



**Universidade
Estadual de Londrina**

VIVIANE CRISTINA SCHIABEL

**GENÉTICA E TOXICIDADE DE *Fusarium verticillioides* EM
GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.) SOB PLANTIO DIRETO E
CONVENCIONAL**

Londrina
2004

VIVIANE CRISTINA SCHIABEL

**Genética e Toxicidade de *Fusarium verticillioides* em
Grãos de Milho (*Zea mays L.*) sob Plantio Direto e
Convencional**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora : Dra. Elisa Yoko Hirooka
Co-orientadora : Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina

2004

VIVIANE CRISTINA SCHIABEL

Genética e Toxicidade de *Fusarium verticillioides* em Grãos de Milho (*Zea mays L.*) sob Plantio Direto e Convencional

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Flávio Lazzari
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. José Eduardo Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 26 de abril de 2004

Ao Menino Jesus de Praga,

Pela iluminação e proteção durante esta caminhada

AGRADEÇO

Aos meus queridos pais, Osvair e Creuza,

Meus maiores exemplos de amor,

Carinhosamente

Dedico

Aos meus irmãos Ana Carolina e Osvair Augusto

Por plantarem em meu coração a amizade sincera, a alegria e
amor.

Ao meu cunhado Marcelo e sobrinho Marcelinho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a. Elisa Yoko Hirooka, por sua maneira tão especial de orientar, incentivo, minha admiração, meu carinho e meus agradecimentos mais especiais.

À Prof^a. Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono, minha co-orientadora, pela incansável dedicação em ensinar, sua inestimável amizade e paciência.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Garcia, pelos valiosos ensinamentos, colaboração, amizade e momentos de descontração.

Ao professor Dr. Martim Homechin, por possibilitar o trabalho em conjunto ao Departamento de Agronomia da UEL. Executando a metodologia experimental em campo e fornecendo a matéria-prima essencial na execução da dissertação.

Ao Mestre em Agronomia Rogério Theodoro Vieira da Silva, pelo trabalho em conjunto, ensinamentos e ajuda dispensada.

À Prof^a. Dr^a. Maria Helena Fúngaro pela atenção e empréstimo de equipamentos, meus sinceros agradecimentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante o período de realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Édio Vizzoni do departamento de Matemática Aplicada pelo auxílio na análise estatística.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da UEL pelos valiosos ensinamentos.

Aos Funcionários dos departamentos de Bioquímica e Tecnologia de Alimentos e Medicamentos: Nelson, Sílvia, Patrícia, Sandra Rezende, Elda, Sérgio, Sandrinha, Dona Neusa obrigada pela colaboração e amizade.

Ao IAPAR, na pessoa do Sr. Edmirso Borrozino pelo fornecimento dos dados meteorológicos.

Aos colegas, Simone, Ricardo, Alexandre, Bete, Mônica, Thais, Carol, Evenilton, Sandriel, Bona, Juliane, Cris, Adriana, Patrícia e Camila pelo companheirismo.

Ao estagiário Mariano meus sinceros agradecimentos.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

*“O homem que venceu na vida é aquele que viveu bem,
riu muitas vezes e amou muito;
que conquistou o respeito dos homens inteligentes e o amor das crianças,
que preencheu um lugar e cumpriu uma missão;
que deixa o mundo melhor do que encontrou,
seja com uma flor,
um poema perfeito ou um salvamento de uma alma;
que procurou o melhor dos outros e
deu o melhor de si.”*

