PCR com *primers* que amplificam porções de genes preditivos da síntese de micotoxinas e (4) avaliar características fisiológicas e patogênicas de uma seleção de 12 isolados de *Fusarium* da população regional 2009, determinados com base na diversidade de espécies e potencial toxigênico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.), em função do seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, é um dos principais grãos cultivados e consumidos no mundo. Independente da tecnologia aplicada, a condição climática durante o cultivo do milho é um dos fatores críticos na produção. Dentre os elementos climáticos, a temperatura é um dos fatores de produção mais decisivos, juntamente com uma adequada disponibilidade de água no solo e abundância de luz. Quanto ao impacto de deficiências hídricas durante seu cultivo, quando ocorrem no início do ciclo podem afetar o processo germinativo e, mais ao final do ciclo, podem paralisar o crescimento (Fancelli & Dourado Neto, 2004). No estado do Rio Grande do Sul (RS), a deficiência hídrica é a principal causa da variabilidade no rendimento de grãos entre anos e entre regiões. Dentre as regiões, Planalto, Alto e Médio Vales do Uruguai e Missões são as que possuem maior disponibilidade de áreas com menor risco climático para a cultura de milho, nas diversas épocas de semeadura (Doró, 2008).

No Brasil, o cultivo do milho é caracterizado por duas épocas de plantio. O plantio de verão ou primeira safra ocorre durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste. A segunda safra, ou safrinha, é plantada em fevereiro, março, abril e maio. O milho safrinha não deve ser plantado em sucessão ao milho da primeira

safra, devido ao aumento do risco de problemas fitossanitários, como por exemplo, as podridões do colmo, sendo então recomendável cultivar o milho safrinha após a soja de ciclo precoce (EMBRAPA, 2009).

A área de plantio deste cereal, em solo brasileiro, na safra 2009/10 foi de aproximadamente 12 milhões de hectares. Quando comparados os números dessa safra com a anterior, houve uma redução de 16,7% na área cultivada com milho de primeira safra. Essa diminuição esteve relacionada com o volume do produto no mercado, preços abaixo do esperado pelos produtores e escassez de chuvas na região Nordeste na época da semeadura. Já a redução prevista para a segunda safra não foi observada e, ao contrário, ocorreu um incremento de 6,3%. Segundo projeções, a primeira safra foi de 34 milhões de toneladas, 1,3% maior que a anterior e a segunda safra teve uma colheita de 22 milhões de toneladas, representando um crescimento de 27%, indicando que a safra 2009/10 obteve um crescimento de 10%. No RS a área cultivada com milho para a safra 2009/10 foi de aproximadamente um milhão de hectares e uma produção de 5,58 milhões de toneladas (CONAB, 2011).

Quanto a sua utilização, o milho é insumo para produção de mais de uma centena de produtos, porém aproximadamente 70% da produção mundial e 80% do milho produzido no Brasil são destinados à cadeia produtiva de suínos e aves (EMBRAPA, 2009). Também é largamente utilizado em mais de 500 produtos alimentícios, tanto *in natura* como componente de pães, bolos, margarinas, óleo, polenta, farinha, fubá, amido, cereais matinais, dentre outros (Buiate *et al.*, 2008). O segmento avícola e suinocultura são os que apresentam maior demanda de milho no estado, sendo de 46% e 28% respectivamente (Doró, 2008).

2.2 Doenças na cultura do milho

A produção do milho pode ser afetada de diversas maneiras, seja pelo uso de cultivares suscetíveis ao ataque de patógenos e pragas, ou por condições desfavoráveis de clima, solo e manejo inadequado da cultura. Doenças da cultura do milho podem ser causadas por vírus, nematóides, bactérias e fungos, que podem levar a danos severos com impactos econômicos (EMBRAPA, 2009).

A intensificação do cultivo em áreas irrigadas, com mais de uma safra por ano, principalmente com cultivos sucessivos da mesma cultura, pode levar ao acúmulo de inóculo, principalmente de doenças fúngicas, o que aumenta o risco da ocorrência de doenças (Fernandes & Oliveira, 2000).

As doenças do milho podem ser agrupadas de acordo com o(s) órgão(s) da planta infectado e sintomas resultantes, podendo ser divididas em doenças foliares, podridões de colmo e das raízes, podridões de espigas e de grãos.

Dentre as doenças foliares, pode-se destacar a cercosporiose (*Cercospora zea-maydis* Tehon & E.Y. Daniels), mancha branca, com etiologia controversa (*Phaeosphaeria maydis* P. Henn. ou *Leptosphaeria zea* Stout), ferrugem polissora (*Puccinia polysora* Underw), ferrugem comum (*Puccinia sorghi* Schw.), ferrugem tropical ou ferrugem branca (*Physopella zea* Mains), helmintosporiose (*Helminthosporium turcicum* Pass.), mancha de bipolaris maydis (*Bipolaris maydis* (Nisik.) Shoemaker), mancha de bipolaris zeicola (*Bipolaris zeicola* G.L. Stout), mancha foliar de diplodia (*Stenocarpella macrospora* Sutton) e antracnose foliar do milho (*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils) (EMBRAPA, 2009).

Vários são os patógenos causadores de podridão de colmo em milho, incluindo-se fungos e bactérias. No Brasil, as principais doenças de colmo causadas por fungos são: antracnose (*C. graminicola*), podridão de diplopia (*Stenocarpella*

macrospora e *Stenocarpela maydis*), podridão de fusarium (*F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*) e podridão de macrofomina (*Macrophomina phaseolina*). Essas podridões geralmente têm início pelas raízes das plantas e passam para os entrenós superiores ou diretamente ao colmo através de ferimentos (Silva & Schipanski, 2007; EMBRAPA, 2009).

As podridões de raízes podem ser causadas por um complexo de patógenos envolvendo várias espécies de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Pythium* e *Rhizoctonia*. Além disso, bactérias, nematóides e insetos que se alimentam das raízes podem estar associados às podridões radiculares (EMBRAPA, 2009).

Entre as podridões de espiga, merecem destaque três doenças, a podridão branca da espiga (*Stenocarpela maydis*), podridão de fusarium ou fusariose (*F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*) e podridão de giberela ou podridão rosada da ponta da espiga (*F. graminearum*) (Silva & Schipanski, 2007).

2.3 Doenças em espiga causadas por *Fusarium*

Doenças em espigas são as principais responsáveis pela baixa qualidade dos grãos, principalmente na Região Sul do Brasil, onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento das mesmas (Pereira, 1995). As podridões de espiga estão associadas com grãos ardidos, ou seja, aqueles atacados por patógenos ou que sofreram algum tipo de injúria, levando a uma alteração de cor e fermentação da área atingida (Portaria nº11, de 12/04/96. BRASIL, 1996). No contexto de doenças, grãos ardidos são aqueles atacados por fungos apenas e que apresentam sintomas de descoloração (Trento *et al.*, 2002).

Além de danos diretos no rendimento a presença de grãos ardidos reduz a qualidade do produto colhido (Reis *et al.*, 2004). Muitas agroindústrias adotam como

padrão de qualidade uma tolerância máxima de 6% para grãos ardidos em lotes comerciais de milho. O percentual de grãos ardidos em um lote também é utilizado para classificar o milho nos tipos 1 (até 3%), 2 (até 6%) e 3 (até 10%) (MAPA, 2007).

Os agentes causais de podridão da espiga e, conseqüentemente, de grãos ardidos mais comumente encontrados no milho são espécies dos gêneros: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium* e *Stenocarpella* (Pinto, 2001). Embora esses fungos sejam frequentemente isolados dos grãos, esta não é a principal fonte de inóculo, pois os mesmos possuem fase saprofítica ativa, sobrevivendo na matéria orgânica do solo, sendo essa a principal fonte de inóculo para as epidemias (Juliatti *et al.*, 2007)

Os fungos que ocorrem em grãos de milho podem ser divididos em dois grupos, de campo ou de armazenamento, definidos em função das necessidades hídricas para crescimento. Os fungos ditos de campo invadem os grãos no período de pré-colheita. Este grupo é mais exigente em água, requerendo um teor alto de umidade próximo aos 20% para o seu crescimento. É neste grupo que se encontra o gênero *Fusarium*. Já os fungos de armazenamento, onde se incluem *Aspergillus* e *Penicillium*, necessitam de um teor mais baixo de umidade, ao redor de 16%, para que ocorra o crescimento micelial (Figueira *et al.*, 2003).

A infecção no campo ocorre nas fases reprodutivas da cultura desde o flórescimento, sendo favorecida por ambiente com alta umidade relativa do ar e temperatura, mau empalhamento e injúrias causadas pelos insetos nas espigas e grãos em desenvolvimento no campo (Shurtleff, 1992; Reis *et al.*, 2004).

Fungos do gênero *Fusarium* são os de ocorrência mais comum associados com as podridões de espiga do milho. A importância das fusarioses tem sido

reconhecida, porém, o desenvolvimento de híbridos resistentes, como um método ideal de controle, e com alto rendimento tem sido difícil (Munkvold, 2003).

2.3.1 Podridão de fusarium ou fusariose

2.3.1.1 Etiologia da doença e variabilidade do patógeno

F. verticillioides (tel. *Gibberella moniliformis*) é o principal agente causal dessa doença. No entanto, *F. subglutinans* (tel. *G. subglutinans*) e *F. proliferatum* (tel. *G. intermedia*) também estão associados com a doença em algumas regiões. Essas três espécies fazem parte de um complexo de espécies fortemente relacionadas, denominado complexo *Gibberella fujikuroi* (O'Donnell *et al.* 1998).

A taxonomia de *Fusarium* envolve três conceitos: espécie morfológica, biológica e filogenética (Leslie *et al.*, 2005). A identificação morfológica ainda é a mais utilizada, porém, existem situações em que apenas as características morfológicas não permitem separar acuradamente as espécies (Leslie *et al.*, 2005). O número de estudos de caracterização de isolados, identificação e proposição de novas espécies no gênero *Fusarium* tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, principalmente após o advento da biologia molecular (Leslie *et al.*, 2005). O segundo conceito de espécie, a biológica, está baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie capazes de produzir cruzamentos férteis entre si ou que tenham potencial para tal, compartilhando o mesmo material genético. O terceiro conceito, filogenético, baseia-se na análise de seqüências gênicas (O'Donnell *et al.*, 2000; Summerell *et al.*, 2003) e compreende um grupo de indivíduos que compartilham a mesma tendência evolutiva e uma origem em comum (ancestral), ou seja, é sempre um grupo monofilético, também chamado de clado. Neste conceito,

variantes na seqüência de DNA conservada são utilizados para rastrear linhagens entre um grande número de isolados (Leslie *et al.*, 2005).

No momento, muitas das espécies morfológicas são aceitas e poucas descrições existentes têm sido rigorosamente desafiadas com ferramentas usadas para delimitar conceitos biológicos ou filogenéticos, ficando em aberto a questão da integridade morfológica (Skovgaard *et al.*, 2003).

A espécie previamente determinada como *Fusarium moniliforme* ilustra essa situação, pois, até recentemente, este táxon englobava espécimes referidos a vários anamorfos hoje identificados distintamente como, por exemplo, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* e outras espécies já descritas sob a luz do conceito de espécie biológica ou filogenética (Leslie *et al.*, 2005).

Grande parte das espécies de *Fusarium* é formadora de clamidósporos, porém o complexo *G. fujikuroi* possui justamente a característica de ausência desta estrutura. Para a identificação de espécies do complexo *G. fujikuroi* as características principais avaliadas são as células conidiogênicas que suportam o microconídio e a disposição dos esporos sobre as mesmas (Leslie & Summerell, 2006).

F. verticillioides assemelha-se mais a *F. proliferatum*, mas a segunda possui cadeias curtas de microconídios (menos de 20) em mono e polifiálides, diferenciando de *F. verticillioides* que possui cadeias longas de microconídios em monofiálide (Figura 1A e C). *F. subglutinans* é relativamente fácil de ser separado das outras espécies do complexo *G. fujikuroi*, pois possuem mono e polifiálides que produzem microconídios apenas em falsas cabeças (Figura 1B) (Leslie & Summerell, 2006).

Com base em estudos de compatibilidade vegetativa (VCGs) e marcadores moleculares, uma alta diversidade genética foi observada entre isolados de uma população de *F. verticillioides* obtidos do milho na Argentina e no Uruguai (Chulze

et al., 2000), levando os autores a sugerir que a reprodução sexual de populações de *F. verticillioides* pode ser comum. Ainda, diferenças na composição genética das populações foram relacionadas com diferenças em agressividade e produção de micotoxinas naqueles trabalhos. Evidências tem mostrado que vários isolados de *F. verticillioides* geneticamente distintos podem ser recuperados a partir de uma única planta de milho (Kedera *et al.*, 1994), o que demonstra a alta variabilidade genética existente nessa espécie.

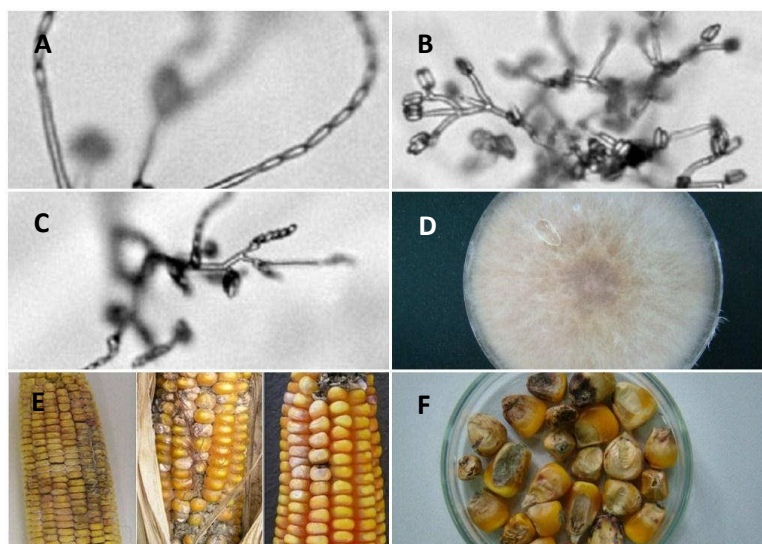


FIGURA 1. A – Cadeias longas com microconídios de *F. verticillioides*; B – Falsas cabeças de *F. subglutinans*; C - Cadeia curta com microconídio de *F. proliferatum*. Fonte: Leslie & Summerell (2006). D – Colônia de *F. verticillioides*; E – Espigas com sintomas de podridão de fusarium e F – Grãos ardidos. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

2.3.1.2 Distribuição geográfica do patógeno

Dentre as espécies do complexo *G. fujikuroi*, *F. verticillioides* é a mais frequentemente encontrada em grãos de milho e seus subprodutos, em países europeus como a França, Espanha e Itália (Fandohan *et al.*, 2003). Na África o milho desempenha papel importante na dieta de milhões de pessoas, mas existem poucas informações disponíveis relativas à presença de *Fusarium* spp. e micotoxinas em

milho. Entretanto, relatos em alguns países africanos mostraram que *F. verticillioides* é a espécie de maior ocorrência em grãos de milho (Hussein *et al.*, 2002). Em análises de grãos de milho realizadas na Nigéria, *F. verticillioides* foi à espécie dominante seguida de *F. graminearum* (Adejumo *et al.*, 2007).

No Brasil, nos estados de São Paulo, Santa Catarina e Paraná, estudos de levantamento também apontam *F. verticillioides* como sendo a espécie de ocorrência mais comum deste gênero, chegando a ser encontrado em 100% das amostras analisadas. A podridão de fusarium é encontrada em praticamente todas as áreas produtoras do país e está diretamente relacionada às condições edafoclimáticas nas regiões de cultivo (Costa *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2004).

No Irã, *F. verticillioides* também foi à espécie encontrada com maior frequência (Rahjoo *et al.*, 2008). Utilizando *primers* específicos para a espécie, os autores confirmaram que de 191 isolados de *Fusarium*, 131 foram identificados como pertencentes a *F. verticillioides* e 40 como *F. proliferatum* (Rahjoo *et al.*, 2008).

No México, Sánchez-Rangel *et al.* (2005) encontraram 80,6% dos isolados identificados como *F. verticillioides*. Porém, na Argentina, *F. subglutinans* foi isolado em maior frequência em algumas áreas, sendo que a frequência de isolados desta espécie e a capacidade de produzirem toxina foram relacionadas às condições climáticas da região, situação semelhante a outras regiões de clima temperado na Europa (Logrieco *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 2001).

2.3.1.3 Ciclo e epidemiologia da podridão de fusarium

A cultura do milho tem sido muito utilizada em rotação de culturas com uma ou duas outras culturas em áreas com pouca diversidade. Como consequências são mantidos altos os níveis de resíduos de milho, incorporados ou cobrindo o solo, sendo

esta a fonte principal de inóculo para as epidemias (Smith & White, 1988). As espécies de *Fusarium* sobrevivem facilmente nesses resíduos da colheita na forma de micélio e outras estruturas de sobrevivência como os peritécios, além de sobreviverem em sementes. A espécie *F. verticillioides* ainda produz hifas espessas que também possuem a capacidade de sobrevivência (Munkvold, 2003). Outra fonte de inóculo são os restos da cultura do milho ou de culturas secundárias (Cotten & Munkvold, 1998).

F. verticillioides, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* produzem macroconídios e uma grande quantidade de microconídios em resíduos culturais. Microconídios são mais facilmente dispersos pelo vento, mas também podem ser dispersos pela chuva e por insetos (Munkvold, 2003). Quando disseminados em correntes de vento, os microconídios podem se disseminar a uma distância de 300 a 400 km, desta forma a quantidade de inóculo no campo é muito variável e de difícil quantificação (Maiorano *et al.*, 2008).

As três espécies possuem várias vias de ingresso no hospedeiro, incluindo a infecção dos estigmas do milho, ferimentos causados por insetos e transmissão sistêmica por sementes ou raízes (Munkvold *et al.*, 1997; Sobek & Munkvold *et al.*, 1999). O milho Bt é um exemplo que ilustra o papel dos insetos na infecção uma vez que híbridos resistentes ao ataque da broca do milho têm apresentado níveis menores de fumonisinas (Munkvold *et al.*, 1999).

A podridão de fusarium é mais comum em locais de clima mais quente e seco, onde a temperatura ótima para o patógeno se encontra em 30°C e altitudes inferiores a 700 metros (Munkvold, 2003). Por essa razão, *F. verticillioides* é encontrado facilmente ao redor do mundo, porém com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais do que temperadas (Ono *et al.*, 2006).

2.3.1.4 Sintomatologia da podridão de fusarium

A infecção pode iniciar pelo topo ou por qualquer outra parte da espiga, mas sempre associada a alguma injúria causada principalmente por insetos ou pássaros (Figura 1E).

Estudos realizados na Argentina e no Brasil mostraram que os fungos causadores da podridão de fusarium geralmente infectam nos grãos durante os estágios iniciais de desenvolvimento e continuam a aumentar até a colheita (maturação fisiológica), podendo chegar a 90% de incidência de *Fusarium* nos grãos (Figura 1F) (Chulze *et al.* 1996;. Almeida *et al.*, 2002).

Nas espigas atacadas pode-se notar um crescimento cotonoso de coloração branca ou salmão, constituído por micélio e esporos do patógeno (Figura 1D). Os grãos podem apresentar estrias brancas na parte superior, tendo a coloração alterada para róseo ou marrom escuro (Fancelli & Dourado Neto, 2004; Pereira *et al.*, 2005). Infecções assintomáticas também podem ocorrer em toda a planta e a presença do fungo é muitas vezes ignorada, levando alguns autores a sugerir que alguns isolados de *F. verticillioides* causam sintomas e outras não (Fandohan *et al.*, 2003).

2.3.2 Podridão de giberela

2.3.2.1 Etiologia e variabilidade do patógeno

A podridão de giberela no Brasil é causada por *F. graminearum* cujo teleomorfo é *G. zeae*. Como características morfológicas destacam-se a presença de macroconídios, sendo os esporodóquios muitas vezes escassos, mas, quando presentes, são de cor laranja e posicionados sobre o micélio. A formação de

clamidósporos é variável entre os isolados e os microconídios estão ausentes. As colônias de *F. graminearum* usualmente apresentam micélio cotonoso com coloração que pode variar entre o branco e o rosa. Os macroconídios são hialinos, usualmente divididos por septos, em número de cinco (Leslie & Summerell, 2006) (Figura 2C).

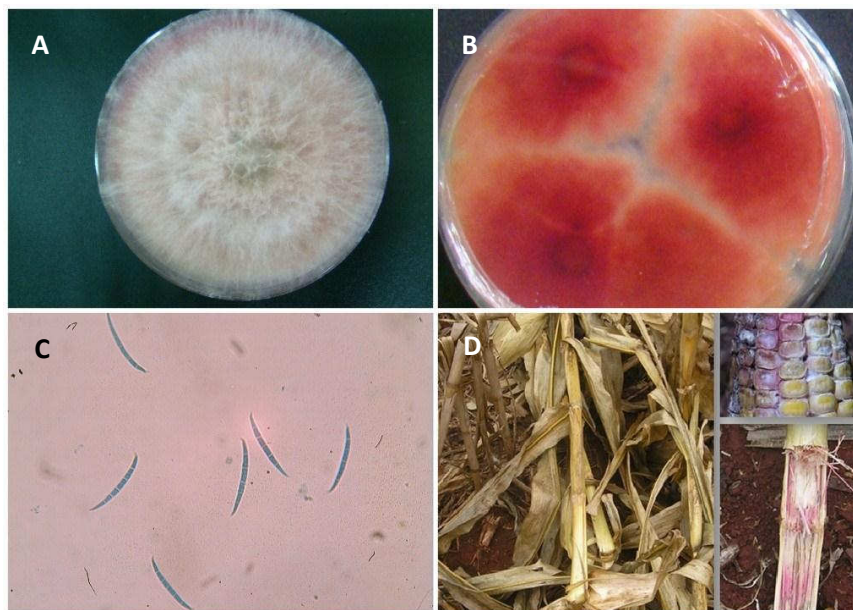


FIGURA 2. A e B – Colônias de *F. graminearum*; C – Macroconídios de *F. graminearum*; D – Espiga e colmo com sintomas de podridão de giberela. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

Em estudos recentes sobre filogenia de *F. graminearum*, O'Donnell *et al.* (2004) propuseram a subdivisão de *G. zeae* em nove linhagens filogeográficas, as quais foram dados nomes para as espécies dentro de um complexo ou clado *F. graminearum*. Nesse trabalho, a espécie cosmopolita e de ocorrência mais comum ao redor do mundo deu-se o nome de *F. graminearum* sensu stricto (linhagem 7). Posteriormente, Starkey *et al.* (2007), O'Donnell *et al.* (2008) e Yli-Mattila *et al.* (2009), determinaram mais quatro novas espécies quando da análise de isolados de países da África e norte da Ásia.

Até o momento o complexo *F. graminearum* é composto por 13 linhagens ou espécies filogenéticas, denominadas: *Fusarium austroamericanum* (linhagem 1), *Fusarium meridionale* (linhagem 2), *Fusarium boothii* (linhagem 3), *Fusarium mesoamericanum* (linhagem 4), *Fusarium acacia-mearnsii* (linhagem 5), *Fusarium asiaticum* (linhagem 6), *F. graminearum* sensu stricto (linhagem 7), *Fusarium cortaderiae* (linhagem 8), *Fusarium brasilicum* (sem número de linhagem), *Fusarium aethiopicum* (sem número de linhagem), *Fusarium gerlachii* (sem número de linhagem), *Fusarium vorosii* (sem número de linhagem) e *Fusarium ussurianum* (sem número de linhagem) (Starkey *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2008; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Desjardins & Proctor, 2010).

2.3.2.2 Distribuição geográfica do patógeno

As espécies associadas à podridão de giberela compreendem aquelas do complexo *F. graminearum*. Estudos de genética populacional de *F. graminearum* foram realizados intensivamente na última década e tem se concentrado principalmente na caracterização das linhagens ou espécies filogenética, da diversidade genética e de quimiotipos. A linhagem 7 (*Fusarium graminearum* sensu stricto) é a espécie dominante associado à podridão de giberela em milho, sendo encontrado em milho nos EUA, Europa e Iran, bem como no Brasil e Nova Zelândia (O'Donnell *et al.*, 2008).

Na Coréia um estudo populacional de *F. graminearum* em milho realizado por Lee *et al.* (2004) constatou a presença de isolados das linhagens 6 (*F. asiaticum*) e 7 (*F. graminearum* sensu stricto), sendo está última a linhagem dominante. Estes resultados comprovam estudos realizados anteriormente por Jeon *et al.* (2003) que

encontraram a linhagem 7 (*F. graminearum* sensu stricto) em 74% das amostras de milho analisadas (Desjardins & Proctor, 2010).

Embora *F. graminearum* sensu stricto seja a espécie dominante causando a podridão de giberela na Ásia e outros locais do mundo, esta não foi detectada no Nepal, onde foram identificadas a linhagem 6 (*F. asiaticum*) e a linhagem 2 (*F. meridionale*) em milho produzido em pequenas propriedades do alto do da Montanha do Himalaia (Desjardins & Proctor, 2010).

Em Ohio, nos Estados Unidos, *F. graminearum* também está entre as espécies encontradas em palha e em sementes, sendo considerada a mais importante na cultura do milho deste estado devido às perdas econômicas causadas pela pouca qualidade dos grãos colhidos. Em levantamentos na Nigéria, *F. graminearum* apareceu em 32% das amostras avaliadas, comprovando que neste país esta espécie também é uma das principais encontradas no milho (Adejumo *et al.*, 2007).