R.L. Stevenson

SCHIABEL, Viviane Cristina. **Genética e Toxicidade de *Fusarium verticillioides* em Grãos de Milho (*Zea mays* L.) sob Plantio Direto e Convencional**. 2004. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L) é um dos grãos mais produzidos no Estado do Paraná – Brasil, que é o maior produtor nacional deste cereal. Matéria-prima básica de rações animais e na alimentação humana. Sua composição nutricional rica também desencadeia o crescimento de fungos micotoxigênicos, com destaque a *Fusarium verticilloides* Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon), fitopatógeno primário de milho, cuja produção de fumonisinas tem sido motivo preocupante na micotoxicologia. Considerando que a garantia na segurança alimentar deva envolver desde cuidados no campo, monitorou-se o perfil de contaminação fúngica e fumonisinas em milho submetido a diferentes manejos em três safras consecutivas (2001, 2002 e 2003), comparando a variação no sistema de cultivo (plantio direto x convencional e rotação de cultura suplementados com N₂, K⁺ e Ca²⁺). Estes dados foram relacionados com os fatores intrínsecos do milho (umidade, atividade de água e composição bromatológica), assim como avaliou-se a variabilidade genética em populações de *F. verticillioides* isoladas de milho submetido a tratamentos agrônomicos distintos (plantio direto x convencional, rotação de cultura x pousio e adição de N₂, K⁺ e Ca²⁺), tendo como base, o efeito paralelo no nível de contaminação natural de fumonisinas na colheita nos anos consecutivos de plantio. *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. predominaram na micoflora, sendo detectadas em 100, 66 e 20% das amostras, respectivamente. O teor de umidade variou de 10,1 a 16,7% e a atividade de água de 0,75 a 0,80 para o milho recém colhido. A composição bromatológica variou de 5,3 a 7,4% (lipídios), 0,79 a 1,40% (cinzas) e de 7,5 a 10,3% (proteínas). Das 72 amostras analisadas, 70 (97,2%) apresentaram-se contaminadas por fumonisinas, em níveis de 0,73 a 10,64 µg/g para FB₁ e de 0,08 a 5,87 µg/g para FB₂. O milho submetido ao plantio direto apresentou nível de fumonisinas (10,64 µg/g), superior ao plantio convencional (0,04 µg/g). O perfil de genótipo molecular das 23 cepas de *F. verticillioides* isoladas de milho (11 cepas de plantios convencional e 12 de plantio direto) foi investigado perante variabilidade por polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, utilizando 16 primers RAPD (Kit Operon X e W). A metodologia permitiu diferenciar 105 locos, sendo que 75 (71,5%) destes apresentaram-se polimórficos. O índice de similaridade de Jaccard demonstrou uma alta variabilidade genética entre os isolados de *F. verticillioides*. Não obstante, não houve diferença significativa entre os sistemas de semeadura (plantio direto e convencional) (p < 0,05). A análise de agrupamento (UPGMA) não demonstrou associação entre grupos de RAPD e tipos de plantio. A estratégia de plantio da cultura do milho não interferiu na composição genética de populações de *F. verticillioides* isoladas das safras 2002 e 2003.

Palavras-chave: Fusario; Milho; Micotoxinas.