No Brasil, a região sul é onde a podridão de giberela pode ser encontrada mais comumente, devido ao clima mais ameno e úmido, além da grande quantidade de inóculo do fungo produzido nos cereais de inverno cultivados anteriormente ao milho, presença de gramíneas nativas e invasoras (Reis *et al.*, 2004). Casa *et al.* (2007) em um estudo realizado em Lajes, Estado de Santa Catarina, nas safras 2002/03 e 2003/04, detectaram *F. graminearum* como a segunda espécie mais encontrada em colmos exibindo podridão e um dos predominantes em grãos ardidos.

2.3.2.3 Ciclo e epidemiologia da podridão de giberela

F. graminearum tem como principal fonte de inóculo os restos culturais, onde sobrevive na forma de peritécios, macroconídios (Figura 2C) e fragmentos de hifas (Munkvold, 2003). A via de infecção primária dos grãos de milho por *F.*

graminearum é por meio do estilo-estigma durante os seis dias após o seu surgimento (Reid *et al.*, 1999). Esporos do fungo alcançam o estilo-estigma do milho pelo vento ou por insetos vetores. Algumas infecções por *F. graminearum* são iniciadas por lesões nos grãos causadas por insetos lepidópteros, mas estas parecem ser menos importantes que a infecção do estilo-estigma do milho (Munkvold, 2003).

A podridão de giberela é favorecida por alta umidade relativa do ar no período do espigamento, temperaturas moderadas e precipitação elevada no período de maturação do milho. A presença do patógeno e o desenvolvimento da doença são mais comuns em locais de clima ameno, com temperatura ótima para o desenvolvimento do patógeno em torno de 24-26°C (Munkvold, 2003; EMBRAPA, 2009).

2.3.2.4 Sintomatologia da podridão de giberela

Os sintomas iniciais da podridão de giberela são percebidos na ponta da espiga, aumentando em tamanho com o progresso da colonização pelo fungo, como massa cotonosa de coloração avermelhada ou rosa (Figura 2D) (Munkvold, 2003). É comum as palhas estarem firmemente ligadas às espigas devido ao excessivo crescimento micelial do fungo entre as brácteas e os grãos. Ocasionalmente, esta podridão pode iniciar na base e progredir para a ponta da espiga, podendo ser confundido com o sintoma da podridão de fusarium (Munkvold, 2003; EMBRAPA, 2009).

2.4 Estratégias de manejo das podridões por *Fusarium* spp. em milho

A recomendação principal para o controle de doenças do milho é o uso de cultivar resistente. No entanto, o uso contínuo de cultivares suscetíveis, o aumento de

cultivos sucessivos e a utilização incorreta da tecnologia de produção, associados a um clima favorável ao desenvolvimento de epidemias, tem contribuído para o aumento da importância econômica de doenças na cultura do milho, principalmente as fúngicas (Juliatti *et al.*, 2004).

O aumento da incidência de doenças pode ser explicado por fatores diversos que contribuíram para o aumento da produção. O cultivo intenso em áreas irrigadas com mais de uma safra por ano, principalmente quando há cultivos sucessivos de milho, permite a perpetuação e o acúmulo de inóculo do patógeno aumentando o risco da doença (Fernandes & Oliveira, 2000).

Com o objetivo de minimizar o impacto negativo de doenças de espigas, táticas integradas de manejo são necessárias, desde a fase de planejamento da lavoura até a pós-colheita, podendo-se citar: utilização de cultivares resistentes, rotação de culturas com espécies que não sejam suscetíveis ao patógeno, controle de plantas daninhas, utilização de sementes de qualidade, evitar altas densidades de plantio, utilizar cultivares que tenham espigas com anatomia que dificulte a infecção, nutrição das plantas, controlar insetos, não retardar a colheita e uso de fungicidas (Trento *et al.*, 2002; Fancelli & Dourado Neto, 2004; Silva & Schipanski, 2007). Essas medidas podem trazer benefícios imediatos ou em longo prazo ao produtor, reduzindo o potencial de inóculo dos patógenos presentes na lavoura, além de contribuírem para uma maior durabilidade e estabilidade da resistência genética presentes nos híbridos comerciais (EMBRAPA, 2009).

Alguns patógenos da cultura do milho são transmitidos pelas sementes, portanto, provenientes de sistemas de produção com certificação e fiscalização, além de boa qualidade sanitária é prática essencial no manejo (Fancelli & Dourado Neto, 2004). Quando não há a disponibilidade de híbridos ou variedades de polinização

aberta, recomenda-se o tratamento das sementes, sendo o tratamento químico o mais comum e que tem por objetivo a erradicação ou redução do inóculo. No caso do *F. graminearum*, o tratamento das sementes também pode proteger à plântula em sua fase inicial de desenvolvimento (Garcia Júnior *et al.*, 2008).

Para assegurar a qualidade dos grãos e reduzir os níveis de micotoxinas, a FAO (2010) recomenda a realização de uma secagem eficiente e controle da umidade dos grãos para inibir o crescimento fúngico. A secagem deve ser feita logo após a colheita e o mais rápido possível. Ainda segundo a FAO (2010), devem-se evitar as injúrias nos grãos, pois facilita a infecção por fungos e a produção de micotoxinas.

As espécies de *Fusarium* têm hábito saprofítico e sobrevivem nos restos culturais, portanto o manejo de resíduos é outra estratégia sugerida para minimizar o risco das podridões em espiga. Além disso, a escolha da época de semeadura e o espaçamento a ser utilizado é prática importante, pois em muitos casos há uma tendência de se utilizar espaçamentos mais adensados no momento da semeadura. Essa técnica tem sido utilizada visando maximizar o rendimento e o uso do maquinário para culturas da soja e milho, porém pode favorecer o surgimento de um microclima favorável para as epidemias (Sutton, 1982; Blandino *et al.*, 2004).

Em relação ao controle químico na parte aérea da planta, a sua eficiência é função das características do patógeno, condições climáticas, produto químico a ser utilizado, seu modo de ação e forma e época de aplicação. O controle químico deve ser utilizado após o uso de outras medidas preventivas relacionadas ao patógeno, sendo que os melhores resultados normalmente são obtidos com a integração dos vários métodos disponíveis (Fancelli & Dourado Neto, 2004). Em outro trabalho, Oliveira *et al.* (1999) avaliaram o efeito de fungicidas aplicados em sementes de

milho para o controle de *F. verticillioides* e constataram que os fungicidas foram eficientes no controle, porém não conseguiram erradicar totalmente o fungo.

2.5 Micotoxinas de *Fusarium* spp. na cultura do milho

O maior interesse científico pelo caráter toxigênico dos fungos teve início a partir da segunda metade do século XX, com a demonstração de que metabólitos secundários de fungos induziam ao câncer e doenças hepáticas em animais. Estima-se que 25% dos cultivos mundiais são afetados por fungos e a redução da contaminação por micotoxinas requer uma abordagem multifacetada que inclui agricultores, governo, empresas e cientistas (Bryden, 2007).

Dentre os gêneros de fungos que mais afetam a produção agrícola e ameaçam a saúde animal, destaca-se o gênero *Fusarium*, capaz de produzir em cereais uma ampla gama de metabólitos secundários tóxicos, encontrados frequentemente em rações e alimentos. As micotoxinas produzidas pelas espécies de *Fusarium* em milho incluem representantes das classes dos tricotecenos, zearalenona e fumonisinas. Muitos trabalhos de levantamento no Brasil e no mundo mostram um grande número de amostras contaminadas com micotoxinas, sendo as fumonisinas as de maior ocorrência na cultura do milho (Kawashima & Soares, 2006).

A produção de metabólitos secundários é influenciada por um número grande de fatores biológicos, químicos e físicos. Dentre os biológicos, destaca-se a virulência do patógeno e a suscetibilidade do hospedeiro. Como fator químico destaca-se o uso de fungicidas, que quando atua controlando a doença também ajuda na diminuição da contaminação por micotoxinas. Entre os fatores físicos temos a temperatura, umidade, infestação por insetos, condições de armazenamento (Ramos, 2008). A contaminação do milho com micotoxinas se deve principalmente às condições ambientais como

temperaturas superiores a 20°C no período da noite, no desenvolvimento da cultura (Abbasa *et al.*, 2006).

A ocorrência de micotoxinas é governada pela existência de condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento de fungos. Em condições ambientais, as várias espécies fúngicas podem ser favorecidas, propiciando o surgimento das doenças ou sobrevivendo saprofiticamente em culturas secundárias. Quando as condições são favoráveis, o crescimento das espécies toxigênicas é inevitável e o seu potencial genético será expresso (Miller, 2001).

Um fator importante que determina a severidade da doença e de acúmulo de micotoxinas em grãos de milho é a resistência genética dos híbridos. Existem diferenças entre os híbridos no que diz respeito à característica de resistência, sendo variada para a podridão de giberela e a podridão de fusarium (Reid *et al.*, 1999). A variabilidade genética do fungo, que é muito pouco explorada, também é um fator relacionado à resistência do hospedeiro e o acúmulo de micotoxinas (Melcion *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 2002).

2.5.1 Tricotecenos

Os tricotecenos são o maior grupo de micotoxinas conhecidos até hoje, produzidos por várias espécies de *Fusarium*, principalmente por *F. graminearum*. São metabólitos secundários que atuam como potentes inibidores da síntese proteica em eucariotos, podendo causar sérias toxicoses em humanos e animais. Os tricotecenos possuem uma estrutura básica sesquiterpenóide (15 carbonos) denominada de farnesil-pirofosfato e podem ser divididos em classes do tipo A, B, C e D, dependendo da presença ou ausência de grupos funcionais característicos (Kriska *et al.*, 2001). Tipo B, que contém um ceto-grupo na posição C-8 do anel

sesquiterpenóide, é o principal tricoteceno sintetizado por *F. graminearum*. Dentre estes se destacam as toxinas desoxinivalenol (DON) e nivalenol (NIV). Outra toxina importante é a T-2, pertencente ao Tipo A (Adejumo *et al.*, 2007).

DON é também chamado de vomitoxina devido aos seus efeitos deletérios sobre o sistema digestivo dos animais monogástricos. Humanos ao consumirem alimentos contaminados com DON demonstram sintomas de náuseas, febre, dores de cabeça e vômitos (Schmale & Munkvold, 2010). Quimiotipos DON podem ainda ser classificados em DON/3-ADON e DON/15-ADON, em função da posição do derivado acetil-éster do oxigênio, C-3 ou C-5, respectivamente. Nivalenol (NIV) é um derivado oxigenado C-4 de DON (Desjardins *et al.*, 1993; Goswami *et al.*, 2006). DON/15-ADON é dominante na América do Norte e América do Sul e DON/3-ADON na Europa e Ásia. NIV é comum na Europa e Ásia e raro nas Américas. (Miller *et al.*, 1991).

A síntese de tricotecenos compreende a ciclização do anel sesquiterpeno catalizada pela enzima tricodieno sintase, seguida de oito oxigenações e quatro esterificações (Desjardins & Proctor, 2007). A sequência de oxigenações, isomerizações, ciclizações e esterificações levam a molécula básica tricodieno a formar complexas estruturas de tricotecenos tais como diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2, desoxinivalenol e nivalenol (Goswami & Kistler, 2004).

Historicamente existem evidências que associam epidemias em humanos com o consumo de grãos contaminados com tricotecenos. No Japão, nos anos de 1890, 1901, 1914, 1920, 1923 e 1945 ocorreram surtos de toxicoses que foram associados ao consumo de grãos infectados com *F. graminearum*. Os sintomas incluíam náusea, vômitos, diarréias, tontura e alucinações. Sintomas parecidos foram observados

também em outros países como a Rússia, China e Coréia. Porém, as enfermidades são raramente letais com a intoxicação por DON e NIV (Desjardins *et al.*, 2006).

As toxinas DON e NIV causam recusa alimentar e diminuição de ganho de peso em suínos, além de serem imunossupressores, predispondo os animais a outras doenças e mascarando a intoxicação subjacente. Também existem problemas de diarreia, irritação dermal, hemorragia intestinal e vômitos em suínos (Reid *et al.*, 1999).

Frangos alimentados com doses baixas de toxina T-2 podem demonstrar sintomas de perda de peso, malformação de pena, e amarelecimento do bico e pernas. Contaminação com tricotecenos é economicamente importante no trigo, cevada, aveia e milho (Reid *et al.*, 1999).

2.5.2 Fumonisinias

O nome fumonisina deriva de *Fusarium moniliforme*, hoje designado de *F. verticillioides*, de onde o primeiro membro dessa classe, fumonisina B1 (FB1) foi caracterizado. A FB1 é um diéster de propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-pentahidroieicosano (Desjardins, 2006). A FB1 é a mais comum e importante da série-B, seguida da B2 (FB2) e B3 (FB3), também pertencentes a essa mesma classe. O milho é a cultura mais comumente contaminada, e as fumonisinias são as micotoxinas mais facilmente encontradas nos grãos desta cultura (Schmale & Munkvold, 2010).

Fumonisinias são micotoxinas produzidas por *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* e foram descritas em 1988 na África do Sul, quando se elucidou a estrutura química e atividade biológica (Gelderblom *et al.*, 1988; Marasas, 2001; Schmale & Munkvold, 2010).

São tóxicas e carcinogênicas para fígado e rins, imunossupressores, além de causarem edema pulmonar e neurotoxicidade em suínos (Cvetnic *et al.*, 2005). Os sintomas ainda incluem sonolência, cegueira e liquefação de tecido cerebral. Em humanos o consumo de milho contaminado está associado a taxas mais altas de câncer de esôfago (Schmale & Munkvold, 2010).

Essas micotoxinas têm sido constantemente encontradas em grãos de milho e alimentos a base de milho nos Estados Unidos, China, Europa, América do Sul e África. Dados mostram que existem no mínimo 28 análogos de fumonisinas diferentes designadas em série-A, série-B, série-C e série-P (Rheeder *et al.*, 2002).

As fumonisinas da série C (C1, C2 e C3) não apresentam grupo metil terminal e são predominantemente produzidas pela espécie *Fusarium oxysporum*. Outro grupo são as fumonisinas da série P (P1, P2 e P3), nas quais o grupo amino é substituído por um grupo 3-hidroxipiridínio. As fumonisinas da série-A são N-acetil amidos das fumonisinas da série-B; e a AK-fumonisina B1, que contém um grupo N-acetil e um grupo keto C-15 (Desjardins, 2006).

Avaliações de resultados de risco pelo consumo humano de grãos de milho contaminados com micotoxinas de *Fusarium* mostram que o Canadá e alguns países europeus possuem índice baixo, que é explicado pelo consumo baixo. Países, como a África do Sul, mostram um resultado de risco mais alto, pois possuem um consumo maior de milho (Campa *et al.*, 2005). No Brasil, pesquisas revelam um alto índice de contaminação de grãos por fumonisinas, chegando a 99% de contaminação em algumas regiões do país (Ramos, 2008).

2.5.3 Métodos de detecção e quantificação de micotoxinas

As micotoxinas são detectadas e quantificadas na alimentação humana e animal a partir de testes de anticorpos e técnicas de cromatografia que incluem a cromatografia de camada delgada (TLC – *Thin Layer Chromatography*), cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*) e cromatografia gasosa (GC – *Gas Chromatography*).

ELISA é um ensaio imunoenzimático utilizado para a detecção de micotoxinas. Existe um grande número destes testes a venda no mercado e estão disponíveis para aflatoxinas, DON, fumonisinas, ocratoxinas e zearalenona. Este é um ensaio competitivo baseado na habilidade de um anticorpo específico distinguir a estrutura tridimensional de uma micotoxina específica. A presença da toxina normalmente é marcada pela ausência de coloração (Schmale & Munkvold, 2010).

O ELISA competitivo direto é o mais utilizado para a análise de micotoxinas. A maioria dos kits comerciais trabalha com a fase cinética da ligação anticorpo-antígeno, reduzindo o tempo de incubação de uma a duas horas para poucos minutos com resultados precisos e reproduzíveis. A realização do teste requer pouco volume de amostra e normalmente poucos procedimentos de purificação, são rápidos, simples, específicos, sensíveis e portáteis para uso a campo (Zheng *et al.*, 2006).

Métodos cromatográficos como a líquida (HPLC) e a gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS) são os métodos mais utilizados para detectar e quantificar micotoxinas. Estes métodos podem ser utilizados em amostras de alimentos ou rações e os resultados são obtidos após horas ou dias. O método HPLC separa uma mistura de compostos em uma coluna fixa usando um solvente, normalmente metanol ou acetonitrila. As micotoxinas são detectadas e quantificadas pela passagem por um detector específico. GC/MS separa uma mistura de compostos

em uma coluna fixa usando gás, como o gás hélio e as micotoxinas são detectadas e quantificadas utilizando espectrofotômetro de massa. Este método requer equipamentos caros e apoio técnico (Schmale & Munkvold, 2010).

Devido à competitividade existente entre as indústrias alimentícias e de rações, essas são obrigadas a utilizar métodos mais econômicos, simples e com resultados rápidos, fazendo com que os métodos cromatográficos não sejam a melhor opção (Zheng *et al.*, 2006).

2.5.4 Distribuição geográfica das micotoxinas em milho

Nivalenol (NIV) e desoxinivalenol (DON) são os tricotecenos mais frequentemente produzidos por *F. graminearum* e esses têm sido relatados em amostras de milho naturalmente contaminado nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Nova Zelândia e outros países. Na Nova Zelândia, a contaminação do milho com micotoxinas de *Fusarium* têm apresentado consequências graves para os suínos quando os níveis de DON e NIV alcançam um nível de 0,4 a 0,5 mg.Kg⁻¹ na dieta animal (Hussein *et al.*, 2002).

Apesar dos relatos da presença de DON e NIV, as fumonisinas são as toxinas mais frequentemente encontradas em grãos e alimentos a base de milho nos Estados Unidos, China, Europa, América do Sul e África, sendo as do tipo FB1, FB2 e FB3 as mais comuns (Fandohan *et al.*, 2003).

No Brasil, como consequência das dimensões continentais do país e níveis distintos de tecnificação dos produtores, existe a possibilidade de que a presença e o teor de micotoxinas em alimentos produzidos e consumidos sejam desiguais entre as diversas regiões (Kawashima & Soares, 2006). Ono *et al.* (1998) analisaram 113 amostras de milho recém-colhido, provenientes das regiões Centro-Sul e Centro-

Oeste do Estado do Paraná, na qual se constatou a predominância de colônias com características morfológicas de *Fusarium* spp. Em relação à análise de micotoxinas, observou-se que amostras da região Centro-Oeste apresentaram teores de fumonisinas (FB1 e FB2) mais elevados em relação às amostras da região Centro-Sul do Paraná. Isso provavelmente se deve as diferenças das condições climáticas entre as duas regiões. Em outro estudo em três regiões do estado de São Paulo, 40 isolados de *F. moniliforme* (sin. *F. verticillioides*) produziram fumonisinas, que variaram de 20 mg.g⁻¹ a 2168 mg.g⁻¹ (FB₁) e 10 mg.g⁻¹ a 380 mg.g⁻¹ (FB₂) (Almeida *et al.*, 2000).

Orsi *et al.* (2000) relataram frequências de 90,2% e 97,4% de contaminação por FB1 e FB2 em grãos armazenados de milho híbrido. Vargas *et al.* (2001) analisaram 214 amostras de milho não processados de diferentes localidades do país e encontraram níveis entre 200 e 6100 µg.Kg⁻¹ de FB1 em 99% das amostras.

A contaminação não se restringe somente a grãos, mas também se estende a produtos processados de milho, é o que mostram Castro *et al.* (2004). Os autores encontraram contaminação em 100% das amostras de produtos processados de milho coletados em 13 cidades do estado de São Paulo.

No Brasil ainda são poucos os relatos da presença de DON e NIV em grãos de milho para consumo humano. No entanto, Milanez & Valente-Soares (2006) analisaram a presença de DON e NIV em 80 amostras de milho produzido em duas cooperativas do estado de São Paulo, tendo sido encontradas 16 amostras contendo NIV e duas com DON. Em outro estudo, 46 amostras de milho procedentes de alguns estados brasileiros foram analisadas e o quimiotipo DON não foi detectado em nenhum (Sabino *et al.*, 1989a). Porém Prado *et al.* (1997) em avaliação com grãos de milho procedentes de alguns estados do Brasil detectaram um baixo índice de toxina DON e T-2, sugerindo que o milho no Brasil está igual ou menos contaminado

quando comparado a outros países. Isso mostra a importância de serem realizadas análises para estas toxinas também, pois, apesar de se mostrarem presente em menores quantidades que as fumonisinas, também são consideradas importantes causadoras de intoxicações em humanos e animais.

No México, a produção de fumonisina foi avaliada em isolados de *F. verticillioides* mostrando que em 11 de 13 isolados do Noroeste do país produziram altos níveis (acima de $500 \mu\text{g.g}^{-1}$), uma apresentou valores médios com $500 \mu\text{g.g}^{-1}$ e uma produziu valor abaixo de $50 \mu\text{g.g}^{-1}$. Em contraste, isolados do México Central consistiram em baixa produção de fumonisina. Nenhum isolado de outra espécie de *Fusarium* produziu fumonisina (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005). Este resultado está em concordância com outras análises realizadas no norte do México, como os descritos por Desjardins *et al.* (1994) onde os 34 isolados de *Fusarium* analisados foram identificados como *F. verticillioides* e a produção de fumonisina foi muito variável, com valores muito baixos ($0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$) enquanto outros isolados produziram quantidades muito elevadas ($4000 \mu\text{g.g}^{-1}$) (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

F. verticillioides foi à espécie dominante no isolamento de sementes de milho na Espanha e em outros países (Ariño *et al.*, 2007). No estudo realizado por Ariño *et al.* (2007), dos 10 isolados de milho convencional, 80% produziram FB1 e FB2. Para os isolados de milho orgânico, 80% produziram FB1 e 70% produzidos FB2. Houve um elevado grau de variabilidade na concentração de fumonisinas produzido pelos isolados de *F. verticillioides* do plantio convencional quando comparado com o cultivo orgânico, que foi um pouco menor. Porém essas diferenças não foram significativas entre os tipos de cultivo.

2.5.5 Legislação vigente para micotoxinas em grãos de milho

Muitos países possuem legislação para níveis máximos de micotoxinas que os grãos podem apresentar tanto para consumo humano quanto para animais. Nesses países não são aceitos grãos importados de países que não atendam a legislação. Nos Estados Unidos, recentemente a “U.S Food and Drug Administration” recomendou que os níveis de fumonisina total (FB1, FB2 e FB3) devem estar a baixo de $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em derivados do milho destinados ao consumo humano (Brutón *et al.*, 2006).

Recentemente na União Européia foram estabelecidos valores máximos para os teores de toxinas de *Fusarium* em grãos de milho, causando um grande impacto econômico no mercado mundial de sementes (Maiorano *et al.*, 2008). A União Européia definiu limites máximos para fumonisina, variando de acordo com os diferentes destinos do milho. Para milho não processado o valor deve ser de $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, já para o milho ou alimentos a base de milho para consumo humano direto, o valor máximo aceitável é de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Em cereais e pequenas refeições à base de milho o limite máximo está fixado em $0,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, para flocos de milho $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em alimentos transformados à base de milho e alimentos para lactantes e crianças (Brutón *et al.*, 2006). O teor de fumonisina em fração de moagem do milho e outros produtos dessa moagem, que não são destinados ao consumo humano direto, com partículas de dimensões maiores que $500 \mu\text{m}$ (35 mesh) é de $1,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e para partículas maiores que $500 \mu\text{m}$ o teor aceitável é de $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Brutón *et al.*, 2006).

As condições climáticas no Brasil são, de maneira geral, favoráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos. Entretanto, apesar da área territorial para a produção de alimentos no país ser muito extensa, a implantação de padrões nacionais e medidas de fiscalização para o controle de micotoxinas é dificultada (Furlong *et al.*, 1995). No Brasil a legislação e a fiscalização ainda são falhas, tendo sido

implementado apenas neste ano os limites máximos toleráveis (LMT) de fumonisinas (FB1 e FB2) em milho pipoca e alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância), sendo os limites de $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ respectivamente. A partir de janeiro de 2012 começa a vigorar o LMT de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para fumonisina (FB1 e FB2) em farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha e LMT de $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para amido de milho e outros produtos à base de milho. Em 2014 o LMT de fumonisina (FB1 e FB2) em milho em grão para posterior processamento será de $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e em 2016 o LMT para farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha será de $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para amido de milho e outros produtos a base de milho (ANVISA, 2011).

2.6 Métodos moleculares para identificação de espécies e perfil toxigênico de fungos

Métodos convencionais para a constatação da presença de fungos em cereais são demorados e, no caso de espécies de *Fusarium*, esses procedimentos podem ser inconclusivos, pois a identificação é baseada em características morfológicas e requer grande experiência dos taxonomistas. Devido a isso, a diagnose por PCR facilita a caracterização e identificação rápida dos patógenos, pois é uma técnica específica e muito sensível, baseada em diferenças genotípicas. Outro aspecto importante da técnica de PCR é que apenas pequenas quantidades de DNA são necessárias para confirmar a presença de um agente no tecido do hospedeiro (Jurado *et al.*, 2006; Baird *et al.*, 2008).

A correta identificação de *Fusarium* torna-se ainda mais importante devido ao fato de que algumas espécies pertencentes a esse gênero são produtoras de micotoxinas que contaminam alimentos. Assim, métodos de PCR, baseados no DNA

de fungos micotoxigênicos também tem sido utilizados para determinar o potencial toxigênico desses (Baird *et al.*, 2008).

2.6.1 Identificação molecular de *Fusarium* spp.

Para *Fusarium* spp. sequências gênicas são usadas para auxiliar a classificação de espécies. Alguns dos mais comumente utilizados são os genes que codificam para a beta-tubulina, calmodulina e fator de alongação (O'Donnell *et al.*, 2000; Summerell *et al.*, 2003; Mulé *et al.*, 2004).