ABSTRACT

The corn (*Zea mays* L) is one of the main grain produced in the State of Paraná Brazil, which classifies this State as the major national producer. This cereal constitutes the basic crude material for human, as well as animal feeding. However its rich nutritional composition also has been the motive of mycotoxigenic fungi growth, with special interest on the primary corn phytopathogen *Fusarium verticillioides* Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon), whose production of fumonisins has been the major concern in the mycotoxicology. Taking into account that food safety should involve particular care from field crop production, the profile of fungal and fumonisins contamination was monitored in corn submitted to different management in three serial crops (2001, 2002 and 2003), comparing the variation in the cultivation system (direct x conventional plantation, rotation of culture and N₂, K⁺ and/or Ca²⁺ supplementation). These data were related with the intrinsic factors of corn kernels (humidity, water activity and bromatological composition). The genetic variability was also evaluated in *F. verticillioides* populations isolated from corn submitted to different agronomic treatments (direct x conventional plantation, rotation x pouso of culture, and N₂, K⁺ and Ca²⁺ supplementation), accounting as the basis, the parallel effect in the level of natural contamination of fumonisins in corn produced by serial years of plantation. *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. prevailed in the mycoflora, which were detected in 100, 66 and 20% of samples, respectively. The humidity content ranged from 10.1 to 16.7%, and the water activity from 0.75 to 0.80 in the fresh harvested corn. The bromatological composition ranged from 5.3 to 7.4% (fat), 0.79 to 1.40% (ashes), and of 7.9 to 10.2% (proteins). Out of 72 samples, 70 (97.2%) were contaminated with fumonisins at 0.73 to 10.64 µg/g range for FB₁, and from 0.08 to 5.87µg/g range for FB₂. The corn produced by direct plantation showed fumonisin level (10.64 µg/g) higher than the conventional plantation (0.04 µg/g). The molecular genotype profile of 23 *F. verticillioides* strains isolated from corn (11 strains from conventional plantations and 12 from direct plantation) was investigated for variability by random amplified polymorphic DNA using 16 RAPD primers (Kit Operon X and W). The methodology allowed the differentiation of 105 loci, from which 75 (71,5%) were polymorphic. The Jaccard similarity index indicated high genetic variability among *F. verticillioides* strains. Nevertheless, there was any significant difference between plantation systems (direct and conventional plantation) (p<0,05). The unweighted pair group method using average linkage (UPGMA) didn't show association between RAPD groups and plantation systems. Therefore the strategy of corn plantation evaluated in this study (2002 and 2003 crop) indicated no interference on the genetic composition of *F. verticillioides* strains.

Key-words: Corn; Fusarium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 PRODUÇÃO DE MILHO NO PARANÁ	15
3.2 <i>F. VERTICILLIOIDES</i> EM MILHO	16
3.3 FUMONISINAS	18
3.4 PATOGENICIDADE DE <i>F. VERTICILLIOIDES</i> EM GRÃOS	22
3.5 SISTEMAS DE PLANTIO.....	23
3.6 RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLIMORFIC DNA).....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
CAPÍTULO I: INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE PLANTIO E ADIÇÃO DE FERTILIZANTES NA MICROBIOTA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E NA PRODUÇÃO DE MONISINAS EM MILHO	36
CAPÍTULO II: ESTUDOS DE VARIEDADE GENÉTICA EM <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i> <i>ISOLADOS DE MILHO SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE PLANTIO</i>.....	57
REFERÊNCIAS	85
ANEXO	92

1 INTRODUÇÃO

O Paraná contribui com aproximadamente 25% da produção brasileira de milho (*Zea mays* L), destacando-se como o maior produtor nacional. Esta produção poderia ser maior se medidas de manejo mais adequadas fossem adotadas no plantio, adubação, armazenagem e seleção de híbridos “mais tolerantes” ao ataque de insetos e fungos, o que minimizaria os riscos com micotoxinas.

A associação de fungos e insetos provoca a contaminação, infestação e deterioração do milho. As fumonisinas produzidas por *Fusarium verticillioides* Sacc Nirenberg (*Fusarium moniliforme* Sheldon) constituem toxinas predominantes no grão de milho, afetando direta e indiretamente as pessoas e animais consumidores do produto e/ou seus derivados.

O efeito tóxico de fumonisinas se manifesta através de leucoencefalomalácia eqüina, edema pulmonar em suínos, câncer hepático em ratos, estando provavelmente associadas ao câncer esofágico humano em regiões onde o milho compõe a dieta cotidiana da população.

Sendo fungo saprófito de campo, a infecção do grão de milho por *F. verticillioides* está relacionada a diversos fatores como: adubação e época de plantio; tipo de híbrido; condições de umidade, temperatura durante o desenvolvimento da planta; ataque de insetos (lagarta da espiga); chuvas de granizo; que isoladamente e principalmente associados permitem a manutenção desta espécie no campo e posterior perigo de fumonisinas nos produtos alimentícios contendo milho.

O sistema de plantio de milho (direto ou convencional) é fator primordial para a recuperação, manutenção da fertilidade, melhoria da estrutura do

solo, viabilização da exploração agrícola e manutenção do homem no campo. Além do benefício de conservação, o plantio direto permite maior acúmulo de nutrientes nas camadas superficiais do solo, reduz o risco de erosão, diminui a pressão de plantas invasoras, proporcionando maior produtividade, menor custo e a sustentabilidade do sistema.

O sistema de plantio e as técnicas de adubação podem alterar a expressão gênica, no sentido de oferecer melhores condições de adaptação para determinados organismos fúngicos, resultando em fenótipos com micotoxigenicidade diferenciada. Devido a alterações no sistema de cultivo é possível a coexistência de diferentes clones de *F. verticillioides* pertencentes a “matting population A” numa mesma planta de milho. Isso poderia repercutir na competitividade e/ou predominância de um determinado padrão genético da mesma espécie, afetando a população de microrganismos presentes na planta e nos grãos de milho.

No contexto, a caracterização molecular possibilitaria o estudo taxonômico de *F. verticillioides* perante a variabilidade genética, identificando seus marcadores e conseqüente dedução das características inter e intraespecíficas da espécie; estes fatores também poderiam afetar a expressão gênica referente à habilidade de produzir fumonisinas.

O fato abriria perspectiva ao controle alternativo de *F. verticillioides* e a redução dos riscos das fumonisinas através de um sistema com híbridos mais resistentes ao ataque de *Fusarium*, associado a técnicas de plantio, adubação, época de colheita e manejo na pós-colheita pelo melhoramento genético.

O trabalho visou avaliar ou medir a contaminação fúngica, o nível de fumonisinas e análise bromatológica em amostras de milho de três safras consecutivas, oriundas sistemas de plantio direto e convencional em pousio e rotação de cultivo com aveia, suplementados com nitrogênio (0 a 90 Kg/ha), potássio (22 Kg/ha) e cálcio (40 Kg/há).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar variabilidade genética de *Fusarium verticillioides*, nível de fumonisinas e análise bromatológica de amostras de milho de três safras consecutivas, produzidas em plantio direto, convencional, pousio, rotação com aveia, com diferentes dosagens de nitrogênio, potássio e cálcio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a contaminação de *Fusarium verticillioides* e a produção de fumonisinas em:
 - Plantio direto sobre aveia sem aplicação de N₂ em cobertura;
 - Plantio direto sobre aveia com aplicação de 22,5 a 90 Kg/ha de N₂ em cobertura;
 - Plantio direto sobre aveia com aplicação 90 Kg/ha de N₂ em cobertura
 - + K⁺;
 - Plantio direto sobre aveia com aplicação de 90 Kg/ha de N₂ em cobertura + Ca⁺²;
 - Plantio direto sobre pousio sem aplicação de N₂ em cobertura;
 - Plantio direto sobre pousio com aplicação de 22,5 a 90 Kg/ha de N₂ em cobertura;

- Plantio direto sobre pousio com aplicação de 90 Kg/ha de N₂ em cobertura + K⁺;
 - Plantio direto sobre pousio com aplicação de 90 Kg/ha de N₂ em cobertura+ Ca⁺²;
 - Plantio convencional sobre aveia sem aplicação N₂ em cobertura;
 - Plantio convencional sobre aveia com aplicação de 22,5 a 90 Kg/ha de N₂ em cobertura;
 - Plantio convencional sobre aveia com aplicação de 90 Kg/ha de N₂ em cobertura + K⁺;
 - Plantio convencional sobre aveia com aplicação de 90 Kg/ha de N₂ em cobertura + Ca⁺²;
 - Plantio convencional sobre pousio sem aplicação N₂ em cobertura;
 - Plantio convencional sobre pousio com aplicação de 22,5 a 90 Kg/ha de N₂ em cobertura;
 - Plantio convencional sobre pousio com aplicação de 90 Kg/ha de N₂ em cobertura + K⁺;
 - Plantio convencional sobre pousio com aplicação de 90 Kg/ha de N₂ em cobertura + Ca⁺²;
- Correlacionar os níveis de fumonisinas ao teor de umidade, atividade d'água composição bromatológica do grão de milho;
 - Analisar, através de RAPD, a variabilidade genética existente entre as cepas de *Fusarium verticillioides* isoladas das amostras de milho