Diversos *primers* foram desenvolvidos para a identificação molecular de espécies de *Fusarium*. Por exemplo, Mulé *et al.* (2004) analisaram e sequenciaram uma porção do gene calmodulina e do espaçador ribossomal e desenvolveram *primers* específicos para *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, já Nicholson *et al.* (1998) desenvolveram um *primer* específico para *F. graminearum*.

Além de seqüências gênicas, outros marcadores moleculares também podem ser utilizados, não só no auxílio da classificação de *Fusarium*, mas principalmente na avaliação do grau de diversidade entre e dentro da população. Este é o caso de marcadores AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores AFLP possuem a vantagem de acessar o genoma como um todo na busca de diferenças capazes de delimitar as diferentes espécies, porém, se tratando de um marcador dominante, nem sempre é uma ferramenta utilizada como marcador filogenético. Ferramenta adequada para caracterizar grupos distintos, os marcadores AFLP são muito utilizados para determinar relações genéticas entre diferentes isolados pertencentes à mesma espécie, os quais foram sugeridos compartilhar mais

de 60% de similaridade, enquanto que espécies diferentes dividem menos de 40% (Leslie *et al.*, 2005).

2.6.2 Caracterização molecular do perfil toxigênico de *Fusarium* spp.

O interesse científico pelo caráter toxigênico de fungos teve início com a demonstração de que metabólitos secundários de fungos induziam ao câncer e doenças hepáticas em animais. Com o genoma completo de *F. graminearum* e *F. verticillioides*, além de vários bancos de dados de sequência de expressão gênica, pesquisadores tem trabalhado na identificação de genes de biossíntese de micotoxinas para tentar evitar que as mesmas entrem na cadeia alimentar (Desjardins & Proctor, 2007; Jurado *et al.*, 2005).

Com o desenvolvimento da técnica de PCR, *primers* têm sido utilizados para a identificação de genes preditivos de quimiotipos e trabalhos como o de Ward *et al.* (2002) que desenvolveram ensaios para identificação de tricotecenos com PCR *multiplex* usando *primers* que amplificam porções dos genes *Tri3* e *Tri12* preditivos de NIV, DON e suas formas acetiladas 15-ADON e 3-ADON. Outros *primers* baseados nas sequências dos genes *Tri5* e *Tri7* foram desenvolvidos e também permitiram a classificação dos isolados em NIV, 15-ADON e 3-ADON de populações de diversas regiões da Europa (Jennings, 2004; Quarta *et al.*, 2006). Da mesma forma, um ensaio de PCR baseado nas sequências dos genes *Tri7* e *Tri13* permite distinguir os quimiotipos DON de NIV para *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. cerealis* (Chandler *et al.*, 2003).

Para a fumonisina, o gene fumonisina policetônico sintase (FUM1) foi o primeiro gene a ser clonado. Este gene é um policetônico sintase interativa do Tipo 1, com sete domínios funcionais (cetoacilsintase, aciltransferase, acil carregadora de

proteína, cetoacilredutase, desidratase, metiltransferase, e enoilredutase) presente em um único produto de redução.

O FUM1 contém todos os três domínios funcionais (cetoacilredutase, desidratase e enoilredutase) requerida para reduzir completamente B-carbonis em carbonos saturados. A desativação do gene FUM1 resulta em uma redução de 99% de produção de fumonisina na cultura, sem o acúmulo de intermediários de fumonisinas detectáveis. A desativação de outros genes que também estão envolvidos em diferentes etapas da formação de fumonisina causa a redução da mesma, porém em menores quantidades do que a promovida pela desativação do gene FUM1 (Desjardins & Proctor, 2007).

Como exemplo ao que foi citado por Desjardins & Proctor (2007), temos o par de *primers* desenvolvido por Sánchez-Rangel *et al.* (2005) cujo gene alvo foi FUM1. Porém em outro trabalho, Patiño *et al.* (2004) desenvolveram um par de *primers* (VERTF1 e VERTF2) baseados na região gênica IGS e nos genes FUM5 e FUM8. Esse par de *primers* foi eficiente na identificação de isolados capazes de produzir fumonisina, demonstrando a sensibilidade existente quando baseada nessa seqüência gênica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e amostragem

Um total de 29 amostras de grãos de milho, 16 da safra 2009 e 13 da safra 2010 foram obtidas em lavouras localizadas em 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul, sendo a maioria na região centro, norte e nordeste do estado, com uma amostra da região sul (Figura 3). O nome das cultivares ou híbridos não foi informado para a maioria das amostras. No laboratório, os grãos foram acondicionados em sacos de papel, identificados e armazenados em freezer a -18°C.

3.2 Detecção e quantificação de fumonisina em grãos de milho

Para a análise de fumonisina em grãos, foi obtida uma subamostra de 200g de cada uma das 29 amostras. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), onde foram conduzidas as análises seguindo os protocolos estabelecidos para fumonisina B₁ e B₂ (FB₁ e FB₂), conforme segue.

O processo de extração foi realizada segundo o método de Camargos *et al.* (2000). Para detecção e quantificação das micotoxinas foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com derivação pós-coluna. As condições de quantificação em HPLC foram: volume de injeção de 100 µL; fase móvel composta por metanol-tampão fosfato pH 3,35 (70:30); fluxo de 0,5 mL/min; comprimento de

A incidência de *Fusarium* spp. foi avaliada com a metodologia do papel filtro com congelamento (MAPA, 2009). Os grãos selecionados aleatoriamente na amostra, em número de 25, foram dispostos de maneira equidistante sobre três folhas de papel filtro umedecidas com água destilada e esterilizada acondicionados em gerbox desinfestados com álcool 70%. Usaram-se quatro gerbox por amostra, totalizando 100 grãos analisados. Esses foram incubados por 24 h em câmara de crescimento a temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, sob lâmpadas fluorescentes brancas e com fotoperíodo de 12 h. Em seguida, foram acondicionados em freezer -20°C por 24 h e, finalmente, retornados à câmara de crescimento nas mesmas condições de incubação citadas, por mais oito dias.

A incidência de *Fusarium* spp. foi determinada pelo percentual de grãos que apresentaram desenvolvimento de colônias ou estruturas características das espécies dos complexos *G. fujikuroi* e *G. zae* quando visualizadas em microscópio estereoscópio.

3.4 Isolamento de *Fusarium* spp.

O isolamento foi realizado a partir dos grãos infectados e com colônias desenvolvidas observadas no teste de sanidade. Fragmento de micélio característico de espécies de *Fusarium* foi transferido, em condições assépticas e com o auxílio de agulha histológica, para placas de Petri contendo meio de Malte (2%). As placas foram incubadas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 h por sete dias. Estruturas fúngicas de culturas puras foram transferidas do meio Malte para o meio *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) para a produção e visualização das estruturas microscópicas típicas do gênero *Fusarium*. Neste caso, as placas também foram

incubadas em BOD com as condições de temperatura, fotoperíodo e tempo de incubação citados anteriormente.

Para a obtenção de culturas monoconidiais, microconídios ou macroconídios em meio SNA foram transferidos com a ajuda de uma agulha histológica para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada e esterilizada e agitadas em vortex por 20 s. Após agitação, transferiu-se a alíquota para placas de Petri contendo meio ágar-água (2%), descartando-se o excesso de líquido. Cada placa foi observada em microscópio estereoscópio após 24 h. Desta, retirou-se um conídio com tubo germinativo aparente, o qual foi transferido para o centro de uma nova placa contendo meio SNA e incubada em BOD por sete dias, a temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h.

3.5 Identificação morfológica e preservação dos isolados

Os isolados monospóricos com sete dias de crescimento em meio SNA tiveram sua identificação morfológica realizada segundo metodologia descrita por Nelson *et al.* (1983), Nirenberg & O'Donnel (1998) e Leslie & Summerell (2006). Foi levado em consideração características como tipo de célula conidiogênica (monofiálide ou polifiálide), tipo de células reprodutivas (macroconídios ou microconídios) e disposição das células reprodutivas dos microconídios sobre a célula conidiogênica (em cadeia ou “falsa cabeça”).

Fragmentos de 5 mm² do meio de cultura contendo estruturas fúngicas dos isolados monospóricos foram cortados e armazenados em tubos de reação 1,5 mL. Estes foram catalogados conforme o ano da safra, a sigla para identificação da cultura do milho e o número do isolado, fazendo parte da coleção do Laboratório de Epidemiologia de Plantas da UFRGS.

3.6 Produção de biomassa fúngica e extração de DNA

Isolados monoconidiais foram cultivados em Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido Batata-Dextrose (BD) e 200 μ L de solução de estreptomicina 100%. Os frascos, devidamente identificados com os códigos dos isolados, foram levados para mesa agitadora onde permaneceram por um período de 10 dias a $\pm 25^{\circ}\text{C}$. O micélio produzido foi filtrado em gaze e disposto sobre papel filtro, o qual permaneceu secando por aproximadamente duas horas em temperatura ambiente, sendo posteriormente armazenado a -20°C em envelopes de papel alumínio até o momento da extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada em câmara de exaustão pelo método de CTAB 2% conforme protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987). Para o processo de extração macerou-se os micélios coletados com nitrogênio líquido e estes foram transferidos para tubos de reação de 1,5 mL até completar 2/3 dos mesmos. A cada material macerado acrescentou-se 750 μ L do tampão CTAB 2% (CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 20 mM) e 15 μ L de 2-mercaptoetanol, agitando-se por dois minutos no vortex e incubando-se a 65°C por 15 min em banho-maria. Após este período foi adicionado 520 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) aos tubos, agitando-se novamente no vortex por um min e centrifugando a 13.000 rpm por 10 min para separação das fases. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de reação contendo igual volume de isopropanol e 50% do volume de acetato de amônio 7,5 M para remoção dos polissacarídeos. Os tubos centrifugados por 10 min a 13.000 rpm e o líquido descartado. O DNA precipitado foi lavado com 100 μ L de etanol 70% e centrifugado a 13.000 rpm por 5 min. Após descarte do sobrenadante secou-se o DNA precipitado e ressolubilizou-se

o mesmo em 100 μL de água ultrapura. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento da análise de PCR.

3.7 Identificação das espécies por PCR

Para a identificação molecular dos isolados utilizaram-se *primers* específicos para *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, conforme protocolo estabelecido por Mulé *et al.* (2004). Para a identificação de *F. graminearum* sensu lato, (chamado apenas de *F. graminearum* a partir daqui, exceto quando especificada a linhagem) foi utilizado o *primer* Fg16 (Nicholson *et al.*, 1998). As sequências de *primers* estão descritas na Tabela 1.

As reações foram realizadas em volume final de 25 μL , contendo 19,575 μL de água ultrapura; 2,5 μL de tampão; 0,75 μL de MgCl_2 ; 0,05 μL de dNTP's; 0,5 μL de cada *primer*; 0,125 μL de *Taq* DNA polimerase e 1 μL de DNA.

Para *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* o programa utilizado iniciou com uma desnaturação de 95°C por cinco min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 50 s, 56°C por 50 s, 72°C por um min e 72°C por sete min. Já para *F. graminearum*, o programa constou de uma desnaturação inicial de 95°C por três min, seguido de 38 ciclos a 95°C por 20 s, 62°C por 20 s, 72°C por 45 s e 72°C por cinco min.

Os isolados da safra 2009 tiveram os fragmentos amplificados nas reações separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com 0,7 μL de brometo de etídio (EtBr) e visualizados em luz UV. Para os isolados da safra 2010 os fragmentos foram amplificados em gel de agarose 1% corado com 2 μL de *SYBR*[®] *safe* mas também visualizados em luz UV.

TABELA 1. Sequência de *primers* descritos para as espécies de *Fusarium* que ocorrem em milho e tamanho de fragmento amplificado.

<i>Primer</i>	Sequência	Espécie alvo	Banda (pb)	Ref. ^a
SUB1	5'-CTGTCGCTAACCTCTTTATCCA-3'	<i>Fusarium subglutinans</i>	631	1
SUB2	5'-CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA-3'			
PRO1	5'-CTTCCGCCAAGTTTCTTC-3'	<i>Fusarium proliferatum</i>	585	1
PRO2	5'-TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG-3'			
VER1	5'-CTCCTGCGATGTTTCTCC-3'	<i>Fusarium verticillioides</i>	578	1
VER2	5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3'			
Fg16F	5'-CTCCGGATATGTTG GTCAA-3'	<i>Fusarium graminearum sensu lato</i>	450	2
Fg16R	5'-GGTAGGTATCCGACATGGCAA-3'			

1 - Mulé *et al.* (2004) e 2 - Nicholson *et al.* (1998).

3.8 Identificação de genes codificantes de toxinas por PCR

Reação de PCR para sequências de genes preditivos da síntese de toxinas foi realizada apenas para os isolados identificados como *F. verticillioides* e *F. graminearum*. Para *F. verticillioides* foi identificada a presença do gene preditivo da síntese de fumonisina (FUM1) utilizando-se dois *primers* FUM53R/F (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005) e VERTF1/2 (Patiño, 2004). Isolados identificados como *F. graminearum* foram analisados quanto à presença de sequências de genes que determinam três genótipos tricotecenos principais: nivalenol (NIV) e as duas formas acetiladas de desoxinivalenol (DON), 3-ADON e 15-ADON por meio de PCR *Multiplex* com os *primers* *Tri3* e *Tri12* (Ward *et al.*, 2002). As sequências dos *primers* estão descritas na Tabela 2.

As reações com o *primers* preditivos da fumonisina foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo as mesmas quantidades de reagentes descritos no item anterior. Para os *primers* com alvo em genes para síntese de tricotecenos a reação consistiu de um volume final, também, igual a 25 µL, mas contendo 18,575 µL de água ultrapura; sendo está à única diferença, 2,5 µL de tampão; 0,75 µL de MgCl₂; 0,05 µL de dNTP's; 0,5 µL de cada *primer*; 0,125 µL de *Taq* DNA polimerase e 1 µL de DNA.

TABELA 2. Sequência de *primers*, gene alvo e fragmento amplificado para isolados de *F. verticillioides* e *F. graminearum* visando à identificação de genes preditivos da síntese de fumonisina e tricotecenos, respectivamente.

<i>Primer</i>	Sequência de <i>Primers</i>	Gene alvo	Banda (pb)	Genótipo toxigênico	Ref. ^a
3 CON	5'-TGGCAAAGACTGGTTCAC-3'		243	3-ADON	
3 NA	5'-GTGCACAGAATATACGAGC-3'	<i>Tri3</i>	610	15-ADON	1
3 D15A	5'-ACTGACCCAAGCTGCCATC-3'		840	NIV	
12 CON	5'-CATGAGCATGGTGATGTC-3'		410	3-ADON	
12 NF	5'-TCTCCTCGTTGTATCTGG-3'	<i>Tri12</i>	670	15-ADON	1
12-15F	5'-TACAGCGGTCGCAACTTC-3'		840	NIV	
FUM53R	5'-ATCCGTGTATGCATATGTCGAG-3'	FUM1	354	FUM+	2
FUM53F	5'-CTTGAACGCGGAGCTAGATTAT-3'				
VERTF1	5'-GCGGGAATTCAAAAGTGGCC-3'	FUM5/ FUM8	400	FUM+	3
VERTF2	5'-GAGGGCGCGAAACGGATCGG-3'				

1 - Ward *et al.* (2002); 2 - Sánchez-Rangel *et al.* (2005) e 3 - Patiño (2004).

As condições de amplificação de FUM53R/F iniciaram com uma desnaturação de 94°C por três min, seguido de 27 ciclos com 94°C por 40 s, 56°C por 40 s, 72°C por 40 s e 72°C por sete min. Para VERTF1/2 o programa constou de uma desnaturação inicial de 94°C por um min e 25 s, seguido de 25 ciclos a 95°C por 20 s, 62°C por 20 s, 72°C por 45 s e 72°C por cinco min. Para *Tri3* e *Tri12* as amplificações consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguido de dois ciclos a 94°C por 30 s, 59°C por 30 s. A cada dois ciclos a temperatura de anelamento foi diminuída para 58°C, 56°C, 54°C, 53°C, 52°C, 51°C e mantida a 50°C por 21 ciclos. A extensão final foi realizada por um ciclo de 72°C por 10 min. Os fragmentos amplificados nas reações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, conforme já citado no item 3.8 e seguindo a mesma seqüência para as safras.

3.9 Caracterização fisiológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp.

3.9.1 Isolados selecionados

Caracterização fisiológica e patogênica foi realizada para uma seleção de 12 isolados da safra 2009, levando-se em consideração as identificações moleculares e região de origem, de forma que representassem as espécies e genótipos para micotoxinas predominantes nas populações. Escolheram-se seis isolados de *F. verticillioides* de diferentes origens e seis de *F. graminearum*, sendo quatro do genótipo NIV e dois do genótipo DON, de acordo com a proporção dos quimiotipos encontrada nas populações (Tabela 3). Os isolados foram caracterizados quanto à sensibilidade à fungicida, crescimento micelial e patogenicidade em sementes e colmo de milho.

TABELA 3. Informações sobre os isolados de *Fusarium* spp. associados ao milho no estado do Rio Grande do Sul e que foram utilizados nos ensaios para caracterização fisiológica e patogênica.

Código do Isolado	Município	Espécie (PCR)	Genótipo toxigênico*
01Fv	Boa Vista das Missões	<i>F. verticillioides</i>	FUM+
02Fv	Santa Maria	<i>F. verticillioides</i>	FUM+
03Fv	Eldorado do Sul	<i>F. verticillioides</i>	FUM+
04Fv	Vacaria	<i>F. verticillioides</i>	FUM+
05Fv	Passo Fundo	<i>F. verticillioides</i>	FUM+
06Fv	Caxias do Sul	<i>F. verticillioides</i>	FUM+
07FgNiv	Boa Vista das Missões	<i>F. graminearum</i>	NIV
08FgNiv	Caxias do Sul	<i>F. graminearum</i>	NIV
09FgNiv	Bom Jesus	<i>F. graminearum</i>	NIV
10FgNiv	Vacaria	<i>F. graminearum</i>	NIV
11Fg15A	Vacaria	<i>F. graminearum</i>	15-ADON
12Fg15A	Vacaria	<i>F. graminearum</i>	15-ADON

* FUM+ - isolados que apresentaram o gene para fumonisina quando utilizado os *primers* FUM53R/F e VERTF1/2 preditivos para essa micotoxina; NIV – isolados que apresentaram o gene para nivalenol a partir do uso de *primers* com alvo em gene *Tri3* e *Tri12* para síntese de tricoteceno 15-ADON – isolados que apresentaram o gene para desoxinivalenol, também a partir do uso de *primers* com alvo em gene *Tri3* e *Tri12*.

3.9.2 Avaliação da sensibilidade ao fungicida tebuconazole

O ensaio de sensibilidade foi conduzido com o fungicida do grupo triazol, tebuconazole (Folicur 200 CE *Bayer CropScience*), por ser este um dos principais fungicidas utilizado nas culturas e por haver informações prévias sobre a sensibilidade de isolados de *F. graminearum* obtidos da cultura do trigo (Del Ponte *et al.*, 2010).

A sensibilidade ao tebuconazole foi quantificada pela mensuração do crescimento radial em cinco concentrações do fungicida (0; 0,01; 0,05; 0,1; 1 e 10 ppm) obtida por diluição seriada (Mullenborn *et al.*, 2008; Becher *et al.*, 2010). Cada isolado foi inicialmente crescido em BDA acidificado e mantido por 10 dias em ambiente controlado com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 12 h de luz. Das colônias fúngicas foram retirados discos de micélio de 6 mm de diâmetro e transferidos para o centro das placas de Petri com o meio BDA mais fungicida. Realizaram-se três repetições por dose para cada isolado. As placas ficaram mantidas no escuro, em ambiente com temperatura controlada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias quando se mensurou o diâmetro das colônias em duas direções perpendiculares.

A relação entre o crescimento micelial na testemunha e o observado nas placas contendo fungicida foi utilizada para calcular a inibição relativa (IR %) pela fórmula: $\text{IR} = [(C_{\text{resTest}} - C_{\text{resFung}}) / C_{\text{resTest}}] * 100$; em que C_{resTest} = crescimento na testemunha (mm); C_{resFung} = crescimento micelial no meio contendo fungicida (Mullenborn *et al.*, 2008; Becher *et al.*, 2010). A dose que inibiu 50% do crescimento micelial (DL_{50}) foi obtida por regressão linear entre Log_{10} da dose do fungicida (variável independente) e a inibição relativa (%) (variável dependente) (Mullenborn *et al.*, 2008; Becher *et al.*, 2010).

3.9.3 Avaliação do crescimento micelial

Colônias dos isolados foram inicialmente crescidas em BDA por um período de 10 dias. Destas, retirou-se discos de micélio com 6 mm de diâmetros e transferiu-se para o centro de novas placas com BDA. Para cada isolado havia cinco repetições. Essas foram mantidas a temperatura controlada de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ em escuro contínuo. Realizaram-se medições do diâmetro radial das colônias a cada 24 h, por um período de sete dias ou até que a colônia atingisse as bordas da placa. Avaliou-se comparativamente o crescimento micelial de isolados entre e dentro das espécies.

3.9.4 Avaliações de patogenicidade

A patogenicidade dos isolados foi avaliada usando-se diferentes metodologias visando avaliar a agressividade dos isolados na: 1) promoção da infecção e colonização de sementes e seu efeito potencial na redução da viabilidade e emergência das plântulas e 2) severidade em colmos avaliada pelo tamanho de lesões a partir de inoculações pontuais.

3.9.4.1 Eficiência de infecção, colonização e redução de viabilidade das sementes

Sementes de milho foram inoculadas com base nas metodologias propostas por Machado *et al.* (2001) e Araújo *et al.* (2005) visando a infecção de sementes sob condições de restrição hídrica do substrato.

Sementes sem tratamento inseticida ou fungicida do híbrido 30F53 (Pioneer) foram avaliadas preliminarmente em teste de sanidade onde se constatou a presença de *Fusarium* spp., *Penicillium* e *Aspergillus*. Das 100 sementes analisadas, 100% estavam infestadas com *Fusarium* e 10% com *Aspergillus* e *Penicillium*. Visando

erradicar os fungos presentes nas sementes, realizou-se desinfestação superficial e termoterapia. A desinfestação superficial foi feita pela imersão das sementes em álcool por 30 s, solução de hipoclorito de sódio 1% por um min e enxágue duplo com água destilada. O tratamento termoterápico seguiu a metodologia de Coutinho *et al.* (2007) em que as sementes são imersas em água quente (60°C) por um período de 10 min e secas em papel filtro na câmara de fluxo laminar por duas horas. A incidência de fungos na amostra tratada foi verificada posteriormente, usando o teste de papel de filtro. Constatou-se a eficácia dos tratamentos, pois 95% das sementes não se apresentaram infectadas pelos fungos previamente detectados.

Para a inoculação de sementes, fragmentos de micélio dos isolados conservados na coleção foram transferidos para placas de Petri contendo meio SNA, onde permaneceram por sete dias em BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h. Após a incubação, em condições de assepsia, colocou-se 2,5 mL de água destilada e esterilizada e raspou-se com alça de Drigalski as colônias fúngicas para obtenção de uma suspensão de esporos com concentração aproximada de 10^6 conídios/mL, calibrada em câmara de Newbauer.

Em placas de Petri de 140x15 mm, contendo meio BDA com restrição hídrica de NaCl no potencial -1,2MPa (9,3 g/L), 1 mL da suspensão de esporos, com concentração aproximada de 10^6 conídios/mL, foi distribuída e espalhada com alça de Drigalski. As placas, dez por tratamento, foram vedadas e levadas para câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 25°C onde permaneceram por cinco dias. Após este período, 25 sementes de milho foram distribuídas em camada única, em cada placa. As sementes foram levemente pressionadas no meio para que aumentasse a superfície de contato entre elas e o micélio do fungo. Novamente as placas foram vedadas e levadas para a câmara de crescimento, onde permaneceram

por 120 h. Ao fim deste período, as sementes foram colocadas para secar em papel toalha, na câmara de fluxo laminar por 24 h.

Em gerbox, desinfestado com álcool 70%, foram colocadas 25 sementes inoculadas sobre três folhas de papel filtro umedecidas com água destilada e esterilizada, totalizando 100 sementes por tratamento. Previamente ao plaqueamento as sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool por um min, solução de hipoclorito de sódio 1% por um min e logo em seguida enxaguadas com água destilada por duas vezes. Os gerbox foram acondicionados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h de luz e temperatura controlada de 2°C onde permaneceram por sete dias.

A eficiência de infecção e colonização foi realizada com a visualização das sementes em microscópio estereoscópio, observando-se a presença de estruturas características do patógeno. Essas avaliações foram realizadas três vezes, sendo em 48, 96 e 144 horas após a incubação. Foi proposta e utilizada uma escala visual para a quantificação da intensidade de colonização da semente, com três classes sendo 1= baixa, 2= média e 3= alta (Figura 4).



FIGURA 4. Escala para quantificação da intensidade de colonização de *F. verticillioides* e *F. graminearum* em sementes de milho, onde 1= baixa, 2= média e 3= alta. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

A viabilidade das sementes foi também avaliada e expressa pela proporção de sementes germinadas nos gerbox, a cada período de tempo de incubação, conforme citado acima.

3.9.4.2 Redução de emergência de plântulas

Copos de 300 mL (altura de 8,5 cm e diâmetro de 7 cm), com a parte inferior perfurada para facilitar a percolação da água, foram preenchidos com substrato (VIDA[®]) esterilizado, composto por humoativo (fertilizante orgânico composto de lodo da estação de tratamento de efluentes da indústria de celulose) e substrato de casca de eucalipto fermentada. Em cada copo plantaram-se duas sementes, previamente inoculadas, a uma profundidade de 1,5 cm cada. Após a semeadura distribuiu-se ao acaso os copos em câmara de crescimento a 23°C e fotoperíodo alternado de 12 h de luz branca fluorescente por 10 dias.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de 12 plantas. No total, foram avaliados 13 tratamentos, sendo 12 isolados e uma testemunha não inoculada com o patógeno. As variáveis avaliadas foram proporção de plântulas emergidas aos 2, 4 e 6 dias após o plantio.

3.9.4.3 Patogenicidade e agressividade em colmos

O teste para verificação de patogenicidade e agressividade dos isolados em colmo de milho foi realizado levando em consideração o protocolo de Damicone *et al.* (1988) com algumas adaptações.

Sementes previamente desinfestadas superficialmente e por termoterapia foram semeadas conforme descrito no item 3.9.4.2. Os copos onde se realizou a

semeadura foram mantidos em casa de vegetação até o momento de avaliação. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com uma repetição com cinco sementes para cada tratamento.

Os 12 isolados foram retirados da coleção e colocados para crescer em placas de petri contendo meio BDA. Estes permaneceram em BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h por sete dias.

Os isolados foram avaliados quanto à patogenicidade e agressividade em colmos de milho a partir da inoculação, com o auxílio de palitos esterilizados. Uma das pontas dos palitos esterilizados foi colocada em contato com a colônia de cada isolado pela raspagem superficial do meio para retirada de um pouco de micélio, conforme protocolo adaptado de Damicone *et al.* (1988).

Plantas de milho com 20 dias foram inoculadas com a inserção das pontas dos palitos que continham a estrutura fúngica. A perfuração do colmo foi a aproximadamente 1 cm da linha do substrato e os palitos foram mantidos no local por um período de 48 h. Após 10 dias do procedimento de inoculação o teste foi avaliado observando-se a ausência ou presença de lesão, sendo essa mensurada quando presente. As plantas foram cortadas com tesouras, o mais próximo do substrato possível. Em uma bancada foram feitos cortes longitudinais no colmo das plantas com o auxílio de um bisturi, previamente esterilizado. O comprimento das lesões foi mensurado a partir do tecido descolorido, com o auxílio de uma régua milimetrada.

3.10 Análises estatísticas

Análise univariada foi conduzida para avaliar o efeito individual de cada um dos 12 isolados, pelo agrupamento dos isolados em espécies e em genótipos toxigênicos dentro de *F. graminearum*. O teste foi avaliado por meio da análise de

deviance baseada em modelos lineares generalizados (MLGs) (ANODEV). De maneira simplificada, o teste qui-quadrado da ANODEV pode ser entendido como um análogo do teste F da ANOVA clássica. Para cada uma das variáveis-resposta avaliada, atribuiu-se distribuição normal com função de ligação log através da função *glm* do R.

As variáveis-resposta analisadas por essa metodologia foram taxa de crescimento (mm/dia), redução de germinação e emergência (%), eficiência de infecção de sementes (%), agressividade em colmos (mm). As análises de *deviance* foram realizadas utilizando o ambiente R: *A Language and Environment for Statistical Computing*, versão 2.12.1 (2010).

Adicionalmente às análises univariadas, análise multivariada foi utilizada para comparar simultaneamente os 12 isolados visando à formação de grupos por similaridade. A análise de correlação (coeficiente de *Pearson*) foi utilizada para definir a influência entre as variáveis e o índice de *Gower* para avaliar a semelhança entre as unidades amostrais, por serem utilizadas na análise variáveis com unidades distintas (Legendre & Legendre, 1998). Para a análise de agrupamento dos isolados foi adotado o critério de ligação completa de Ward, tomando-se como ponto de corte (número de grupos) a significância obtida pela auto reamostragem (procedimento *bootstrap* com 1.000 permutações). Para tal, assumiu-se que: tendo-se $P(G^{\circ} \leq G^*) > \alpha$ (utilizando-se $\alpha = 0,05$) assume-se a nitidez do agrupamento (Pillar, 1999a).

O procedimento foi utilizado com os seguintes dados das variáveis: Eficiência de infecção de sementes, índice de crescimento micelial, DL50 tebuconazole, redução da germinação, redução da emergência e agressividade em colmo de milho.

A análise de componentes principais foi realizada para identificar quais variáveis apresentam maior influência na caracterização dos isolados. Assim, foram

extraídos os fatores com autovalores ≥ 1 considerando também a contribuição da variância total acumulada nos componentes principais sequenciais $\geq 70\%$. Tais procedimentos foram adotados para facilitar a apresentação dos padrões obtidos (Mora-Aguilera & Campbell, 1997). A significância dos eixos selecionados foi avaliada pela auto reamostragem (1.000 permutações), em que para: $P(\theta_i^\circ \geq \theta_i^\circ) \leq \alpha$ rejeita-se a hipótese nula e se assume a estruturação significativa dos eixos (Pillar, 1999b), sendo que no presente trabalho não foi adotado um limiar para α buscando evitar o erro do Tipo II. Todas as análises estatísticas multivariadas foram realizadas com auxílio do programa MULTIV versão 2.4.2 (Pillar, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Levantamento de *Fusarium* spp. e micotoxinas em grãos de milho

4.1.1 Incidência de grãos ardidos e *Fusarium* spp.

Do total de 29 amostras de grãos analisadas, em 13 não foi observada a presença de grãos ardidos (seis de 2009 e sete de 2010). Apenas três amostras apresentaram incidência de grãos ardidos superior a 25%, sendo duas da safra 2009, oriundas de Coxilha e Santa Maria, e uma da safra 2010, oriunda de Santa Bárbara do Sul. A média geral foi de 7% nas duas safras e o valor máximo foi de 61% (Tabela 4). Quando separado por safras, observa-se que na primeira houve maior amplitude de variação na incidência de grãos ardidos, porém com mais de 50% das amostras apresentando valores entre zero e 8%, assim como a safra 2010 (Tabela 4).

Das 29 amostras de grãos, 27 foram analisadas quanto à prevalência e incidência de espécies dos complexos *G. fujikuroi* (*F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum*) e complexo *G. zea* (*F. graminearum*) uma vez que duas amostras não possuíam número de sementes suficientes. Em apenas uma amostra, oriunda de Santa Maria, safra 2010, não foi observada infecção por *Fusarium*. Os valores de incidência variaram de zero a 100% considerando todas as espécies nas duas safras (Tabela 4).

TABELA 4. Incidência de fungos dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *Gibberella zeae* e grãos ardidos em amostras de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 no estado do Rio Grande do Sul.

Safra	Local de Origem	Código	Grãos ardidos (%)	<i>G. fujikuroi</i> (%)	<i>G. zeae</i> (%)
2009	Boa Vista das Missões	0901	13	36	0
	Boa Vista das Missões	0902	4	39	0
	Casca	0903	0	58	0
	Caxias do Sul	0904	0	44	0
	Coxilha	0905	61	39	3
	Júlio de Castilhos	0906	5	29	0
	Lagoa Vermelha	0907	0	73	0
	Passo Fundo	0908	5	71	2
	Passo Fundo	0909	0	9	0
	Portão	0910	3	64	6
	Santa Maria	0911	29	0	0
	São João da Urtiga	0912	1	52	0
	Vacaria	0913	7	69	0
	Vacaria	0914	4	87	0
	Vacaria	0915	0	96	4
	Vacaria	0916	0	*	*
Média Safra 2009	-	-	8,25	51,06	1
2010	Boa Vista do Cadeado	1001	0	61	0
	Boa Vista do Cadeado	1002	0	100	0
	Casca	1003	15	79	4
	Casca	1004	0	*	*
	Cruz Alta	1005	2	66	0
	Eldorado do Sul	1006	4	94	0
	Encantado	1007	4	78	0
	Encantado	1008	0	75	0
	Machadinho	1009	0	28	0
	Sta. Bárbara	1010	41	70	0
	Três Passos	1011	5	37	0
	Tupanciretã	1012	0	20	0
	Veranópolis	1013	0	97	0
Média Safra 2010	-	-	5,46	67,08	0,33
Média total	-	-	7	58,18	0,70

*A avaliação da incidência de *Fusarium* não foi realizada.

Espécies do complexo *G. fujikuroi* apresentaram prevalência de 96% nas amostras, com incidência média geral de 58% (Tabela 4). Nas amostras da safra 2009, a incidência variou de zero a 96%, valor máximo observado na amostra de Vacaria. Em apenas duas amostras, de Santa Maria e Passo Fundo, foram observados valores de incidência abaixo de 10%. No restante, a incidência foi superior a 25%. A

média de incidência de *G. fujikuroi* nessa safra foi de 51%. Na safra 2010 a prevalência de *G. fujikuroi* foi de 100%, com incidência variando de 20% a 100%. O valor mínimo foi observado na amostra de Tupanciretã e o máximo na amostra de Boa Vista do Cadeado. Outras duas amostras apresentaram valores entre 20 e 30% de incidência, uma com 37% e o restante teve incidências superiores a 60%. A média na safra foi 67%, valor superior à safra anterior.

Quanto à *G. zea*, essa foi observada em apenas cinco das 27 amostras analisadas (prevalência=18%), oriundas das localidades de Coxilha, Passo Fundo, Portão e Vacaria, na safra 2009 e de Casca na safra 2010. A incidência de *G. zea* nessas cinco amostras variou de 2 a 6%.

No presente estudo, a predominância de espécies do complexo *G. fujikuroi* nas amostras está de acordo com levantamentos prévios em grãos e sementes de milho de várias regiões do Brasil. Por exemplo, Ono *et al.* (2000) analisaram 150 amostras, colhidas entre os anos de 1995 e 1996 em três regiões do estado do Paraná (Centro-sul, Centro-oeste e Norte) e observaram que *F. verticillioides* foi a espécie com maior prevalência, detectada em 74% das amostras da região Centro-sul, 86% no Centro-oeste e 100% do Norte do Paraná. A segunda espécie em prevalência (<25%) foi *F. proliferatum*, detectada nas regiões Centro-sul e Centro-oeste. Por último, *F. subglutinans* foi observada em menos de 10% das amostras apenas da região Centro-sul.

Em outro levantamento, Goulart & Fialho (1999) analisaram 313 amostras de milho colhidas entre os anos de 1993 a 1997 e oriundas de experimentos e lavouras da região de Dourados, estado do Mato Grosso do Sul. Os autores também relataram prevalência de *F. verticillioides* em 100% das amostras, com incidência média de 56,7%. Ottoni (2008) analisou 100 amostras de milho de diferentes regiões do Brasil,

da safra e safrinha dos anos de 2006 e 2007, e observou resultados semelhantes aos encontrados por Ono *et al.* (2000) e Goulart & Fialho (1999). O autor constatou de 100% de prevalência de *F. verticillioides*, com incidência média de 52% na safra e 62% na safrinha de 2006 e 45% e 83% para safra e safrinha em 2007, respectivamente.

Buiate *et al.* (2008), na região do Centro-Oeste do Brasil, também confirmou a alta frequência de *Fusarium* em grãos de milho, por meio da análise de amostras de grãos de híbridos de milho em quatro municípios do Triângulo Mineiro em experimentos conduzidos entre março de 2005 e fevereiro de 2007. Foram avaliados 96 híbridos no primeiro ano e 84 no segundo pelo método do papel filtro. A espécie observada com maior frequência foi *F. moniliforme* (sin. *F. verticillioides*), seguido de *G. zae* em baixa frequência em todos os locais.

Já na região mais ao sul do Brasil, com o objetivo de avaliar a prevalência de fungos em sementes de milho tratadas com fungicidas e comercializadas em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Nerbass *et al.* (2008) analisaram 224 amostras de milho da safra agrícola 2006/07, sendo 74 do Rio Grande do Sul e o restante de Santa Catarina. Dos fungos presentes, *F. verticillioides* foi o que apresentou maior prevalência (86,6%) com incidência média de 14%.

Em outros países as altas prevalências e incidência de *F. verticillioides* também foram constatadas, como mostra o trabalho de Nayaka *et al.* (2010) que avaliaram 43 amostras de sementes de milho dos estados de Karnataka e Andhra Pradesh na Índia, em que a maioria das sementes apresentou-se infectada por *F. verticillioides*, com incidência de 5 a 51%.

O presente estudo mostra que, apesar da baixa frequência de grãos ardidos nas amostras avaliadas, foi observada alta incidência de espécies do complexo *G.*

fujikuroi mesmo em grãos assintomáticos. Vários estudos mostram que *F. verticillioides* coloniza a planta de forma sistêmica e pode permanecer internamente nos grãos sem causar sintomas ou sinais, o que pode explicar a alta incidência desse fungo em grãos assintomáticos e falta de correlação entre incidência de grãos ardidos e *Fusarium* spp. (Munkvold, 2003).

A constatação de uma maior incidência do complexo *G. fujikuroi* está de acordo com estudos no Brasil e no exterior que tem mostrado que *F. verticillioides* é de ocorrência bastante comum na cultura do milho em quase todo o mundo.

A baixa frequência de *F. graminearum* (*G. zae*) (Tabela 4) é também relatada em outros trabalhos de levantamento de fungos em grãos e sementes de milho, principalmente no estado do Rio Grande do Sul. Trento *et al.* (2002) avaliaram a incidência de fungos em grãos de milho de dois sistemas de cultivo (rotação de culturas e monocultura) no Rio Grande do Sul. Estes autores verificaram uma baixa incidência de *F. graminearum* em relação a *F. verticillioides* em ambos os sistemas, o que foi atribuído ao baixo índice de precipitação pluvial ocorrido no período de estudo.

4.1.2 Detecção e quantificação de fumonisinas

Das 29 amostras analisadas, 93,1% estavam contaminadas com a FB1 e 44,8% com FB2 (Tabela 5). Nas duas safras, para FB1, 10 amostras apresentaram apenas traços de fumonisina, ou seja, um valor considerado maior que o limite detectável, porém menor que o limite de quantificação. Duas outras amostras obtiveram valores menores ao limite de detecção. Das 12 amostras que apresentaram níveis traços, nove eram da safra 2009.

O valor máximo encontrado de FB1 foi de 2,032 $\mu\text{g.g}^{-1}$, na amostra de Encantado e o mínimo foi de 0,078 $\mu\text{g.g}^{-1}$, na amostra de Tupanciretã, ambas da safra 2010. Na safra 2009, o valor máximo de FB1 foi de 1,631 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e o mínimo 0,239 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Tabela 5). A média de FB1 foi de 1,38 $\mu\text{g.g}^{-1}$ entre as 29 amostras.

Quando a concentração de FB1 de amostras diferentes de um mesmo município nota-se que os resultados são semelhantes na maioria dos casos. Porém esse fato não foi constatado para as duas amostras da cidade de Encantado (safra 2010), na qual a amostra 1007 apresentou o maior valor de FB1 (2,032 $\mu\text{g.g}^{-1}$) em contraste com a amostra 1008, cujo valor foi menor que 0,4 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Os resultados para FB2 mostraram que das 29 amostras, 16 apresentaram valores inferiores ao limite de quantificação e duas apresentaram apenas traços. As amostras que apresentaram apenas traços foram originadas das cidades de Eldorado do Sul e Passo Fundo, safra 2010. Nenhum dos valores encontrados para FB2 foi superior a 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$, sendo o valor mais baixo 0,134 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e média de 0,42 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Tabela 5).

A quantificação de fumonisina nas amostras foi realizada quase que totalmente com grãos assintomáticos (Tabela 4), embora na maior parte das amostras, em níveis muito baixos. Não foi observada correlação aparente entre incidência de *Fusarium* e a produção de fumonisina, fato esse comprovado por amostras, como a 1002 de Boa Vista do Cadeado que apresentou 100% de incidência e apenas traços de FB1 e nada de FB2, contrariando o esperado de alta produção de fumonisina para esta amostra. Ainda, nas amostras 0901, 0902, 0905 e 1011 que tiveram incidências do complexo *G. fujikuroi* (35% a 39%), valores considerados baixos se comparados com os de outras amostras, a produção de FB1 ficou acima de 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$, que é considerado alto pela Comunidade Européia. Os resultados mostrados aqui demonstram

complexidade do processo de síntese e acumulação de fumonisina nos grãos de milho, a qual é influenciada por múltiplos fatores genéticos e ambientais.

TABELA 5. Concentração de fumonisina em amostras de grãos de milho das safras 2009 e 2010 no estado do Rio Grande do Sul.

Safra	Local de Origem	Código	FB1** $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	FB2** $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
2009	Boa Vista das Missões	0901	1,044	0,817
	Boa Vista das Missões	0902	1,631	0,717
	Casca	0903	0,291	0,338
	Caxias do Sul	0904	0,239	ND
	Coxilha	0905	1,186	ND
	Júlio de Castilhos	0906	Traços	ND
	Lagoa Vermelha	0907	Traços	ND
	Passo Fundo	0908	ND	ND
	Passo Fundo	0909	0,736	Traços
	Portão	0910	0,302	0,184
	Santa Maria	0911	ND	ND
	São João da Urtiga	0912	Traços	ND
	Vacaria	0913	Traços	ND
	Vacaria	0914	Traços	ND
	Vacaria	0915	Traços	ND
	Vacaria	0916	Traços	ND
Média Safra 2009	-	-	0,77	0,51
2010	Boa Vista do Cadeado	1001	Traços	ND
	Boa Vista do Cadeado	1002	Traços	ND
	Casca	1003	0,750	0,166
	Casca	1004	0,352	0,155
	Cruz Alta	1005	Traços	ND
	Eldorado do Sul	1006	0,106	Traços
	Encantado	1007	2,032	0,819
	Encantado	1008	0,324	0,271
	Machadinho	1009	0,607	0,134
	Sta. Bárbara	1010	0,290	0,215
	Três Passos	1011	1,015	0,844
	Tupanciretã	1012	0,078	ND
	Veranópolis	1013	0,093	ND
Média Safra 2009	-	-	0,56	0,37
Média Total	-	-	0,65	0,42

** Limite de quantificação (LQ): fumonisina B₁ e B₂ 0,078 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. ND = < Limite de Detecção (LD); Traços = > LD e < LQ

Os níveis de fumonisina encontrados nas amostras foram, em sua maioria, menores dos que os encontrados por Ono *et al.* (2006) que, ao analisarem separadamente grãos ardidos e grãos assintomáticos para FB1 e FB2, encontraram

níveis variando entre 0,57 a 20,38 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para os assintomáticos. As 109 amostras foram coletadas em cooperativas do estado do Paraná no ano de 1995.

Comparando os níveis de fumonisina em grãos assintomáticos e em grãos ardidos, Ono *et al.* (2006) verificaram que a concentração da toxina nos grãos ardidos chegaram a valores muito mais altos que os de grãos assintomáticos, sugerindo que os grãos ardidos contribuem com quase a totalidade de contaminação por fumonisina. Já Orsi *et al.* (2000) observaram níveis de fumonisina que variaram de 0,87 a 49,32 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em amostras de milho com grãos assintomáticos do estado de São Paulo. Ottoni (2008) constatou níveis baixos de fumonisina, variando entre zero e 2,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em 15 amostras de grãos assintomáticos dos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná.

A Comunidade Européia estabeleceu um nível máximo de 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para a somatória de FB1 e FB2 para milho destinado ao consumo humano. No presente estudo, apenas cinco amostras (17,2%) apresentaram concentrações maiores do que o proposto pela legislação Européia. Porém, a partir de 2016 começará a vigorar no Brasil o limite máximo tolerável de fumonisina (FB1 e FB2) em grãos de milho para processamento que é de 5 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e seguindo este valor, as amostras aqui avaliadas seriam todas liberadas para consumo humano.

As fumonisininas são consideradas atualmente como as toxinas de maior relevância produzidas por *F. verticillioides* e outras espécies de *Fusarium* em *commodities* agrícolas, principalmente na cultura do milho. A maior prevalência dessas micotoxinas no milho é o tipo FB1, o que foi verificado no presente estudo.

Na Índia, estudos de infecção fúngica e contaminação com fumonisininas em milho cultivado ainda são muito escassas. Nayaka *et al.* (2010) analisaram os teores de fumonisina em milho produzido do sul da Índia, para consumo humano e animal e

verificaram que 23 de 35 isolados de *F. verticillioides* produziram FB1 em níveis de 133 $\mu\text{g.g}^{-1}$ a 1617 $\mu\text{g.g}^{-1}$, confirmando o potencial toxigênico da população. Além de características genéticas da população do fungo, o grau de contaminação por fumonisina depende das condições ambientais, como seca, calor, estresse ou espécies competidoras que favorecem o desenvolvimento do patógeno (Miller, 1999).

Outro tipo de milho, o pipoca, é muito comum em alguns países para consumo humano, porém, por esse também ser suscetível à infecção por espécies toxigênicas de *Fusarium*, os níveis de tolerância são geralmente mais baixos do que para outros tipos de milho. Nos Estados Unidos, o nível de tolerância aceitável para fumonisina em milho pipoca é de 3 mg.Kg^{-1} . Dowd & Jonhson (2009) cultivaram, em sistema de irrigação convencional, cinco híbridos de milho pipoca em Illinois (EUA) nos anos de 2005 a 2008. Em todas as 27 amostras de grãos analisadas por HPLC, a fumonisina foi detectada em níveis de 0,5 a 1,68 mg.Kg^{-1} .

Trabalhos recentes relataram principalmente a presença de fumonisinas em milho e seus produtos. A correlação entre as concentrações de micotoxinas encontradas em milho não processado e produtos de milho não é clara, mas há evidências que os produtos processados podem apresentar concentrações mais baixas devido a limpeza inicial do milho em moinhos (Kawashima & Soares, 2006).

Murphy *et al.* (1993), monitorando FB1, FB2 e FB3 no milho proveniente de Iowa, Wisconsin e Illinois durante 4 anos (1988-1991), observaram oscilações nas concentrações de FB1 (0 a 37,9 mg.g^{-1}), FB2 (0 a 123,3 mg.g^{-1}) e FB3 (0 a 4,0 mg.g^{-1}) com maior nível na safra 1989. Salienta-se que nesta safra a *National Service Laboratories* detectou numerosos relatos de leucoencefalomalácia equina e síndrome de edema pulmonar em suínos nos estados de Arizona e Maryland, EUA.

Ross *et al.* (1991) analisaram alimentação animal envolvida em casos de intoxicação em Iowa, Illinois, Georgia, Carolina do Norte, Indiana, Nova York, Louisiana, Texas, Arizona, Mississippi, Virginia, Maryland e Delaware e detectaram níveis de FB1 de até 330 mg.g⁻¹. Munkvold e Desjardins (1997) detectaram até 330 mg.g⁻¹ (FB1) em rações provenientes dos EUA, sendo detectados também elevados níveis em milho da China (155 mg.g⁻¹ de FB) e África do Sul (118 mg.g⁻¹ de FB).

No trabalho realizado no Brasil por Kawashima & Soares (2006) a presença de fumonisina B1 foi analisada em 74 amostras de produtos a base de milho adquirido no comércio da cidade de Recife (PE), entre os anos de 1999 a 2001. A fumonisina B1 foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência e foi encontrada em 71 (94,6%) das 74 amostras avaliadas, em concentrações variando de 20 a 8600 µg.Kg⁻¹. Entre as amostras positivas, as concentrações mais altas foram encontradas em fubá (média = 2700 µg.Kg⁻¹ e máximo = 8600 µg.Kg⁻¹). Em apenas uma das amostras de fubá não foi detectada a presença de fumonisina B1. Foi, portanto, constatada contaminação frequente e relativamente elevada nesse produto de milho seco. Quirera, farinha e flocos de milho pré-cozidos vêm em seguida, com concentrações médias das amostras positivas com valores de 410 e 370 µg.Kg⁻¹, respectivamente. A concentração média das amostras de farinha de milho contaminadas com fumonisina B1 foi de 73 µg.Kg⁻¹ e está abaixo das médias dos levantamentos citados. Também no presente trabalho, as menores concentrações médias de fumonisina B1 foram encontradas nas das amostras de quirera fina (230 µg.Kg⁻¹), canjica (190 µg.Kg⁻¹), farinha de milho (73 µg.Kg⁻¹) e na única amostra de milho de pipoca (21 µg.Kg⁻¹).

Levando em consideração os limites máximos de fumonisina em grãos de milho estabelecidos pela Comunidade Européia, a maioria das amostras analisadas no

presente trabalho estaria dentro dos padrões aceitáveis e liberadas para o consumo humano. No caso dos limites máximos de fumonisina em grãos, que serão implementados no Brasil em 2016, todas as amostras ainda seriam liberadas para consumo humano. Porém, os dados são para um número relativamente pequeno de amostras de duas safras. Resultados de pesquisa têm mostrado a dificuldade de eliminação das fumonisinas da nossa dieta haja vista que estas foram detectadas, embora em níveis baixos, em amostras de grãos assintomáticos. Outro problema encontrado é que o efeito dessa micotoxina é cumulativo no organismo e por isso é desaconselhado o consumo freqüente na dieta de crianças e grandes consumidores de produtos de milho seco, mesmo que em pequenas quantidades.

4.2 Levantamento de espécies de *Fusarium* spp. associados aos grãos de milho no Rio Grande do Sul

Dos isolamentos realizados nas amostras de grãos das duas safras, foram obtidos 304 isolados monospóricos de *Fusarium* spp. Esses foram divididos em quatro populações segundo os critérios de ano de colheita, amplitude geográfica da amostragem e número de isolados por amostra. Sendo assim, agruparam-se os isolados em duas populações regionais (isolados de vários locais em uma safra), e duas populações locais, ou seja, isolados de uma única amostra de grãos originada de Cruz Alta e outra de Veranópolis, ambas da safra 2010 (Apêndice 1).