submetidas aos seguintes a tratamentos agronômicos extremos: plantio direto sobre aveia sem aplicação de N_2 para cobertura; plantio direto sobre aveia com 100% da dose de $N_2 + K^+$; plantio direto sobre aveia com 100% da dose de $N_2 + Ca^{+2}$; plantio convencional sobre pousio sem aplicação de N_2 para cobertura; plantio convencional sobre pousio com 100% da dose de $N_2 + K^+$; plantio convencional sobre pousio com 100% da dose de $N_2 + Ca^{+2}$.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE MILHO NO PARANÁ

O milho é um cereal de destaque no Estado do Paraná, consagrado como maior produtor nacional desde a década de 70, correspondendo a 27% da produção brasileira (PARANÁ/SEAD, 2002). A produção paranaense envolve cerca de 230 mil produtores, gerando aproximadamente 70 mil empregos diretos no campo, sem considerar o complexo industrial e empregos indiretos advindos da cadeia produtiva de milho (PARANÁ/IAPAR, 2002b).

A ampla adaptação da espécie permite o cultivo do milho em todas as regiões fisiográficas do Estado do Paraná, principalmente nas Regiões: Sul, Norte e Sudoeste, onde se concentram a produção e também as atividades pecuaristas (PARANÁ/IAPAR, 2002). O mesmo Estado figura como abastecedor tradicional de milho a outros Estados brasileiros, destinando o volume de até 30%, sendo a maioria destinada a atividades pecuaristas, com ênfase a avicultura e suinocultura, que absorvem 42% do total ofertado (PARANÁ/IAPAR, 2002). A versatilidade de uso, com mais de 500 produtos derivados, o milho paranaense detém cerca de 47% da capacidade total de moagem brasileira, com destaque a fubá, farinha, farelo de milho, óleo bruto, refinado e ração, (PARANÁ/SEAD, 2002).

Não obstante, o milho é um excelente substrato para o crescimento fúngico, e conseqüente produção de micotoxinas, constituindo-se num dos pontos críticos de controle mais discutido na saúde humana e de animais (PLACINTA et al., 1999).

3.2 *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EM MILHO

O gênero *Fusarium* Link ex Fr. pertence à divisão Deuteromicotina, classe Hifomiceta, de ampla distribuição, ocorrendo em praticamente em todas as regiões geográficas do mundo (VENTURA, 2000). Em regiões temperadas, as espécies de *Fusarium* encontram-se seja no solo ou em materiais vegetais, produzindo uma variedade de micotoxinas, fitotoxinas, pigmentos e outros metabólitos (MARASAS, 1996). Membros do gênero *Fusarium* constituem patógenos de plantas economicamente importantes, causando prejuízos anuais de bilhões de dólares (AGRONEGÓCIOS, 2004).

As cinco principais espécies de *Fusarium* contaminantes em grãos e suas micotoxinas são: *F. graminearum* Schwabe (deoxivalenol, nivalenol e zearalenona); *F. sporotrichioides* Sherbakoff (tricoteceno T-2 e HT-2); *F. poae* (Peck) Wollenweber (diacetoxiscirpenol); *F. equiseti* (Corda) Saccardo (diacetoxiscirpenol); e *F. verticillioides* (fumonisinas) (JIMÉNEZ et al., 2000).