As populações regionais foram constituídas por uma coleção de isolados de diversos municípios, sendo cinco isolados de uma amostra de um município, totalizando 96 isolados da safra 2009 e 61 isolados da safra 2010. As populações locais foram constituídas por 86 e 61 isolados, para os municípios de Cruz Alta e Veranópolis, respectivamente (Apêndice 1).

As análises morfológicas e moleculares por PCR permitiram identificar quatro espécies considerando todos os isolados nas populações, sendo as três do complexo *G. fujikuroi* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*) e *F. graminearum* (Figura 5). De maneira geral, com base nos resultados da identificação molecular, *F. verticillioides* foi a espécie dominante (264 isolados), seguida de *F. graminearum* (21 isolados), *F. subglutinans* (4 isolados) e *F. proliferatum* (2 isolados) (Tabela 6).

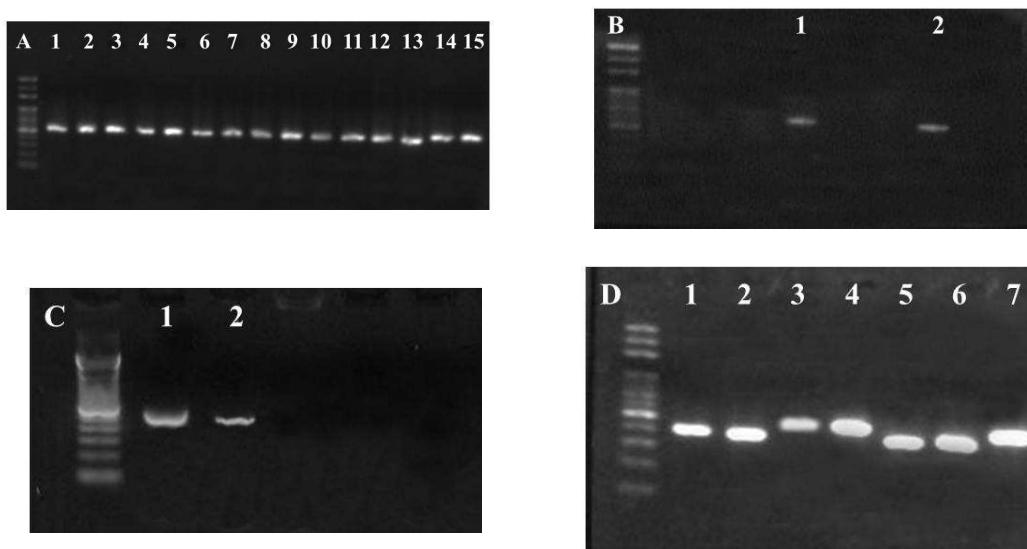


FIGURA 5. A - Amplificação espécie-específica com os primers Vert1/2 para *F. verticillioides* (578 pb), safra 2009; B - Sub1/2 para *F. subglutinans* (631 pb), safra 2009; C - Prol1/2 para *F. proliferatum* (585 pb), safra 2010 e D - Fg16F/R para *F. graminearum* sensu lato (450 pb), safra 2009. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

Quando comparados os critérios morfológicos e moleculares para a identificação das espécies, foram verificadas algumas discrepâncias, principalmente para as identificações de *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Também ocorreram discrepâncias entre a identificação de *F. verticillioides* e *F. graminearum*. Para os 304 isolados, 11,2% foram discordantes por esses critérios. Especificamente, 17 isolados da população regional 2009, 13 da regional 2010, sete da população Cruz Alta e cinco da população Veranópolis (Apêndice 1).

A provável causa dessas discrepâncias entre as análises morfológicas e a molecular no caso de *F. proliferatum* pode estar na dificuldade de avaliação da característica que a distingue de *F. verticillioides*. Já as identificações incorretas que ocorreram entre *F. verticillioides* e *F. graminearum* podem estar relacionadas à contaminação do meio de cultura ou por inexperiência do avaliador, acabaram sendo identificadas erroneamente.

A espécie dominante, *F. verticillioides*, foi observada em alta prevalência nas quatro populações, com destaque na população regional 2010. A PCR permitiu identificar quatro isolados de *F. subglutinans* na população regional 2009, observados nas amostras de Boa Vista das Missões e Bom Jesus (Apêndice 1). Dois isolados da população Cruz Alta foram identificados como *F. proliferatum*. Já para *F. graminearum*, 21 isolados foram identificados, sendo 17 na regional 2009 e quatro na população de Veranópolis (Tabela 6).

TABELA 6. Número e frequência (%) de espécies de *Fusarium* identificadas por PCR, em duas populações regionais e duas populações locais, obtidas de grãos de milho produzido no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

População	<i>Fusarium verticillioides</i>		<i>Fusarium proliferatum</i>		<i>Fusarium subglutinans</i>		<i>Fusarium graminearum</i>		NI*		Total
	n**	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
Regional 2008/09	75	78,1	0	0	4	4,2	17	17,7	0	0	96
Regional 2009/10	59	96,7	0	0	0	0	0	0	2	3,3	61
Cruz Alta	82	95,4	2	2,3	0	0	0	0	2	2,3	86
Veranópolis	48	78,7	0	0	0	0	4	6,6	9	14,8	61
Total	264	86,8	2	0,7	4	1,3	21	6,9	13	4,3	304

NI*- não identificados; n**- Número de isolados

Treze isolados (4,3% do total) não puderam ser identificados por PCR, sendo dois da população regional 2010, dois da população Cruz Alta e nove da população Veranópolis. A não identificação desses isolados por PCR pode ser devido ao pouco material de DNA extraído ou pela falta de especificidade dos *primers* utilizados para

determinadas populações do Brasil. Levando em consideração as características morfológicas, dos 13 isolados não identificados por PCR, sete foram identificados como *F. subglutinans*, quatro como *F. verticillioides*, um *F. proliferatum* e um *F. graminearum*.

A identificação morfológica é usualmente o primeiro passo para a identificação de fungos fitopatogênicos. Porém, em algumas espécies, como *Fusarium*, ela não pode ser conclusiva devido às diferenças morfológicas entre algumas espécies serem imperceptíveis ou não existirem (Leslie & Bowden, 2008). Segundo Leslie & Summerell (2006), identificações acuradas com base na morfologia para *Fusarium* exigem o crescimento dos mesmos em meios de cultura apropriados para o desenvolvimento das características morfológicas. O procedimento é lento, demanda tempo e nem sempre garante 100% de acerto nas identificações. Recentemente, em um trabalho na Argentina, Sampietro *et al.* (2010) tiveram uma incerteza em 30% das identificações morfológicas realizadas em nível de espécie para isolados do complexo *G. fujikuroi*, quando comparados os resultados com métodos moleculares.

Os resultados deste estudo concordam com os de Sampietro *et al.* (2010) e confirmam que apenas o critério morfológico para identificação pode ser inconclusivo para espécies do complexo *G. fujikuroi*, principalmente no que se refere a separação entre *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Assim, o uso da técnica de PCR para a identificação de espécies, quando se usa *primers* validados para as populações locais, torna-se um método útil, principalmente por ser eficiente e rápido.

Não se pode descartar que a falta de concordância entre a análise morfológica e molecular, no presente ou em outros estudos, além da identificação inacurada pelo critério morfológico, possa ser devida a inespecificidade dos *primers* para os isolados

do complexo *G. fujikuroi* do Brasil, uma vez que foram desenvolvidos com base em seqüências parciais do gene calmodulina de isolados italianos (Mulé *et al.*, 2004). Uma forma de investigar se a falta de amplificação com os primers utilizados se deve a falta de especificidade, seria primeiramente repetir as análises ou extrair novamente o DNA dos isolados, e usar outros critérios tais como o sequenciamento de DNA e análise de similaridade com sequencias de espécies conhecidas.

Em um estudo no Irã, Rahjoo *et al.* (2008) também relataram discordâncias entre a identificação morfológica e a molecular de *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Com base na identificação morfológica, 140 isolados de um total de 190, foram identificados como *F. verticillioides*, porém a identificação molecular confirmou apenas 133 isolados como pertencentes a essa espécie. Rahjoo *et al.* (2008) discutem que esse fato pode ser devido ao uso de *primers* que correspondem a seqüência genética de isolados da Europa e Estados Unidos, os quais poderiam diferir das populações do Irã.

Munkvold (2003), em recente revisão, comenta que o gênero *Fusarium* é muito comum na cultura do milho causando podridões em espiga e, historicamente, *F. moniliforme*, denominação anterior para *F. verticillioides*, é a espécie dominante associada à podridão da base da espiga, juntamente com *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, em mais baixa freqüência. Sánchez-Rangel *et al.* (2005) coletaram 2000 amostras de milho nos anos de 1999 e 2000 nas regiões Noroeste e Centro do México, oriundas diretamente do campo ou de supermercados e constataram que 80,6% dos 67 isolados foram identificados como *F. verticillioides* e apenas 3% como *F. subglutinans*.

Na Argentina espécies do complexo *G. fujikuroi*, principalmente *F. verticillioides* e espécies do complexo *F. graminearum* tem sido frequentemente

isoladas de grãos de milho (Chulze *et al.*, 1996; Presello *et al.*, 2008;). Sampietro *et al.* (2010) analisaram grãos de milho, sorgo e trigo durante 2007 e 2008 coletados em Córdoba, Buenos Aires, província de Santa Fé, Santiago Del Estero e província de Tucuman. De 28 isolados do milho, 14 foram identificados com base na PCR, como *F. verticillioides*, quatro como *F. proliferatum* e nove como *F. graminearum*.

No Brasil ainda são escassos os trabalhos na literatura com identificações moleculares para isolados de *Fusarium* em milho. A baixa incidência de *F. proliferatum* e *F. subglutinans* pode ser devido às condições climáticas menos favoráveis para essas espécies (Munkvold & Desjardins, 1997). Devido à grande extensão territorial do Brasil, a produção de milho ocorre em regiões e climas diferentes. No Rio Grande do Sul, por exemplo, as condições de maior umidade e temperaturas amenas podem favorecer a ocorrência de *F. graminearum*, o que foi notado nesse trabalho em que amostras de regiões de maior altitude e clima mais ameno como a região nordeste do RS apresentaram-se infectadas com *F. graminearum*.

Um dos primeiros trabalhos no Brasil usando métodos moleculares para identificar *Fusarium* spp. em milho foi a dissertação de Ottoni (2008) que usou *primers* para *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* na análise de 197 isolados de diferentes regiões do Brasil. Os isolados foram retirados de 100 amostras de grãos, sendo 162 (82%) isolados identificados como *F. verticillioides*, seis como *F. subglutinans* e nenhum como *F. proliferatum*.

Em outro trabalho, do mesmo grupo de pesquisa, Querales (2010) avaliou 18 amostras de sementes de híbridos de milho coletadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, safras de 2001 a 2006. Dessas amostras, 100 isolados foram recuperados e identificados por PCR

usando *primers* específico para as três espécies do complexo *G. fujikuroi*. Noventa e três isolados foram identificados como *F. verticillioides*, quatro como *F. proliferatum*, dois *F. subglutinans* e um isolado não amplificou em nenhum dos *primers*. Os resultados desse trabalho, portanto, confirmam os resultados obtidos por Ottoni (2008) e Querales (2010) que mostram *F. verticillioides* como a espécie predominante no milho cultivado no Brasil, principalmente nas regiões mais centrais do país.

Esse e outros trabalhos reforçam a importância do uso de diferentes critérios para a identificação acurada de espécies de *Fusarium* associados aos grãos de milho, principalmente para aquelas pertencentes ao complexo *G. fujikuroi*. Assim, o método molecular pode ser decisivo para a discriminação das espécies desse complexo. Outras técnicas mais refinadas, como sequenciamento de genes e marcadores moleculares, podem ser utilizadas para identificar as espécies com base em similares de sequências ou agrupar isolados com espécies conhecidas que podem estar ocorrendo e que não dispõe de *primers* específicos. No trabalho de Sampietro *et al.* (2010) desenvolvido na Argentina foram identificados isolados de *F. boothii* e *F. meridionale* associados a grãos de milho, espécies do complexo *F. graminearum* as quais não podem ser separadas por critérios morfológicos uma vez que não há diferenças perceptíveis entre essas. Nesse caso os autores utilizaram métodos moleculares para embasar as identificações das espécies do complexo *F. graminearum*.

No presente trabalho, o primer utilizado permite identificar *F. graminearum* *sensu lato*, ou seja, apenas confirma que o isolado pertence ao complexo mas não permite uma separação entre as espécies do complexo, também chamadas de linhagens, segundo O'Donnell *et al.* (2004). No entanto, no trabalho de Scoz *et al.*

(2009), o uso do primer Fg16F/R, que é polimórfico, ou seja, amplifica produtos de diferentes tamanhos, os autores notaram que os produtos de 490bp e 450bp correspondiam às linhagens 2 (ou *F. meridionale*) e 7 (*F. graminearum* sensu stricto), respectivamente. O mesmo polimorfismo foi observado no presente trabalho (Figura 5D), levando a sugerir que pelo menos duas linhagens do complexo podem estar presentes. Considerando a proximidade geográfica e semelhança de clima com a região noroeste da Argentina onde foram encontrados *F. meridionale* em grãos de milho, é provável que se tenha inclusive maior variabilidade no Brasil. Trabalhos futuros utilizando sequenciamento de DNA ou primers específicos para as espécies do complexo *F. graminearum*, permitirão afirmar com segurança quais as linhagens ocorrem no milho.

4.3 Detecção dos genes codificantes de toxinas em *Fusarium* spp.

Para o número total de 264 isolados das quatro populações identificados como *F. verticillioides*, 234 apresentaram-se positivas para o gene FUM+ (Figura 6C). Entre as populações, a população regional 2010 foi a que apresentou maior número de isolados com gene FUM+ (Tabela 7).

Dos 21 isolados identificados como *F. graminearum* nas quatro populações, oito apresentaram o genótipo NIV, um o 3-ADON e três o 15-ADON (Figura 6A e B). Dois isolados 15-ADON foram oriundos de uma amostra de Vacaria e um de amostra do Capão do Leão. O isolado 3-ADON foi oriundo de Vacaria (Apêndice 1).

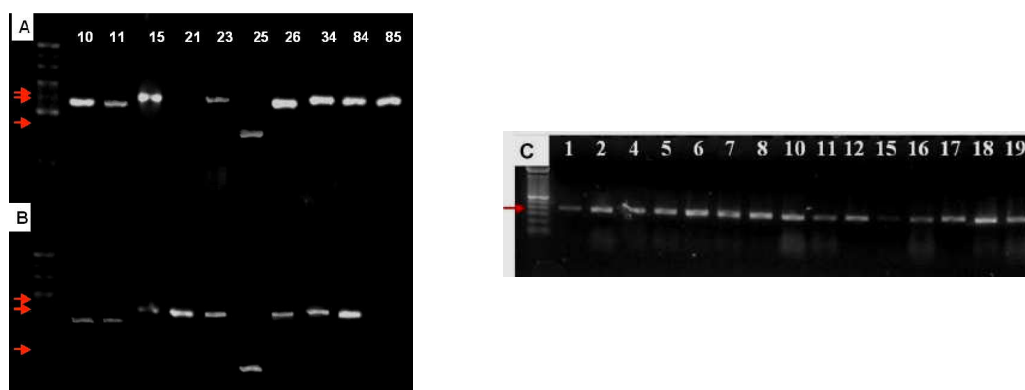


FIGURA 6. A - Amplificação Multiplex-PCR *Tri3* para determinar 3-ADON (243 pb), 15-ADON (610 pb) e NIV (840 pb); B - Multiplex-PCR *Tri12* para determinar 3-ADON (410 pb), 15-ADON (670 pb) e NIV (840 pb) e C - gene codificante FUM53R/F para fumonisina (354 pb). Todos os isolados são da safra 2009. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

TABELA 7. Genótipo toxigênico, em número e frequência, para isolados de *Fusarium* spp. em quatro populações do estado do Rio Grande do Sul – Brasil.

População	<i>Fusarium verticillioides</i>		<i>Fusarium graminearum</i>				Total		
	FUM+		NIV		3-ADON		15-ADON		
	N*	%	N*	%	N*	%	N*	%	
Regional 2009	61	63,50	7	7,30	1	1	3	3,10	72
Regional 2010	69	98,6	1	1,4	0	0	0	0	70
Cruz Alta	64	100	0	0	0	0	0	0	64
Veranópolis	40	100	0	0	0	0	0	0	40
Total	234	95,12	8	3,25	1	0,40	3	1,23	246

N*- Número de isolados

A presença do gene FUM+ foi observada em isolados de *F. verticillioides* retirados de grãos assintomáticos, o que sugere a contaminação com fumonisina em grãos aparentemente saudáveis. Patiño *et al.* (2004) identificaram por PCR a espécie *F. verticillioides* e o gene FUM+ em 54 isolados de diversas culturas, incluindo-se o milho, de diversos países. Desses, 36 foram positivos para o gene da fumonisina, sendo 31 isolados do milho.

Otoni (2008) analisou, pela primeira vez no Brasil, isolados de *Fusarium* quanto à presença do gene codificante de fumonisina com base no gene FUM5. No

estudo foram avaliados grãos ardidos de 100 amostras de milho provenientes da safra normal e safrinha dos anos de 2006 e 2007, obtidas em Cooperativas das regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do País. A frequência dos isolados que tiveram a identificação positiva para o gene codificante de fumonisina variou entre safras e anos. Na safra normal de 2006 a frequência de isolados contendo o gene FUM5 foi de 80% em 51 isolados avaliados e na safrinha do mesmo ano foi de 53% dos 15 isolados. No ano de 2007, na safra normal a frequência foi de 72% em 71 isolados analisados e 93% de 30 isolados na segunda safra.

Na Argentina, Sampietro *et al.* (2010) detectaram o gene FUM1, preditivo da fumonisina em 23 isolados *G. fujikuroi* e *Tri13/Tri7* para identificar os genótipos tricotecenos (DON e NIV) em 10 isolados *F. graminearum* obtidos de amostras de grãos de milho, sorgo e trigo. Dos 23 isolados *G. fujikuroi*, 18 possuíam o gene FUM1, e dos 10 de *F. graminearum*, 6 foram identificados como genótipo DON e 3 como genótipo NIV. Os isolados do complexo *F. graminearum* com genótipo NIV foram identificados como *F. boothii* e *F. meridionale*, espécies filogenéticas detectadas pela primeira vez na região subtropical da Argentina. Já os isolados DON foram identificados como *F. graminearum* sensu stricto (linhagem 7). Esses resultados levaram os autores à hipótese de que a produção de DON ocorre em locais onde há predominância de *F. graminearum* sensu stricto que apresentaram genótipo DON.

Em um estudo recente no Nepal, Desjardins & Proctor (2010), analisando 251 isolados de *Fusarium* obtidos de amostras de milho do Nepal observaram uma maior frequência de genótipos NIV, sendo estes identificados como *F. meridionale* e *F. asiaticum*, sendo que *F. graminearum* sensu stricto não foi identificado.

Os resultados de Desjardins & Proctor (2010) contrastam com aqueles de outros países como os Estados Unidos, Europa e Coréia, onde há dominância de *F. graminearum* sensu stricto e a maioria dos isolados são produtores de DON (Tanaka *et al.*, 1988; Ryu *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 2008).

Na Coréia do Sul, populações do complexo *F. graminearum* isoladas a partir de grãos de milho sintomáticos também demonstraram correspondência entre a linhagem e o quimiotipo, sendo que *F. graminearum* sensu stricto consistia apenas de produtores de DON e *F. asiaticum* de NIV (Jeon *et al.*, 2003). Esse padrão foi também observado em populações do Japão, onde isolados de *F. asiaticum* produziram quase que exclusivamente NIV enquanto que *F. graminearum* sensu stricto produziram DON (Suga *et al.*, 2008).

No Brasil, em estudos prévios com um pequeno número de isolados de soja observou-se a presença de múltiplas linhagens ou espécies filogenéticas do complexo *F. graminearum*, como *F. austroamericanum*, *F. meridionale* e *F. cortaderiae*, sendo as duas últimas produtoras de NIV. De maneira mais ampla, em 82 isolados, Scoz *et al.* (2009) evidenciaram, por meio de seqüenciamento de quatro genes, a presença de *F. graminearum* sensu stricto, como a espécie dominante no trigo, seguido de *F. meridionale*. Quando da identificação dos genótipos tricotecenos, DON e NIV, corresponderam consistentemente à *F. graminearum* stricto sensu e *F. meridionale*, respectivamente. Aquele foi o primeiro relato detalhado da diversidade de genótipos produtores de tricotecenos do Brasil para membros do complexo *F. graminearum* sugerido por O'Donnell *et al.* (2004) a partir da análise de isolados provenientes de diversas regiões produtoras de trigo em três estados do sul do Brasil.

No presente trabalho, de maneira similar a outros trabalhos com isolados do milho, constatou-se a dominância de isolados NIV, o que pode reforçar a hipótese de

que outras linhagens do complexo que não a linhagem 7 (*F. graminearum* stricto sensu) são dominantes em milho no Brasil.

Esses dados reforçam a importância do monitoramento de outros tricotecenos sintetizados por *F. graminearum* além de DON que é mais comumente analisado em levantamentos de ocorrência de micotoxinas. Segundo Desjardins (2006), a alta frequência de contaminação de grãos e alimentos com NIV é preocupante, pois esse provou ser mais tóxico que DON. Além disso, o conhecimento da variabilidade genética é importante para orientar estratégias de melhoramento vegetal que visam à resistência aos patógenos e o acúmulo de toxinas (Konietzny & Greiner, 2003; Logrieco *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2005).

Uma vez confirmada a dominância, ou mesmo especificidade de linhagens do complexo *F. graminearum* produtoras de NIV em milho no Brasil sugere-se que se deve analisar essa toxina em estudos de levantamentos de micotoxinas, principalmente para amostras oriundas de regiões onde *F. graminearum* é mais comum.

4.4 Caracterização fisiológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp.

Os resultados da avaliação de características fisiológicas e patogênicas dos 12 isolados são apresentados na sequência seguindo duas abordagens de análise, a univariada, com a verificação da significância do efeito de grupos previamente determinados sobre cada variável. Em seguida, análise multivariada foi usada para sintetizar os resultados de todas as variáveis tomadas em conjunto, que permitiu agrupar os isolados. São apresentados primeiramente os resultados de cada abordagem e, ao final, a discussão conjunta dos resultados.

4.4.1 Análises univariadas

Segundo a análise de *deviance* houve diferença significativa ($P < 0,0001$) quando da comparação individual dos isolados para todas as variáveis analisadas, ou seja, duas relacionadas com características fisiológicas (taxa de crescimento micelial e sensibilidade a fungicida tebuconazole) e quatro com características patogênicas (eficiência de infecção de sementes, redução da viabilidade de sementes, redução da emergência de plântulas e agressividade em colmos) (Tabela 8).

TABELA 8. Análise de *deviance* e significância das causas de variação quando da comparação individual de 12 isolados, ou quando esses foram agrupados segundo a espécie - *Fusarium verticillioides* (6 isolados) ou *F. graminearum* (6 isolados) - ou segundo dois genótipos tricotecenos em *F. graminearum* (*Fg*)- 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) ou nivalenol (4 isolados).

Nome da variável	Isolados	Agrupamentos	
		Espécie	Genótipo tricoteceno <i>Fg</i>
Taxa de crescimento micelial	<0,0001	<0,0001	<0,0001
DL50 tebuconazole	nd ^x	nd	<0,0001
Eficiência de infecção de sementes	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Redução da viabilidade de sementes	<0,0001	0,764	0,001
Redução de emergência de plântulas	<0,0001	0,011	0,015
Agressividade em colmos	<0,0001	0,071	<0,0001

^xNão determinado devido ao fato da DL50 dos isolados de *F. verticillioides* ter sido <0,01.

Quando da comparação dos isolados agrupados segundo a espécie, ou seja, *F. verticillioides* comparado ao *F. graminearum*, os grupos não se diferenciaram ($P > 0,05$) apenas na redução da viabilidade de sementes e agressividade em colmos (Tabela 8). Já para os seis isolados de *F. graminearum*, agrupados segundo o genótipo tricoteceno (15-ADON e NIV), esses grupos não diferiram estatisticamente apenas para a variável redução da emergência (Tabela 8).

Na tabela 9 são apresentados os valores médios de cada isolado para cada variável analisada. Optou-se por não discriminar os isolados individualmente para cada variável, mas sim compará-los nos agrupamentos previamente determinados.

Nesse caso, todos os isolados de uma espécie foram comparados com o de outra espécie de *Fusarium*. Da mesma forma, os seis isolados de *F. graminearum* foram agrupados segundo os genótipos tricotecenos para então compará-los. Na sequência, são apresentados os resultados dessa análise comparativa para cada variável analisada.

TABELA 9. Valores médios dos 12 isolados para as variáveis: taxa de crescimento micelial (TCM), DL50, eficiência de infecção e redução da viabilidade de sementes (%), redução da emergência de plântulas (%) e tamanho de lesão no colmo de plantas de milho (híbrido Pioneer 30F53) inoculadas com tais isolados.

Isolados ^x	Variáveis					Agressividade (mm)
	Fisiológicas		Patogênicas			
	Taxa crescimento micelial (mm/dia)	DL50 tebuconazole	Eficiência de infecção (%)	Redução (%) ^y		
			Viabilidade	Emergência		
01Fv	8,1	<0,01	8,0	86,2	71,3	2,0
02Fv	8,6	<0,01	0,0	68,4	66,5	1,4
03Fv	8,6	<0,01	0,0	58,8	67,0	1,1
04Fv	8,6	<0,01	1,0	61,4	47,5	1,4
05Fv	9,6	<0,01	0,0	82,8	76,0	2,4
06Fv	7,5	<0,01	0,0	46,0	53,2	1,6
07FgNiv	15,5	0,04	90,0	79,6	88,4	1,1
08FgNiv	15,4	0,04	43,0	57,6	95,2	8,3
09FgNiv	15,9	0,02	12,0	88,5	52,3	2,3
10FgNiv	10,6	0,06	91,0	93,2	100,0	2,1
11Fg15A	16,0	0,23	51,0	63,2	81,0	2,1
12Fg15A	16,0	0,33	24,0	83,5	100,0	1,4
C.V. (%)	31,32	16,6	31,8	39,2	61,3	52,7
Média	11,73	0,06	26,6	72,4	74,9	2,3

^x Fv = *F. verticillioides*; Fg = *F. graminearum*; FgNiv = genótipo tricoteceno nivalenol; Fg15A = genótipo tricoteceno 15-ADON.

^yRedução estimada pela fórmula $R(\%) = [(test. - isolado)/test.] * 100$, onde: test. = germinação ou emergência da testemunha (sem inoculação).

4.4.1.1 Taxa de crescimento micelial

Os seis isolados de *F. verticillioides* apresentaram taxa média de crescimento micelial (TCM) de 8,5 mm/dia, variando de 7 a 10 mm/dia, sendo esse valor inferior à média de TCM de *F. graminearum* (15 mm/dia) (Figura 7A). Dentre os isolados de *F. graminearum* houve maior variação na taxa de crescimento micelial em função do

genótipo tricoteceno (Figura 7B). Os dois isolados 15-ADON apresentaram os maiores valores médios de TCM (16 mm/dia), seguido dos isolados NIV, com média de 14,4 mm/dia e variação de 10 a 16 mm/dia (Figura 7B).

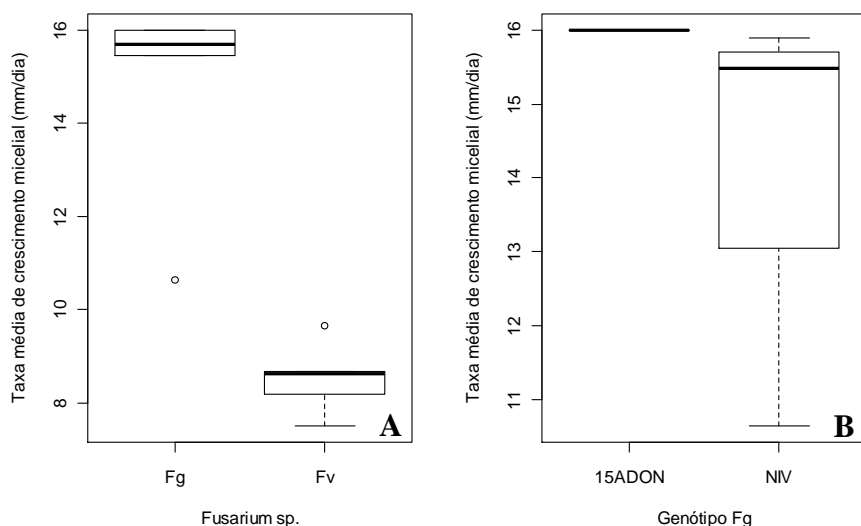


FIGURA 7. Taxa de crescimento micelial média (mm/dia) para grupos de isolados por espécies: *F. verticillioides* (6 isolados) e *F. graminearum* (6 isolados) (A) ou para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum* (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartilico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

4.4.1.2 Sensibilidade a fungicida

Os seis isolados de *F. verticillioides* tiveram seu crescimento completamente inibido já a partir da menor dose avaliada de tebuconazole (0,01 ppm), não permitindo estimar por regressão linear a DL50 (Tabela 9; Figura 8A e C).

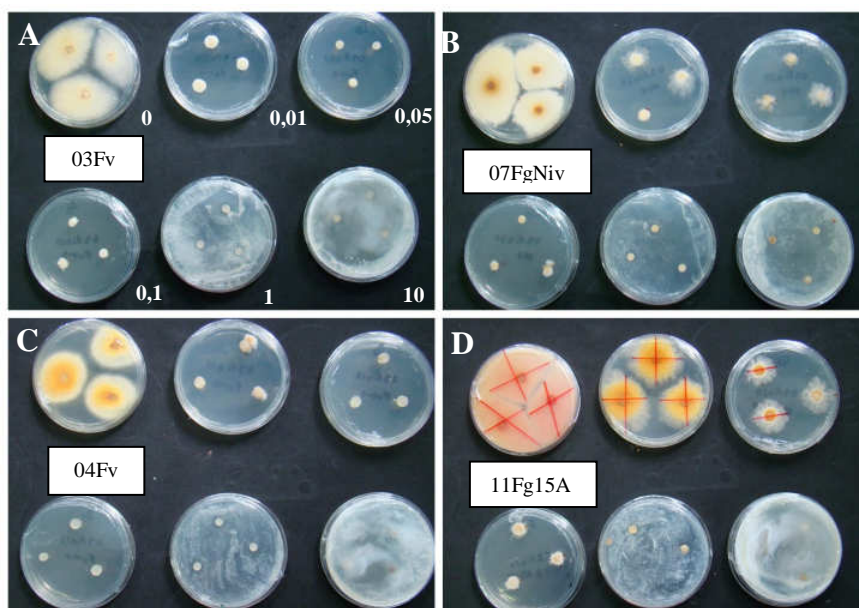


FIGURA 8. Doses (ppm) de tebuconazole em teste de sensibilidade para dois isolados de *Fusarium verticillioides* (A e C) e dois de *F. graminearum* apresentando genótipo Nivalenol (B) e 15-acetildesoxinivalenol (D). Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

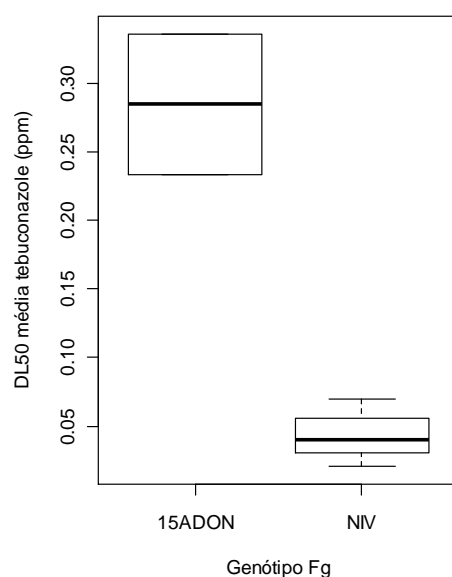


FIGURA 9. Dose inibidora média (DL50) de tebuconazole para o crescimento fúngico de isolados para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum*. No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartílico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

Para os isolados de *F. graminearum* houve variação na DL50 ao fungicida em função do genótipo tricotecenos, com média de DL50 de 0,10 ppm, variando de 0,02 a 0,33 ppm. Especificamente, os quatro isolados NIV apresentaram-se mais sensíveis, mostrado pelos menores valores de DL50, com média para cada isolado variando de 0,02 a 0,06 ppm (Tabela 9; Figura 9). Por outro lado, os dois isolados 15-ADON apresentaram-se menos sensíveis, com DL50 de aproximadamente dez vezes superior aos isolados NIV, variando de ~0,25 a 0,33 ppm (Figura 9).

4.4.1.3 Eficiência de infecção de sementes

Das avaliações temporais de incidência de *Fusarium* spp., realizadas após a incubação em substrato de papel das sementes de milho infectadas artificialmente por restrição hídrica, e discriminadas por classe de colonização, apenas em dois dias de incubação foi possível observar uma nítida diferença entre as classes de infecção. A partir do sexto dia, entretanto, todas as sementes se apresentaram igualmente colonizadas (na classe alta) indiferente do isolado inoculado (Figura 10).

Na testemunha não inoculada, até o último dia da avaliação, não se detectou colônias de *Fusarium* spp., mostrando que a desinfestação superficial seguido de tratamento térmico foi eficiente na erradicação dos fungos presentes no lote de sementes (Figura 11A e C).

Dessa forma, a variável denominada “eficiência de infecção de sementes” foi baseada na avaliação da incidência de sementes na classe 3 (alta infecção) no segundo dia de avaliação, sendo esta indicativa da agressividade dos isolados, resultando em maior ou menor potencial de inóculo gerado na semente, sendo que as sementes permaneceram por mesmo período (5 dias) em contato com os isolados.

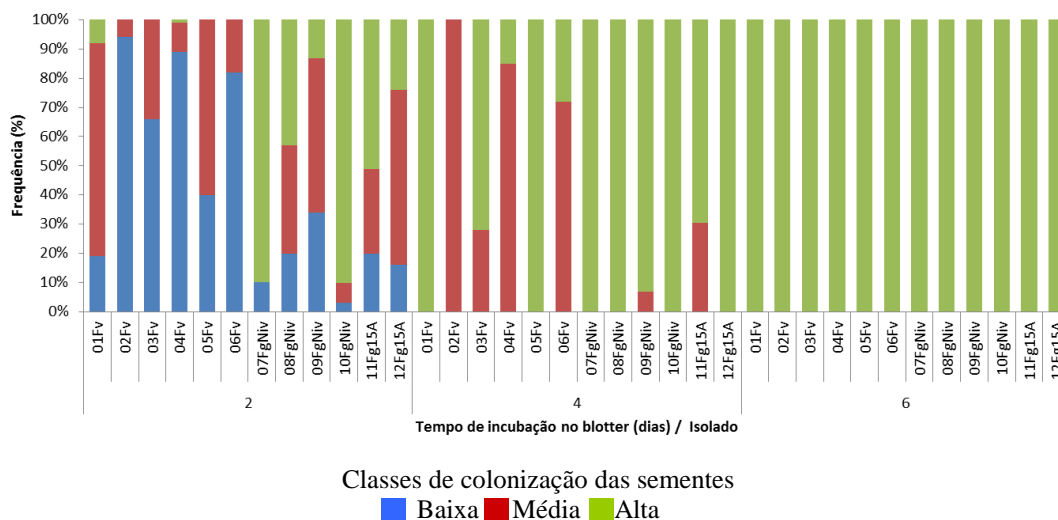


FIGURA 10. Frequências de classes de colonização de sementes de milho observada em teste do papel de filtro aos 2, 4 e 6 dias de incubação de sementes de milho inoculadas artificialmente com seis isolados de *Fusarium verticillioides* (01Fv, 02Fv, 03Fv, 04Fv, 05Fv e 06Fv) e seis isolados de *F. graminearum* (07FgNiv, 08FgNiv, 09FgNiv, 10FgNiv, 11Fg15A, 12Fg15A), por meio da técnica da restrição hídrica, sendo mantidas por cinco dias em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de luz. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

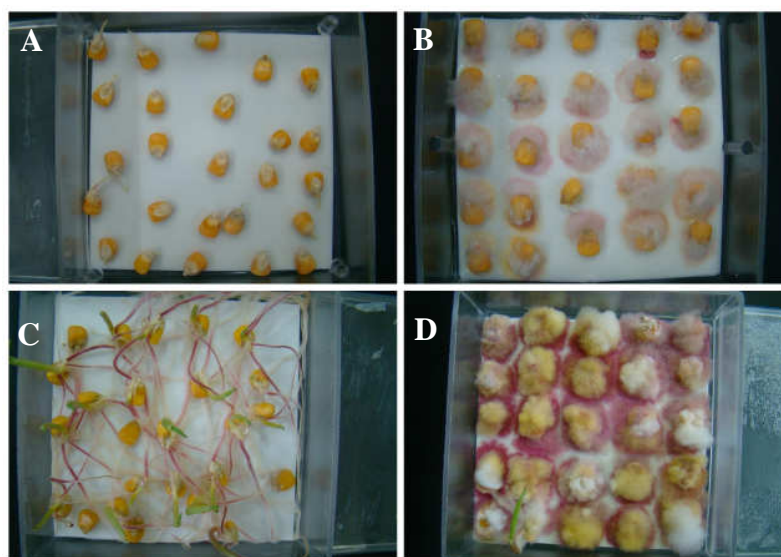


FIGURA 11. Ensaio de detecção de fungo em substrato de papel com sementes de milho, híbrido Pioneer 30F53, tratadas com termoterapia e não inoculadas (testemunha) no segundo (A) e no sexto dia (C) de incubação e com sementes inoculadas com *Fusarium verticillioides* no segundo dia de incubação (B) e *F. graminearum* no sexto dia de incubação (D) usando a técnica da restrição hídrica. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

Os seis isolados de *F. verticillioides* apresentaram média de eficiência de infecção de sementes de 1,8%, valor bastante inferior ao observado para os isolados de *F. graminearum* que apresentaram média de 44,4%, com variação de 10 a 100% (Figura 12A).

Quando comparados os grupos dentro de *F. graminearum*, os isolados NIV apresentaram a mais alta eficiência de infecção (100%) dentre os genótipos tricotecenos, porém com alta variação entre os isolados desse grupo (Figura 12B). Por exemplo, os dois isolados 15-ADON apresentaram média de 37,5% de eficiência de infecção (Figura 12B).

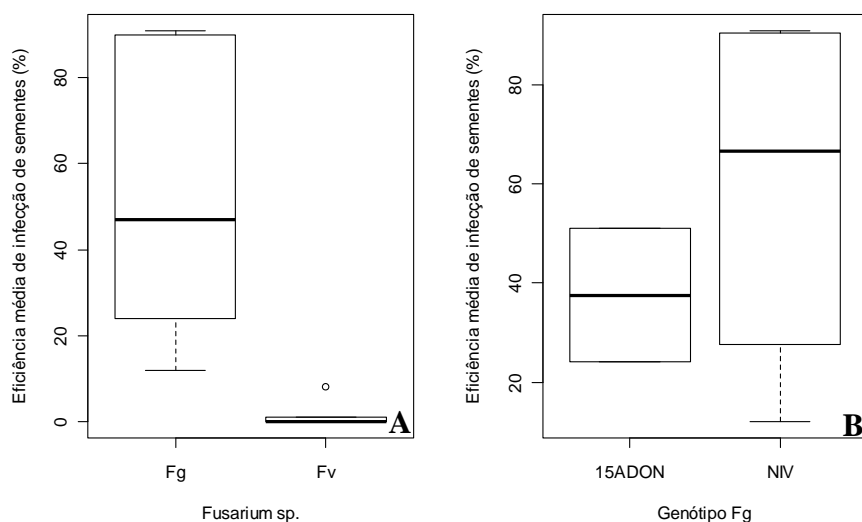


FIGURA 12. Eficiência média de infecção (incidência de sementes na classe mais alta de infecção - semente totalmente colonizada no segundo dia de incubação) de sementes de milho (híbrido Pioneer 30F53) - por isolados agrupados por espécies: *F. verticillioides* (6 isolados) e *F. graminearum* (6 isolados) (A) ou agrupados em dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum* (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartílico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

4.4.1.4 Redução da viabilidade de sementes

Na testemunha não inoculada, a viabilidade média foi de 86%. Conforme evidenciado pela análise de *Deviance*, os isolados agrupados segundo a espécie não se diferenciaram quanto à capacidade de afetar negativamente a viabilidade das sementes inoculadas com os mesmos, apresentando média geral de 72,5% de redução da viabilidade em relação à testemunha não inoculada. A maior amplitude de variação foi observada entre os isolados de *F. verticillioides* (50 a 85%) (Figura 13A).

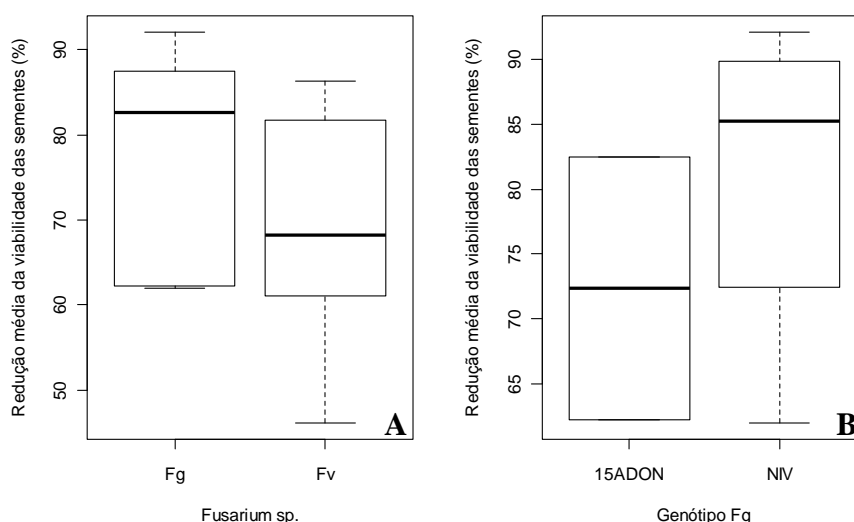


FIGURA 13. Redução média da viabilidade de sementes de milho (híbrido Pioneer 30F53), em relação à testemunha não inoculada, quando inoculadas com isolados agrupados por espécies: *F. verticillioides* (6 isolados) e *F. graminearum* (6 isolados) (A) ou para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum* (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartil (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

Dentre os isolados *F. graminearum*, a maior redução foi promovida pelos isolados do genótipo NIV (média de 80%), seguido de 15-ADON (73,4%) (Figura 13B). Para os quatro isolados NIV, foi observada maior amplitude de variação, de 35 a 100%, seguido de 15-ADON com valores entre 50 e 95%.

4.4.1.5 Redução da emergência de plântulas

Na testemunha, a média de emergência de plântulas foi de 88%. Os seis isolados de *F. verticillioides* reduziram a emergência em média 65,71%, valor inferior ao observado nos isolados de *F. graminearum* que apresentaram 50% dos valores de redução entre 70 e 100%. Dentro de cada espécie a amplitude de variação foi semelhante, com valores situando-se entre 30 e 100% (Figura 14A).

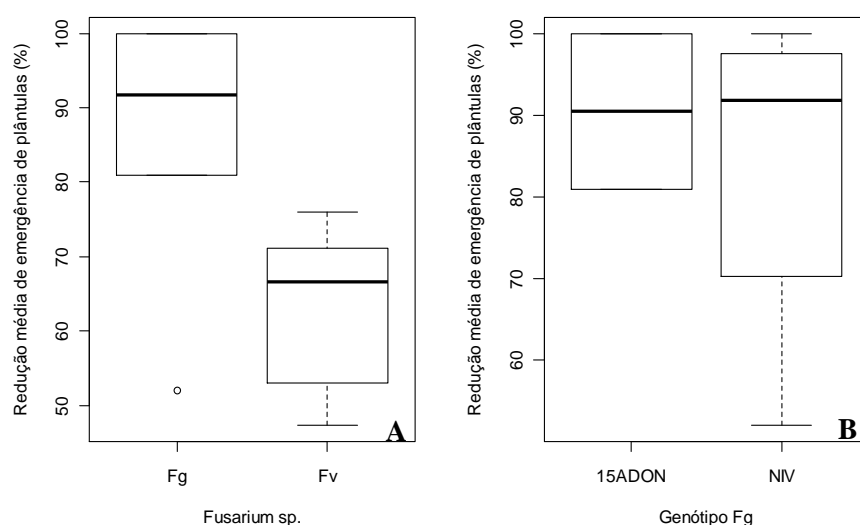


FIGURA 14. Redução média da emergência de plântulas de milho (híbrido Pioneer 30F53), em relação à testemunha não inoculada, quando inoculadas com isolados agrupados por espécies: *F. verticillioides* (6 isolados) e *F. graminearum* (6 isolados) (A) ou para dois genótipos tricotecenos: 15-acetildesoxinivalenol (2 isolados) e nivalenol (4 isolados) dentro de *F. graminearum* (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartilico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa à mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

Entre os isolados de *F. graminearum*, as maiores reduções de viabilidade foram promovidas pelos isolados NIV e 15-ADON, com valores acima de 70%, com exceção de um isolado NIV, evidenciado pela cauda inferior da distribuição (Figura 14B).

4.4.1.6 Agressividade em colmos

Todos os isolados mostraram-se patogênicos com variações na agressividade determinada pelo comprimento das lesões, as quais predominantemente se situaram acima do ponto de inoculação. A média geral do comprimento das lesões foi de 2,3 cm, com variação de 1,16 a 8,30 cm entre os 12 isolados avaliados.



FIGURA 15. Teste de agressividade em colmos de milho (híbrido Pioneer 30F53): Testemunhas (A), inoculação com palitos, de plantas com 20 dias, com isolados de *Fusarium* (B, C e D). Tamanho de lesão em colmo de milho inoculado com o isolado 07FgNiv da espécie *Fusarium graminearum* com genótipo tricoteceno nivalenol (E e F). Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

Na comparação das espécies, *F. verticillioides* induziu tamanho médio de lesões igual a 1,65 cm, enquanto que para os isolados de *F. graminearum* este valor foi de 2,88 cm, mostrando uma mais alta agressividade (Figura 16A). O isolado 08FgNiv, de *F. graminearum*, foi o que apresentou maior tamanho médio de lesão (8,3 cm) (Tabela 9; Figura 15E e F), enquanto que o isolado 07FgNIV, apresentou

média de 1,1 cm, destacando a grande variação dentro desse grupo de isolados (Figura 16B). Já os demais genótipos tricotecenos induziram lesões variando de 1,4 a 2,3 cm de comprimento.

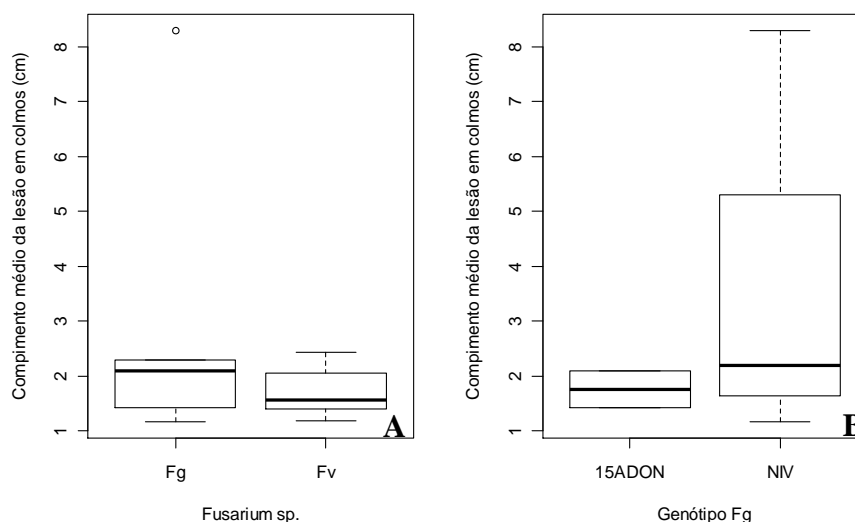


FIGURA 16. Comprimento da lesão em colmos de plantas de milho (híbrido Pioneer 30F53) de 30 dias, inoculadas aos 20 dias após o plantio, com isolados *Fusarium verticillioides* (6 isolados x 5 repetições) e *F. graminearum* (6 x 5) (A) e de isolados *F. graminearum* agrupados segundo genótipos tricotecenos 15-acetildesoxinivalenol (2 x 5) e nivalenol (4 x 5) (B). No diagrama de caixas, o retângulo representa o intervalo interquartílico (50% dos dados), a linha dentro do retângulo representa a mediana e as linhas tracejadas e os pontos (valores discrepantes) acima e abaixo da caixa, representam os 50% restantes da distribuição. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

4.4.2 Análise multivariada

A análise de componentes principais (ACP) e a análise de agrupamentos permitiram a identificação de algumas variáveis, dentre todas avaliadas, que caracterizaram os isolados e os classificaram levando em consideração todas as características mensuradas. A ACP mostrou que os dois primeiros eixos (CP1 e CP2) descreveram 65,92% da variância total, com os autovalores dos respectivos componentes superiores a 1, o que permitiu simplificar os resultados em dois eixos (ou dois componentes principais) (Tabela 10). Um terceiro eixo, representado pela

DL50 ao fungicida tebuconazole explicou 16,77% da variância total, mas, no entanto, por não apresentar autovetor superior a 1 e por dificultar a observação dos agrupamentos, não foi utilizado na representação dos eixos principais (dados não apresentados), mantendo-se apenas os dois primeiros componentes.

TABELA 10. Análise de componentes principais para variáveis que representam características fisiológicas e patogênicas em um grupo de doze isolados fúngicos, sendo seis de *Fusarium verticillioides* e seis de *Fusarium graminearum*.

Variável ^y		CP ₁ ^x	CP ₂
	Autovalores	2,727	1,22
	% Variância	45,45	20,47
TCM	Taxa de crescimento micelial (mm/dia)	0,467 ^z	-0,176
DL50	DL50 tebuconazole	0,429	-0,058
EIS	Eficiência de infecção de sementes (%)	0,486	0,126
RVS	Redução da viabilidade de sementes (%)	0,258	0,661
REMER	Redução de emergência de plântulas (%)	0,516	-0,002
TLC	Agressividade em colmos (mm)	0,177	-0,716

TCM – Taxa de crescimento micelial; EIS – Eficiência de infecção de sementes; RVS – Redução relativa da viabilidade de sementes; REMER – Redução relativa da emergência de plântulas; TLC – Tamanho da lesão no colmo e DL50 teb – Dose letal 50 de tebuconazole.

^yAutovalores e variância associados aos componentes;

^xComponentes principais;

^zAutovetores das variáveis de caracterização dos isolados de *Fusarium* spp. onde as variáveis em negrito correspondem a 45,45% e a 20,47% da variância dos descritores originais dos dois primeiros componentes, respectivamente.

Os maiores autovalores para o componente 1 e 2 (0,516 e - 0,716) foram determinados para as variáveis redução da viabilidade das sementes e tamanho de lesão no colmo, respectivamente (Tabela 10). Além dos maiores autovetores, a correlação significativa com os respectivos eixos (Tabela 10 e Figura 17A), indica que essas duas variáveis podem ser utilizadas na caracterização dos isolados (Tabela 11). A correlação significativa ($P < 0,05$) entre algumas variáveis, como a TCM e DL50 Teb ($r = 0,64$) (Tabela 11), indica colinearidade entre as variáveis, justificando o uso da análise multivariada.

Tendo-se uma correlação positiva entre CP1 e a redução de viabilidade das sementes e correlação negativa entre CP2 e tamanho de lesão no colmo, na Figura 17B os isolados posicionados à direita do eixo y determinaram alta redução na viabilidade e, aqueles posicionados abaixo do eixo x, maiores valores de tamanho de lesão em colmos (Figura 17B).

TABELA 11. Coeficiente de correlação entre as variáveis e componentes principais da caracterização fisiológica e patogênica em um grupo de doze isolados, sendo seis de *Fusarium verticillioides* e seis de *Fusarium graminearum*.

Variáveis*	CP ₁	CP ₂	CP ₃	TCM	EIS	RVS	REMER	TLC	DL50 teb
CP ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCM	0,77	-0,19	0,36	-	-	-	-	-	-
EIS	0,80	0,14	-	0,44	-	-	-	-	-
RVS	0,43	-0,31	-	0,21	0,35	-	-	-	-
REMER	0,85	-0,01	-	0,40	0,71	0,38	-	-	-
TLC	0,28	-0,79	-	0,27	0,14	-0,21	0,34	-	-
DL50 teb	0,71	-0,06	0,64	0,67**	0,36	0,05	0,48	-0,04	-

*Variáveis: CP₁, CP₂ e CP₃ – componentes principais 1, 2 e 3; TCM – Taxa de crescimento micelial; EIS – Eficiência de infecção de sementes; RVS – Redução relativa da viabilidade de sementes; REMER – Redução relativa da emergência de plântulas; TLC – Tamanho da lesão no colmo e DL50 teb – Dose letal 50 de tebuconazole.

**Coeficientes de correlação linear de *Pearson* entre as variáveis de caracterização dos isolados de *Fusarium spp.* e componentes principais. Valores em negrito correspondem a correlações significativas ($P < 0,05$).

Associada a esta ordenação, a análise de agrupamento identificou três grupos nítidos. No primeiro, todos os isolados de *F. verticillioides* foram agrupados num único grupo, onde também se inclui um isolado NIV. O segundo grupo foi composto por dois isolados NIV. Finalmente, em um terceiro grupo, um isolado NIV e os dois isolados 15-ADON (Figura 17B). Os grupos formados sumarizam e destacam a maior uniformidade observada entre os isolados de *F. verticillioides* e a grande

heterogeneidade entre os isolados de *F. graminearum*, que teve representantes em cada um dos grupos formados.

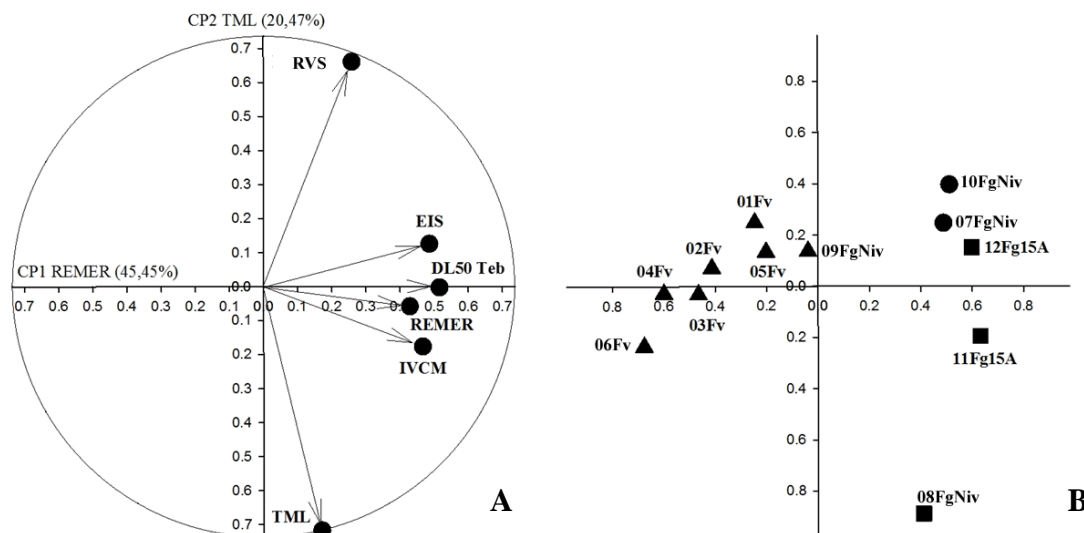


FIGURA 17. Ordenação das variáveis de caracterização fisiológica e patogênica, onde TCM – taxa de crescimento micelial; EIS – eficiência de infecção de sementes; RVS - redução da viabilidade de sementes; REMER – redução da emergência de plântulas; TLC – tamanho da lesão no colmo e DL50 teb – dose de tebuconazole (A); agrupamento de 12 isolados, sendo seis de *Fusarium verticillioides* (Fv) e seis de *F. graminearum* (Fg) representantes de dois genótipos tricotecenos (B). Cada símbolo geométrico em B identifica um agrupamento. Laboratório de Epidemiologia de Plantas, UFRGS, 2010.

A taxa de crescimento micelial foi avaliada para os isolados de *F. verticillioides* e *F. graminearum* sob condições de escuro contínuo e 25°C. Nessas condições, todos os isolados de *F. graminearum* apresentaram maior velocidade de crescimento (atingindo a borda da placa no quinto dia), em comparação aos isolados de *F. verticillioides*. Previamente, Devi & Singh (1994) observaram maior crescimento de *F. graminearum* sob essas condições de incubação. Dados da literatura mostram que as duas espécies diferem quanto às temperaturas ótimas para o crescimento, sendo que a temperatura aqui avaliada estaria mais próxima da

temperatura ótima para *F. graminearum* do que para *F. verticillioides*, cujo ótimo estaria na faixa de 30°C (Munkvold, 2003).

Quanto aos genótipos tricotecenos de *F. graminearum*, não foram encontrados na literatura efeitos dessa característica no crescimento micelial. Quanto aos isolados de *F. verticillioides*, os valores de taxa de crescimento são próximos àqueles observados por Teixeira *et al.* (2001) que, avaliaram um isolado de *F. verticillioides* oriundo de grãos de milho, obtiveram taxa média de crescimento micelial de 10,3 mm/dia nas mesmas condições (escuro contínuo a 25°C).

Os isolados de *F. verticillioides* mostraram-se extremamente mais sensíveis ao fungicida tebuconazole quando comparados aos isolados de *F. graminearum*, sugerindo que a DL50 é menor que 0,01 ppm, pois não houve crescimento nessa dose. Não foram encontrados dados na literatura sobre sensibilidade de isolados da espécie *F. verticillioides* a fungicidas triazóis, sendo este possivelmente o primeiro relato no Brasil. Os isolados NIV apresentaram DL50 dez vezes inferior aos isolados 15-ADON que foram, por conseguinte, os menos sensíveis. Esse resultado concorda com dados preliminares de sensibilidade ao tebuconazole avaliada em um conjunto de isolados com genótipo 15-ADON e NIV de *F. graminearum* obtidos do trigo, em que o segundo apresentou mais alta sensibilidade (Del Ponte *et al.*, 2010).

Populações de *F. graminearum* menos sensíveis a fungicidas do grupo triazol já foram relatadas por outros autores. Por exemplo, Becher *et al.* (2010) compararam seis isolados crescidos em ciclos sucessivos em meio de cultura suplementado com tebuconazole, com um isolado parental. Os autores observaram reduções de sensibilidade com DL50 variando de 0,14 no parental até 1,52 ppm nos isolados menos sensíveis.

A menor sensibilidade de isolados 15-ADON verificada nesse estudo, confirmando os resultados obtidos com populações do trigo, sugerem que estes fazem parte de uma mesma população patogênica para as duas culturas, favorecido pela sucessão de culturas e manutenção do inóculo na palha. No entanto, no trigo, as populações de *F. graminearum* são predominantemente (~92%) de isolados 15-ADON, enquanto que no milho se observou uma dominância de isolados NIV. É possível que uma pressão de seleção esteja sendo exercida nas populações do trigo com o uso mais intenso de tebuconazole nos últimos anos com a ressurgência da giberela, ao contrário do milho em que o manejo com fungicidas direcionados ao controle de giberela é pouco utilizado. Mais estudos são necessários para esclarecer se o manejo com fungicida afeta decisivamente a dinâmica populacional dos genótipos tricotecenos de *F. graminearum* ou se existe especificidade para o hospedeiro (trigo ou milho) para isolados NIV ou 15-ADON, conforme demonstrada em outros estudos em que se observou maior agressividade de isolados NIV em milho do que em trigo (Desjardins, 2006).

Quanto às variáveis relacionadas às características de patogenicidade, houve um comportamento relativamente consistente entre os isolados, evidenciado pela formação de três grupos nítidos segundo a análise multivariada.

Todos os isolados se mostraram patogênicos e infectaram as sementes, com consequente impacto negativo na viabilidade das mesmas em substrato de papel e emergência de plântulas em substrato, bem como a colonização de colmos de plântulas de 20 dias.

A importância relativa de *Fusarium* spp. associadas com sementes de milho ou no solo tem sido objeto de estudo por vários autores, porém com resultados conflitantes. Normalmente, *F. verticillioides* é a espécie mais comumente encontrada

em sementes, mas em alguns casos, seu efeito na viabilidade de sementes foi mínimo ou nulo, enquanto que em outros resultou em baixa emergência e fraco crescimento de plântulas (Kommendahl & Windels, 1984).

A redução da viabilidade observada nesse estudo foi ao redor de 70% para ambas as espécies, valor extremamente alto quando comparado aos resultados relatados por Munkvold & O'Mara (2001). Esses autores não observam efeito negativo na viabilidade de sementes depositadas em placas com colônias de seis espécies de *Fusarium* recuperadas de plantas de milho. No presente estudo, o significativo efeito negativo na viabilidade pode ser devido ao alto nível de inóculo resultante do método de inoculação em que as sementes foram expostas por cinco dias em condição de restrição hídrica do substrato. Salienta-se que as testemunhas não inoculadas também passaram pela mesma condição e mantiveram níveis de viabilidade acima de 83%, minimizando, dessa forma, um possível efeito dessa condição na germinação.

Durante a avaliação da viabilidade das sementes inoculadas, todas apresentaram colônias típicas do isolado inoculado. No entanto, sugere-se que diferenças percebidas entre os isolados quanto à eficiência de infecção, determinada pela incidência de sementes totalmente colonizadas no segundo dia, seja um reflexo do inóculo inicial como resultado da agressividade do isolado. Nesse sentido, isolados de *F. graminearum* foram os que apresentaram maior eficiência de infecção de sementes comparada a *F. verticillioides*. Por outro lado, isolados de *F. graminearum* também foram os que mostraram maior taxa de crescimento micelial, o que pode ter influenciado na determinação dessa característica uma vez que, em dois dias, a 25°C, os isolados de *F. graminearum* podem ter crescido mais rapidamente do que os de *F. verticillioides*, e não pelo fato de ter maior massa fúngica no interior da semente, o

que não foi possível de se determinar nesse estudo. A partir do sexto dia todas as sementes estavam uniformemente colonizadas, o que pode se relacionar ao tempo de crescimento suficiente para o fungo colonizar totalmente a semente, mesmo com menor nível inicial de inóculo.

Ainda no estudo de Munkvold & O'Mara (2001), sementes de milho de dois híbridos mostraram maior redução de emergência de plântulas em substrato quando inoculadas com os isolados de *F. graminearum* (~40 a 50%), do que com *F. verticillioides* (~1 a 5%), concordando com os resultados aqui obtidos quando da comparação das espécies, porém com valores mais altos de redução e maior variação entre os isolados de *F. graminearum*, em função do genótipo tricoteceno. Em estudo realizado por Damicone *et al.* (1988), isolados de *F. verticillioides* inoculados em grãos de aveia e plantados junto às sementes de milho no campo reduziram a emergência de plântulas em níveis de 26 a 46%, demonstrando, assim como no presente estudo, o impacto desse patógeno na redução de estande a qual foi atribuída ao apodrecimento das sementes e tombamento de pré-emergência, naquele estudo.

Todos os isolados causaram lesões no colmo a partir do ponto de inoculação com ferimento, com crescimento predominante acima desse, mensuradas aos 10 dias após a inoculação. Da mesma forma, Damicone *et al.* (1988) observaram que isolados de *F. verticillioides*, retirados de colmo milho ou de *Asparagus*, causaram lesões de comprimento ao redor de 2cm acima e abaixo do ponto de inoculação usando a mesma metodologia, porém avaliado aos 14 dias. Já Jardine & Leslie (1999), avaliando a agressividade de quatro isolados de *F. verticillioides* inoculados pelo método do palito em colmo de plantas de dois híbridos de milho, na fase de pendoamento, observaram que todos os isolados causaram lesões nos colmos, variando de 13 a 22 cm, em comparação a testemunha que não apresentou lesão.

Com exceção de um isolado NIV de *F. graminearum* que apresentou destacada agressividade no colmo produzindo lesões de três a seis vezes maiores que os demais isolados, todos mostraram comportamento semelhante, produzindo lesões de aproximadamente 1 a 2,5 cm. Na literatura são escassos os trabalhos, que comparam conjuntamente características de agressividade dessas duas espécies causando podridão em colmo e/ou em espigas, principalmente para *F. graminearum*. Miedaner *et al.*, (2010), em um estudo de campo conduzido na Alemanha, avaliaram isolados do tipo DON e NIV de *F. graminearum* e *F. verticillioides*, usando inoculação através do estigmas de 5 a 7 dias após o florescimento em híbridos suscetíveis e resistentes de milho. Os autores observaram que a média de severidade de giberela causada pelos isolados de *F. graminearum* produtores de DON foi a mais alta (62,9%), seguido dos produtores de NIV (24,2%) e por isolados de *F. verticillioides* (9,8%).

A análise de agrupamento dos genótipos por análise multivariada utilizada neste trabalho permitiu discriminar os isolados em três grupos, mostrando coerência com os resultados observados na análise univariada e levando a classificação dos isolados de *F. verticillioides* em um mesmo grupo, juntamente com um isolado de *F. graminearum*, que foram os menos agressivos dentre os avaliados.

Análise multivariada foi utilizada previamente em estudos com outros patossistemas, mas objetivando a classificação de cultivares quanto à reação à doenças como ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) (Santos *et al.*, 2007), ferrugem-da-folha da aveia (*P. coronata f.sp. avenae* Fraser & Led.) (Vieira *et al.*, 2006), e o vírus da mancha anelar do mamoeiro (*papaya ringspot* vírus type P., PRSV-P) (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). A análise de componentes principais permitiu a identificação das variáveis, no caso agressividade em colmos e redução da

emergência, que sintetizam o comportamento dos isolados em relação às características fisiológicas e patogênicas. Para Lebeda & Jendrulek (1988) a análise multivariada é vantajosa, pois permite a classificação dos objetos, no caso do presente estudo os isolados, por um conjunto numérico de atributos, no caso, relacionados com características fisiológicas e patogênicas, o que é difícil de ser realizado pela análise univariada onde diferentes grupos podem ser formados para cada variável.

No presente estudo, fica evidente o maior *fitness* e agressividade dos isolados de *F. graminearum* comparado aos de *F. verticillioides*, nas condições avaliadas. No entanto, o fato de se ter observado uma baixa prevalência e incidência de *F. graminearum* nas amostras de campo coletadas em dois anos, se deve a outros fatores que não exclusivamente às características fisiológicas e patogênicas aqui avaliadas, mas sim com a epidemiologia dessas duas doenças que diferem em relação às fontes de inóculo, mecanismos de dispersão e vias de infecção. Enquanto que *F. graminearum* tem nos estigmas a sua principal via de infecção, *F. verticillioides* se utiliza dos estigmas, ferimentos causados por insetos e transmissão sistêmica por sementes ou raízes (Munkvold *et al.*, 1997). Variações entre dominância dessas espécies em diferentes regiões produtoras de milho ao redor do mundo são influenciadas decisivamente pelas condições climáticas, onde *F. graminearum* é normalmente mais comum em climas subtropicais e temperados. Dessa forma, não surpreendentemente, os isolados de *F. graminearum* foram encontrados predominantemente em amostras de milho das regiões serranas do nordeste do estado do Rio Grande do Sul, que apresentam maior altitude e clima mais ameno comparado às demais regiões. Futuros trabalhos deverão ser feitos para elucidar características de patogenicidade e agressividade de isolados de ambas as espécies, ou mesmo outras não avaliadas como *F. subglutinans* e *F. proliferatum*, causando podridões em

espigas para os híbridos mais comumente utilizados na região Sul do Brasil, bem como sua contribuição na contaminação com micotoxinas nos grãos.

5 CONCLUSÕES

1. Espécies fúngicas dos complexos *Gibberella fujikuroi* e *G. zea* ocorrem em grãos de milho produzidos no estado do Rio Grande do Sul, com destaque para *G. fujikuroi* em mais alta frequência.
2. Fumonisina B1 e B2 estão presentes nas amostras, porém em níveis abaixo dos limites tolerados segundo a regulamentação.
3. *Fusarium verticillioides* é a espécie dominante dentre as três principais do complexo *G. fujikuroi* em milho, seguido de *F. subglutinans* e *F. proliferatum*, sendo que a maioria dos isolados analisados possui o gene preditivo da síntese de fumonisinas.
4. *Fusarium graminearum* ocorre em baixa prevalência nas amostras de grãos de milho, sendo que a maioria dos isolados apresenta o genótipo tricoteceno nivalenol, seguindo do genótipo 15-acetildesoxinivalenol e 3-acetildesoxinivalenol.
5. Isolados de *F. graminearum* no geral mostraram mais alto *fitness* e agressividade comparados aos de *F. verticillioides*, porém com maior variação entre os isolados da primeira espécie na taxa de crescimento micelial, sensibilidade ao tebuconazole e efeitos em germinação de sementes e emergência de plântulas, em função do genótipo tricoteceno, especialmente para aqueles com genótipo nivalenol.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASA, H. K. et al. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, Lincoln, Nebraska, v. 25, p. 1–9, 2006.

ADEJUMO, T. O.; HETTWER, U.; KARLOVSKY, P. Survey of maize from southwestern Nigeria for zearalenone, alpha- and beta-zearalenols, fumonisin B-1 and enniatins produced by *Fusarium* species. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 24, p. 993-1000, 2007.

ALMEIDA, A. P. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 321-326, 2000.

ALMEIDA, A. P. et al. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 3877-3882, 2002.

ANVISA. Resolução RDC 7. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 26 de fevereiro de 2011. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/107378-7.html>>. Acesso em: 26 fev. 2011.

ARIÑO, A. et al. Estimation of dietary intakes of fumonisins B1 and B2 from conventional and organic corn. **Food Control**, Berlin, v. 18, p. 1058-1062, 2007.

BAIRD, R. et al. Identification of select fumonisin forming *Fusarium* species using PCR applications of the polyketide synthase gene and its relationship to fumonisin production in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, n. 9, p. 554-570, 2008.

BECHER, R. et al. Adaptation of *fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 100, n. 5, p. 444-453, 2010.

BLANDINO, M. et al. Best management practices to assure low mycotoxin contents of corn kernel during production. **International Quality Grains Conference**, Indianapolis, IN, p. 87-90, jul. 2004.

BRASIL. Portaria de n. 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para a classificação do milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 72, p. 1-3, 1996.

BRUTÓN, A. et al. Maize genetic factors for preventing fumonisin contamination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 6113-6117, 2006.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Singapura, v. 16, n. 1, p. 95-101, 2007.

BUIATE, E. A. S. et al. Reação de híbridos de milho e levantamento dos principais fungos associados ao complexo de patógenos causadores de “grão ardido” em Minas Gerais. **Horizonte Científico**, Uberlândia, v. 2, n. 1, 2008.

CAMARGOS, S. M. et al. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B1 e B2 em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 71-79, 2000.

CAMPA, R. de la et al. Modeling effects of environment, insect damage, and Bt genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines. **Mycopathologia**, New York, n. 159, p. 539-552, 2005.

CARTER, J. P. et al. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 573-583, 2002.

CASA, R. T. et al. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 4, p. 353-357, 2007.

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

CASTRO, M. F. P. M. et al. Fumonisins in brazilian corn-based foods for infant consumption. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 21, n. 7, p. 693-699, 2004.

CHANDLER, E. A.; SIMPSON, D. R. et al. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 62, n. 6, p. 355-367, 2003.

CHULZE, S. N. et al. *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 2797-2801, 1996.

CHULZE, S. N.; RAMÍREZ, M. L.; TORRES, A.; LESLIE, J. F. Genetic variation in *Fusarium* section Liseola from no-till maize in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5312–5315, 2000.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 02 jan. 2011.

COSTA, R. S. et al. Relação entre características morfológicas da cariopse e fusariose em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 27-33, 2003.

COTTEN, T. K.; MUNKVOLD, G. P. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 550–555, 1998.

COUTINHO, W. M. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 458-464, 2007.

CVETNIC, Z. et al. Toxigenic potential of *Fusarium* species isolated from non-harvested maize. **Arh Hig Rada Toksikol**, Zagreb, n. 56, p. 275-280, 2005.

D'MELLO, J. P. R.; MACDONALD, A. M. C.; DIJKSMA, W. T. P. Acetyl deoxynivalenol and esterase production in a fungicide insensitive strain of *Fusarium culmorum*. **Mycotoxin Research**, Munich, v. 14, p. 9–18, 1998.

DAMICONE, J. P.; VINEIS, P. D.; MANNING, W. J. Cross-pathogenicity of *Fusarium moniliforme* isolates from corn and asparagus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 72, p. 774-777, 1988.

DEL PONTE, E. M. et al. Variabilidade populacional de *Fusarium graminearum* – implicações na epidemiologia e manejo de risco. In: WORKSHOP DE EPIDEMIOLOGIA DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., 2010, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: [S.n.], 2010.

DESJARDINS, A. E. et al. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, n. 3, p. 595-604. 1993.

DESJARDINS, A. E. et al. Field release of *Gibberella zeae* genetically modified to lack ascospores. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 6, p. 39-44, 2006.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, Genetics and Biology. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, p. 260, 2006.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, v. 119, n. 1-2, p. 47-50, 2007.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. **Fungal Biology**, Londres, v. 3, p. 1-2, 2010.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; NELSON, P. E. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* from maize in northeast Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1695–1697, 1994.

DEVI, R. K. T.; SINGH, N. I. Effect of temperature and light on growth and sporulation of *Fusarium* rice sheath rot. **International Rice Research Notes**, Manila, v. 19, n. 3, p. 28, 1994.

DORÓ, C. Panorama do milho gaúcho: safra 2007/08. In: REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO, 53., 2008, Pelotas. **Atas e resumos...** Pelotas: Embrapa clima Temperado, 2008. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2008/reuniao_milho/pdf/Palestras/Claudio%20Doro/claudio_doro.pdf>. Acesso em: 23 dez. 2010.

DOWD, P. F.; JOHNSON, E. T. Field incidence of mycotoxins in commercial popcorn and potential environmental influences. **Mycotoxin Research**, Munich, v. 26, p. 15-22, 2009.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, Egham, v. 19, p. 11-15, 1987.

EMBRAPA. Cultivo do Milho. Sistemas de Produção. 4. ed. 2009. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/Cultivo doMilho_6ed/index.htm>. Acesso em: 23 nov. 2010.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção do milho**. 2 ed. Guaíba: Agropecuária, Campinas, 2004. 360 p.

FANDOHAN, P. et al. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in África. **African Journal of Biotechnology**, Abraka, v. 2, p. 570-579, 2003.

FAO. **Micotoxinas em grãos**. Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/X5012O/X5012o01.htm>>. Acesso em: 13 jan. 2010.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, T. A. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA CNPMS, 2000. 80 p. (Circular técnica, 26).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEM, 1998. 220 p.

- FIGUEIRA, E. L. Z. et al. Milho: riscos associados a contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003.
- FURLONG, E. B. et al. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, New York, v. 131, n. 3, p. 185-190, 1995.
- GARCIA JÚNIOR, D.; VECHIATO, M. H.; MENTEN, J. O. M. Efeito de fungicidas no controle de *Fusarium graminearum*, germinação, emergência e altura de plântulas em sementes de trigo. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 280-283, 2008.
- GELDERBLOM, W. C. A. et al. Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1806-1811, 1988.
- GOSWAMI, R. S. et al. Genomic analysis of host-pathogen interaction between *Fusarium graminearum* and wheat during early stages of disease development. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 152, p. 1877-1890, 2006.
- GOSWAMI, R. S.; KISTLER, C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 5, n. 6, p. 515-525, 2004.
- GOULART, A. C. P., FIALHO, W. F. B. Incidência e controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho. **Informativo ABRATES**, Londrina, n. 9, p. 110, 1999.
- HUSSEIN, H. M. et al. Occurrence and distribution of *Fusarium* species in maize fields in New Zealand. **Mycopathologia**, New York, p. 25-30, 2002.
- IBGE. Divisão Regional. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/geografia/default_div_int.shtm>. Acesso em: 15 nov. 2010.
- JARDINE, D. J.; LESLIE, J. F. Aggressiveness to mature maize plants for *Fusarium* strains differing in ability to produce fumonisin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 690-693, 1999.
- JENNINGS, P. E. A. Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 643-652, 2004.
- JEON J. et al. Genetic diversity of *Fusarium graminearum* from maize in Korea. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 50, p. 438, 2003.
- JULIATTI, F. C. et al. Controle da feosféria, ferrugem comum e cercosporiose pelo uso da resistência genética, fungicidas e épocas de aplicação na cultura do milho. **Journal Biociencia**, Uberlândia, v. 20, n. 3, p. 45-54, 2004.

- JULIATTI, F. C. et al. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Journal Biociencia**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 34-41, 2007.
- JURADO, M. et al. PCR detection assays for the trichotheceneproducing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stutgard, v. 28, n. 6, p. 562-568, 2005.
- JURADO, M. et al. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. **Systematic and Applied Microbiology**, Freising, v. 29, p. 681-689, 2006.
- KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina a e zearalenona em produtos de milho. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 516-521, 2006.
- KEDERA, C. J.; LESLIE, J. F.; CLAFFIN, L. E. Genetic diversity of *Fusarium* section Liseola (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 603-607, 1994.
- KOMMENDAHL, T.; WINDELS, C. E. Root, stalk, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the U.S.A. In: P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook, Editors, *Fusarium Disease, Biology, and Taxonomy*, Pennsylvania State University Press, University Park, p. 94-103, 1984.
- KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 283-300, 2003.
- KRISKA, R. et al. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 371, n. 1, p. 285-299, 2001.
- LEBEDA, A.; JENDRULEK, T. Application of methods of multivariate analysis in comparative epidemiology and research into field resistance. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 495-505, 1988.
- LEE, Y. W. et al. Lineage composition and trichothecene production of *Gibberella zeae* population in Korea. In: YOSHIZAWA, T. (Ed.). **New Horizons of Mycotoxicology for Assuring Food Safety**, Korea, p. 117-122, 2004.
- LEGENDER, P.; LEGENDER, L. Numerical ecology. Elsevier, 853 p., 1998.
- LESLIE, J. F. et al. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 275-283, 2005.

LESLIE, J. F.; BOWDEN, R. L. *Fusarium graminearum*: when species concepts collide. **Cereal Research Communications**, Szeged, n. 6, v. 36, p. 609–615, 2008.

LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A. The *Fusarium* Laboratory manual. **Blackwell Professional**, Ames, p. 387, 2006.

LOGRIECO, A. et al. Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. **Mycopathologia**, New York, v. 122, p. 185–190, 1993.

LOGRIECO, A. et al. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 7, p. 645-667, 2003.

MACHADO, J. C. et al. Uso de restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 22, p. 88-94, 2001.

MAIORANO, A. et al. A dynamic risk assessment model (Fumagrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. **Crop protection**, Lincoln, p. 1-14, 2008.

MAPA. **Rendimento de grãos em diferentes tipos de híbridos de milho**. Sete Lagoas, 2007. (Comunicado Técnico, 144).

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes (RAS)**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

MARASAS, W. F. O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 109, p. 239-243, 2001.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 40, p. 349-379, 2002a.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, p. 163-180, 2002b.

MELCION, D. et al. Study of the biosynthesis of fumonisins B1, B2, and B3 by different strains of *Fusarium moniliforme*. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 24, p. 301–305, 1997.

MIEDANER, T.; BOLDUAN, C.; MELCHINGER, A. E. Agressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize inbred lines. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, p. 113-123, 2010.

- MILANEZ, T. V.; VALENTE-SOARES, L. M. B. Gas Chromatography - mass spectrometry determination of trichothecene mycotoxins commercial corn harvested in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 412-416, 2006.
- MILGROOM, M. C. The synthesis of genetics and epidemiology contributions of population biology in plant pathology. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 83, p. 57-62, 2001.
- MILLER, J. D. et al. Mycotoxin chemotypes of three *Fusarium* species. **Mycologia**, Stanford, v. 83, p. 121-130, 1991.
- MILLER, J. D. Factors that affect the occurrence of fumonisin. Environmental Health Perspectives, Department of Chemistry, Ottawa-Carleton Institute of Chemistry, Carleton University, Ottawa, Ontario, v. 109, s. 2, 2001.
- MORA-AGUILERA, G. et al. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 70-78, 1996.
- MULÉ, G. et al. Species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 495-502, 2004.
- MULLENBORN, C. et al. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, p. 157-166, 2008.
- MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 705-713, 2003.
- MUNKVOLD, G. P. et al. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 209-217, 1997.
- MUNKVOLD, G. P. et al. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 130-138, 1999.
- MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, n.6, p.556-565, 1997.
- MUNKVOLD, G. P.; O'MARA, J. K. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 143-150, 2001.
- MURPHY, P. A.; RICE, L. G.; ROSS, P. F. Fumonisin B1, B2 and B3 content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 2, p. 263-266, 1993.

NAYAKA, S. C. et al. Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in maize grown in southern India. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Valência, v. 26, p. 71–78, 2010.

NELSON, P. E. et al. *Fusarium* species: an Illustrated Manual for Identification. **Pennsylvania State University Press**, University Park, EUA, 1983.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 1, p. 30-36, 2008.

NICHOLSON, P. et al. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 53, p. 17-37, 1998.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and the combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, Standford, v. 90, p. 434-458, 1998.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, Standford, v. 90, n. 3, p. 465-493, 1998.

O'DONNELL, K. et al. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, Saitama, v. 41, p. 61-78, 2000.

O'DONNELL, K. et al. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 6, p. 600-623, 2004.

O'DONNELL, K. et al. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, n. 11, p. 1514-1522, 2008.

OLIVEIRA, W. F. et al. Efeito de produtos fitossanitários no tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.), visando ao controle de *Fusarium moniliforme* (Sheld). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 29, p. 65–9, 1999.

ONO, E. Y. S. et al. Microbiota fúngica e fumonisinas em milho do estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1., 1998, Florianópolis. **Livro de resumos**. Florianópolis: UFSC, 1998. p. 121.

ONO, E. Y. S. et al. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, New York, v. 147, p. 139–148, 2000.

ONO, E. Y. S. et al. Fumonisins in Corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 49, n. 1, p. 63-71, 2006.

ORSI, R. B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal Stored Products Research**, Amsterdam, v. 36, p. 75–87, 2000.

OTTONI, R. J. **Análise da incidência de *Fusarium* spp. toxigênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

PARRY, D. W. et al. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 44, p. 207–238, 1995.

PATIÑO, B. et al. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 6, p. 1278-1283, 2004.

PEREIRA, O. A. P. Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. In: RESISTÊNCIA genética de plantas a doenças. Piracicaba: Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1995. p. 25-30.

PEREIRA, O. A. P. et al. Doenças do milho (*Zea mays*). In: MANUAL de fitopatologia. Piracicaba: Ceres, 2005. cap. 55, p. 477-488.

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

PILLAR, V. P. How sharp are classifications? **Ecology**, Washington, v. 80, p. 2508-2116, 1999a.

PILLAR, V. P. The bootstrapped ordination re-examined. **Journal of Vegetation Science**, Renkum, v. 10, p. 895-902, 1999b.

PILLAR, V. P. MULTIV: software para análise multivariada, testes de aleatorização e autoreamostragem “bootstrap”. Porto Alegre: Departamento de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

PRADO, G. et al. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, Campinas, setembro, 1997.

PRESELLO, D. A. et al. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. **Crop Protection**, Lincoln, n. 27, p. 572–576, 2008.

QUARTA, A. et al. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. **Microbiology Letters**, Amsterdã, n. 259, p. 7-13, 2006.

QUERALES, P. Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo do milho (*Zea mays* L.). 2010. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RAHJOO, V. et al. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 90, p. 463-468, 2008.

RAMOS, A. T. M. Levantamento da micoflora de grãos ardidos de milho e avaliação da resistência genética à *Fusarium verticillioides*. 2008. 71 f. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Graphel, 2004.

REID, L. M. et al. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, p. 1028-1037, 1999.

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

RYU J. A. et al. Survey of natural occurrence of trichothecenmycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 13, p. 333-341, 1996.

ROSS, P. F. et al. Concentrations of fumonisin B1 in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, New York, v. 114, p. 129-135, 1991.

SABINO, M. et al. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in mayze in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, Londres, v. 6, n. 3, p. 327-331, 1989a.

SABINO, M. et al. Determinação de deoxynivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 49, p. 155-159, 1989b.

- SÁNCHEZ-RANGEL, D.; SAN JUAN-BADILLO, A.; PLASENCIA, J. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 8565-8571, 2005.
- SANGOI et al. Níveis de manejo na cultura do milho em dois ambientes contrastantes: análise técnico-econômica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1021-1029, nov-dez, 2003.
- SAMPIETRO, D. et al. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, 2010.
- SANTOS, J. A. et al. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 443-447, 2007.
- SCHMALE III, D. G.; MUNKVOLD, G. P. Mycotoxins in Crops: A threat to human and domestic animal health. **The Plant Health Instructor**. Disponível em: <http://www.apsnet.org/education/IntroPlantPath/Topics/mycotoxins/index_.html>. Acesso em: 27 nov. 2010.
- SCOZ, L. B.; ASTOLFI, P. et al. Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum* sensu stricto and *Fusarium meridionale* in wheat from southern Brazil. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 344-351, 2009.
- SHURTLEFF, M. C. A compendium of corn disease. **American Phytopathological Society**, Saint Paul, 1992.
- SUMMERELL, B. A.; THRANE, U. WAALWIJC, C. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. **Mycological Research**, Amsterdã, v. 107, n. 6, p. 643-644, 2003.
- SILVA, L. C. **Fungos e micotoxinas em grãos armazenados**. 2005. Disponível em: <<http://www.agais.com/fungos.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2010.
- SKOVGAARD, K.; ROSENDAHL, S. et al. *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. **Mycologia**, Standford, v. 95, n. 4, p. 630-636, 2003.
- SMITH, D. R.; WHITE, D. G. Diseases of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 3rd ed. Madison: American Society Agronomy, 1988. p. 687-766.
- SOBEK, E. A.; MUNKVOLD, G. P. European corn borer larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. **Journal of Economic Entomology**, Los Angeles, v. 92, p. 503-509, 1999.

SPOLTI, P.; SIMON, L. et al. Spatial patterns and incidence-severity relationships of *Fusarium* head blight epidemics on wheat crops following soybean or maize in Rio Grande do Sul, Brazil. In: NATIONAL FUSARIUM HEAD BLIGHT FORUM, 2009, Orlando. **Proceedings...** Lexington: University of Kentucky, 2009. p. 85.

STARKEY, D. E.; J.WARD, T. et al. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* Head Blight species and trichothecene toxin diversity. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 11, p. 1191-1204, 2007.

SUGA, H.; KARUGIA, G. W. et al. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 2, p. 159-166, 2008.

SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 4, p. 195-209, 1982.

TANAKA T. et al. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, p. 979-983, 1988.

TEIXEIRA, H. et al. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1314-1320, nov./dez. 2001.

TORRES, A. et al. Fungal and mycotoxin contamination in home grown maize harvested in the north area of Argentina. **Food Additives & Contaminants**, Londres, v. 18, p. 836-843, 2001.

TÓTH, B.; MESTERHÁZY, Á. et al. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 113, n. 1, p. 35-45, 2005.

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

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 5574, 2003.

VARGAS, E. A.; CASTRO, P. L.; SILVA, C. M. G. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenona and fumonisin B1 in Brazilian corn. **Food Additives & Contaminants**, Londres, v. 18, n. 11, p. 981-986, 2001.

VARGAS, A. J. **As micotoxinas e a reprodução em suinocultura**. Disponível em: <www.engormix.com>. Acesso em: 01 dez. 2010.

VIEIRA, E. A. et al. Padrão de resistência de genótipos de aveia à ferrugem-da-folha na definição de hibridações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 607-614, 2006.

WARD, T. J.; BIELAWSKI, J. P. et al. Ancestral polymorphism and adaptative evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 14, 2002.

WHITE, D. G. Compendium of corn diseases. 3rd ed. Saint Paul: APS, 1999. p. 78.

YLI-MATTILA, T.; GAGKAEVA, T. et al. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. **Mycopathologia**, New York, v. 101, n. 6, p. 841-852, 2009.

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

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Informações para a coleção de 304 isolados de populações obtidas de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 e 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Código dos isolados	Município	Saфра	IM ^a	PCR				Genótipo toxigênico
				Fv ^b	Fs ^c	Fp ^d	Fg ^e	
09Mi001	Eldorado do Sul	2008/09	Fv	+	-	-	-	-
09Mi002	Eldorado do Sul	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi003	Eldorado do Sul	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi005	Casca	2008/09	Fg	+	-	-	-	FUM+
09Mi006	Eldorado do Sul	2008/09	Fp/Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi007	Eldorado do Sul	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi008	Eldorado do Sul	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi009	Vacaria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi010	Vacaria	2008/09	Fg	-	-	-	+	15-ADON
09Mi011	Vacaria	2008/09	Fg	-	-	-	+	15-ADON
09Mi012	Vacaria	2008/09	Fp	+	-	-	-	-
09Mi013	Vacaria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi014	Vacaria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi015	Vacaria	2008/09	Fg	-	+	-	-	NIV
09Mi016	Vacaria	2008/09	Fp	+	-	-	-	-
09Mi017	Vacaria	2008/09	Fg	+	-	-	-	FUM+
09Mi018	Vacaria	2008/09	Fg	+	-	-	-	FUM+
09Mi019	Bom Jesus	2008/09	Fs	-	+	-	-	-
09Mi020	Vacaria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi021	Bom Jesus	2008/09	Fg	-	-	-	+	NIV
09Mi022	Bom Jesus	2008/09	Fg	+	-	-	-	-
09Mi023	Bom Jesus	2008/09	Fg	-	-	-	+	NIV
09Mi025	Vacaria	2008/09	Fg	-	-	-	+	3-ADON
09Mi026	Bom Jesus	2008/09	Fg	-	-	-	+	NIV
09Mi027	Bom Jesus	2008/09	Fs	-	+	-	-	-
09Mi028	Casca	2008/09	Fv	+	-	-	-	-
09Mi029	Casca	2008/09	Fg	+	-	-	-	-
09Mi030	Casca	2008/09	Fv	-	-	-	+	-
09Mi031	Casca	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi032	Caxias do sul	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi033	Caxias do sul	2008/09	Fg	-	-	-	+	-
09Mi034	Caxias do sul	2008/09	Fg	-	-	-	+	NIV
09Mi035	Caxias do sul	2008/09	Fg	-	-	-	+	-
09Mi036	Caxias do sul	2008/09	Fg	-	-	-	+	-
09Mi037	Coxilha	2008/09	Fv	-	-	-	+	-
09Mi038	Coxilha	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi039	Coxilha	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi040	Coxilha	2008/09	Fp	+	-	-	-	FUM+
09Mi041	Coxilha	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi042	Itaara	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi043	Itaara	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi044	Itaara	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi045	Itaara	2008/09	Fs	+	-	-	-	FUM+
09Mi046	Itaara	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi047	Júlio de Castilhos	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi048	Júlio de Castilhos	2008/09	Fp	+	-	-	-	FUM+
09Mi049	Júlio de Castilhos	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi050	Júlio de Castilhos	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+

continuação APÊNDICE 1. Informações para a coleção de 304 isolados de populações obtidas de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 e 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Código dos isolados	Município	Safr	IM ^a	PCR				Genótipo toxigênico
				Fv ^b	Fs ^c	Fp ^d	Fg ^e	
09Mi051	Júlio de Castilhos	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi052	Lagoa Vermelha	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi053	Lagoa Vermelha	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi054	Lagoa Vermelha	2008/09	Fg	-	-	-	+	-
09Mi055	Lagoa Vermelha	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi056	Lagoa Vermelha	2008/09	Fv	+	-	-	-	-
09Mi057	Passo Fundo	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi058	Passo Fundo	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi059	Passo Fundo	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi060	Passo Fundo	2008/09	Fs	+	-	-	-	FUM+
09Mi062	Passo Fundo	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi063	Passo Fundo	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi064	Passo Fundo	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi065	Passo Fundo	2008/09	Fp/Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi066	Passo Fundo	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi067	Portão	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi068	Portão	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi069	Portão	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi070	Portão	2008/09	Fp/Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi071	Portão	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi072	Santa Maria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi073	Santa Maria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi074	Santa Maria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi075	Santa Maria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi076	Santa Maria	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi077	São João da Urtiga	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi078	São João da Urtiga	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi079	São João da Urtiga	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi080	São João da Urtiga	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi081	São João da Urtiga	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi082	Boa Vista das Missões	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi083	Boa Vista das Missões	2008/09	ND*	-	+	-	-	-
09Mi084	Boa Vista das Missões	2008/09	Fg	-	-	-	+	NIV
09Mi085	Boa Vista das Missões	2008/09	Fg	-	-	-	+	NIV
09Mi087	Boa Vista das Missões	2008/09	ND	+	-	-	-	-
09Mi088	Boa Vista das Missões	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi089	Boa Vista das Missões	2008/09	ND	+	-	-	-	-
09Mi091	Boa Vista das Missões	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi092	Boa Vista das Missões	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+

continuação APÊNDICE 1. Informações para a coleção de 304 isolados de populações obtidas de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 e 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Código dos isolados	Município	Saфра	IM ^a	PCR				Genótipo toxigênico
				Fv ^b	Fs ^c	Fp ^d	Fg ^e	
09Mi093	Boa Vista das Missões	2008/09	Fs	-	+	-	-	-
09Mi094	Boa Vista das Missões	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi095	Boa Vista das Missões	2008/09	Fv	+	-	-	-	FUM+
09Mi096	Boa Vista das Missões	2008/09	Fv	+	-	-	-	-
09Mi097	Capão do Leão	2008/09	Fg	+	-	-	-	-
09Mi098	Capão do Leão	2008/09	Fg	+	-	-	-	-
09Mi099	Capão do Leão	2008/09	Fg	-	-	-	+	15-ADON
09Mi100	Capão do Leão	2008/09	ND	+	-	-	-	-
09Mi101	Capão do Leão	2008/09	Fs	+	-	-	-	-
10Mi001	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi002	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi003	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi004	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi005	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi006	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi007	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi008	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi009	Cruz Alta	2009/10	Fv	-	-	+	-	-
10Mi010	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi011	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi012	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi013	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi014	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi015	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi016	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi017	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi018	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi019	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi020	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi021	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi022	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi023	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi024	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi025	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi026	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi028	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi029	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi030	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi031	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi032	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi033	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi034	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi035	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi036	Cruz Alta	2009/10	Fv/Fs	+	-	-	-	FUM+

continuação APÊNDICE 1. Informações para a coleção de 304 isolados de populações obtidas de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 e 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Código dos isolados	Município	Safr	IM ^a	PCR				Genótipo toxigênico
				Fv ^b	Fs ^c	Fp ^d	Fg ^e	
10Mi037	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi038	Cruz Alta	2009/10	Fv/Fs	+	-	-	-	FUM+
10Mi039	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi040	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi041	Cruz Alta	2009/10	Fv	-	-	+	-	-
10Mi042	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi043	Cruz Alta	2009/10	Fg	+	-	-	-	FUM+
10Mi044	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi045	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi046	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi047	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi048	Cruz Alta	2009/10	Fv/Fs	+	-	-	-	FUM+
10Mi049	Cruz Alta	2009/10	Fv/Fs	-	-	-	-	-
10Mi050	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi051	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi052	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi053	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi054	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi055	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi056	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi057	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi058	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi059	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi060	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi061	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi062	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi063	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi064	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi065	Cruz Alta	2009/10	Fv	-	-	-	-	-
10Mi066	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi067	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi068	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi069	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi070	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi071	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi072	Cruz Alta	2009/10	ND	+	-	-	-	-
10Mi073	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi074	Cruz Alta	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi075	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi076	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi077	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi078	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi079	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi080	Encantado	2009/10	Fg	+	-	-	-	-
10Mi081	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi082	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi083	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi084	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi085	Encantado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+

continuação APÊNDICE 1. Informações para a coleção de 304 isolados de populações obtidas de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 e 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Código dos isolados	Município	Safr	IM ^a	PCR				Genótipo toxigênico
				Fv ^b	Fs ^c	Fp ^d	Fg ^e	
10Mi086	Machadinho	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi087	Machadinho	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi088	Machadinho	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi089	Machadinho	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi090	Machadinho	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi091	Machadinho	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi092	Tupanciretã	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi094	Tupanciretã	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi095	Tupanciretã	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi096	Tupanciretã	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi097	Três Passos	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi098	Três Passos	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi099	Três Passos	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi100	Três Passos	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi101	Três Passos	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi102	Três Passos	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi103	Eldorado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi104	Eldorado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi105	Eldorado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi106	Eldorado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi107	Eldorado	2009/10	Fg	+	-	-	-	-
10Mi108	Eldorado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi109	Boa Vista do Cadeado	2009/10	Fs	+	-	-	-	FUM+
10Mi110	Boa Vista do Cadeado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi111	Boa Vista do Cadeado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi112	Boa Vista do Cadeado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi113	Boa Vista do Cadeado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi114	Boa Vista do Cadeado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi115	Boa Vista do Cadeado	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi116	Casca	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi117	Casca	2009/10	Fg	+	-	-	-	-
10Mi118	Casca	2009/10	Fg	+	-	-	-	FUM+
10Mi119	Casca	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi120	Casca	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi121	Casca	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi122	Casca	2009/10	Fg	+	-	-	-	FUM+
10Mi123	Casca	2009/10	Fs	+	-	-	-	FUM+
10Mi124	Casca	2009/10	Fg	+	-	-	-	FUM+
10Mi125	Casca	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi126	Casca	2009/10	Fg	+	-	-	-	FUM+
10Mi127	Casca	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi128	Veranópolis	2009/10	Fs	+	-	-	-	FUM+

continuação APÊNDICE 1. Informações para a coleção de 304 isolados de populações obtidas de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 e 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Código dos isolados	Município	Safr	IM ^a	PCR				Genótipo toxigênico
				Fv ^b	Fs ^c	Fp ^d	Fg ^e	
10Mi129	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi130	Veranópolis	2009/10	Fg	+	-	-	-	-
10Mi131	Veranópolis	2009/10	Fs	-	-	-	-	FUM+
10Mi132	Veranópolis	2009/10	Fs	+	-	-	-	-
10Mi133	Veranópolis	2009/10	Fs	+	-	-	-	-
10Mi134	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi135	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi136	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi137	Veranópolis	2009/10	Fg	+	-	-	-	-
10Mi138	Veranópolis	2009/10	Fs	+	-	-	-	-
10Mi139	Veranópolis	2009/10	Fs	+	-	-	-	-
10Mi140	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi141	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi142	Veranópolis	2009/10	Fg	+	-	-	-	-
10Mi143	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi144	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi145	Veranópolis	2009/10	Fs	+	-	-	-	FUM+
10Mi146	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi147	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi148	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi149	Veranópolis	2009/10	Fs	+	-	-	-	FUM+
10Mi150	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi151	Santa Bárbara do Sul	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi152	Santa Bárbara do Sul	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi153	Santa Bárbara do Sul	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi154	Santa Bárbara do Sul	2009/10	Fs	-	-	-	-	FUM+
10Mi155	Santa Bárbara do Sul	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi156	Santa Bárbara do Sul	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi157	Veranópolis	2009/10	Fv	-	-	-	-	FUM+
10Mi158	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi161	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi162	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi163	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi164	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi165	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi166	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi167	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi168	Veranópolis	2009/10	Fg	-	-	-	-	-
10Mi169	Veranópolis	2009/10	Fg	+	-	-	-	FUM+
10Mi170	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi171	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi172	Veranópolis	2009/10	Fv	-	-	-	+	NIV
10Mi173	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+

continuação APÊNDICE 1. Informações para a coleção de 304 isolados de populações obtidas de grãos de milho das safras 2008/09 e 2009/10 e 23 municípios do estado do Rio Grande do Sul.

Código dos isolados	Município	Safr	IM ^a	PCR				Genótipo toxigênico
				Fv ^b	Fs ^c	Fp ^d	Fg ^e	
10Mi174	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi175	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi177	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi179	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi180	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi182	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi183	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi184	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	-
10Mi185	Veranópolis	2009/10	Fv	-	-	-	-	-
10Mi186	Veranópolis	2009/10	Fv	-	-	-	+	-
10Mi187	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi188	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi189	Veranópolis	2009/10	Fv	-	-	-	-	FUM+
10Mi190	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi191	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi192	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi193	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi194	Veranópolis	2009/10	Fs	-	-	-	-	-
10Mi195	Veranópolis	2009/10	Fs	-	-	-	-	-
10Mi196	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi197	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi198	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi199	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi200	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi201	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi202	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi203	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi204	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi205	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi206	Veranópolis	2009/10	Fg	+	-	-	-	FUM+
10Mi207	Veranópolis	2009/10	Fv	-	-	-	+	-
10Mi208	Veranópolis	2009/10	Fv	-	-	-	+	-
10Mi209	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi210	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi211	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+
10Mi212	Veranópolis	2009/10	Fs	-	-	-	-	-
10Mi214	Veranópolis	2009/10	Fs	-	-	-	-	-
10Mi215	Veranópolis	2009/10	Fs	-	-	-	-	-
10Mi217	Veranópolis	2009/10	Fv	+	-	-	-	FUM+

IM^a – identificação morfológica, Fv^b – *F. verticillioides*, Fs^c – *F. subglutinans*, Fp^d – *F. proliferatum*, Fg^e – *F. graminearum*, ND – não determinado, FUM+ – Fumonisina, NIV – Nivalenol, 15-ADON – 15 desoxinivalenol, 3-ADON – 3 desoxinivalenol.