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) é o estágio anamórfico de *Gibberela fujikuroi* (Sawada) (Ito & Kimura), cujo complexo contém pelo menos oito espécies biológicas (mating populations). O'DONNELL et al. (1998) reconheceram 46 estirpes dentro da espécie distribuídas em oito 'mating population' designadas de A, B, C, D, E, F, G e H. As 'mating population' A e D produzem elevado nível de fumonisinas, enquanto que as outras produzem pouco, ou não são produtoras. Espécies biológicas pertencentes às populações A, D e E são encontradas no milho, com predominância da população A (*F. verticillioides*) e D (*F. proliferatum*) (LESLIE et al., 1992).

F. verticillioides apresenta 'cluster' (grupo) com 15 genes (FUM1 a FUM15) localizado no cromossomo 1, responsável pela biossíntese de fumonisinas (PROCTOR et al., 2003). Estudos recentes apontaram o envolvimento do gene policetida sintase como precursor da biossíntese de fumonisinas (PROCTOR et al., 1999).

F. verticillioides cresce numa ampla faixa de temperatura, mas somente em atividades d'água relativamente altas (aproximadamente 0,9) e teores de umidade acima de 22%. A produção de fumonisinas restrita aos períodos de pré-colheita e pré-secagem (FAO/WHO, 2001). Os níveis de fumonisinas aumentaram gradativamente com a maturação no campo, e exceto em condições extremas, a estocagem convencional dos grãos não constitui motivo de preocupação (FAO/WHO, 2004).

F. verticillioides não é patógeno exclusivo de milho, podendo ser detectado em sorgo, arroz, cana, banana, figo, manga, abacaxi e aspargo (JACKSON et al., 1996). O gênero pode ser definido como fungo de campo, devida capacidade de produzir toxinas em estágio de pré-colheita. Capaz de interagir com diferentes espécies de plantas, especula-se que grãos e fragmentos de plantas mortos serviriam como substrato para sua permanência no campo e, infectar uma cultura subsequente, produzindo toxinas (BULLERMAN & TSAI, 1994).

O ciclo de *F. verticillioides* em milho se inicia com a permanência em resíduos contaminados na pós-colheita. Os micélios desenvolvidos podem infectar as sementes no solo, desencadeando infecção sistêmica para o colmo, seguido de disseminação e atingir a espiga. Entretanto, a via de contaminação mais efetiva consiste na disseminação de macro e microconídios através do ar e gotículas de

chuva, que possibilita entrada de conídios pelos tecidos ou estigmas florais, atingindo diretamente o grão (MUNKVOLD et al., 1997). Conseqüentemente, no estudo de *F. verticillioides*, o emprego de cultura monoespórica é fundamental, já que a ocorrência de mais de um biótipo numa espiga de milho é um fato bastante freqüente.

Por outro lado, a existência de diferentes biótipos de *F. verticillioides* (mating population A a H), com predominância de determinado biótipo dependendo da planta susceptível, indica que condições de substrato e sistema de manejo (rotação de cultura, adubação, água) poderiam influir diretamente na competição entre diferentes biótipos desta espécie.

3.3 FUMONISINAS

As micotoxinas compreendem um amplo grupo de produtos oriundos de metabolismo secundário fúngico. A ocorrência global constitui o maior fator de risco, estimando-se contaminação em 25% da produção mundial de grãos (FINK-GREMMELS & GEORGIU, 1996; KUIPER-GOODMAN, 1998).

Fusarium spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Alternaria* spp., compõem os gêneros envolvidos na produção de micotoxinas, sendo aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, patulina, ácido tenuazônico, relatados como agentes que deveriam requerer atenção especial, para evitar contaminação através de produtos enquadrados na dieta principal (ABRAMSOM, 1997; D'MELLO & MAC DONALD, 1997; PANIGRAHI, 1997; SMITH, 1997).

Espécies toxigênicas de *Fusarium* também são reconhecidamente fitopatógenos, revelando-se produtor de inúmeros metabólitos, sendo descritos pelo menos 24 espécies de *Fusarium* associadas a problemas de saúde humana e/ou animais (MILLER & TRENHOLM, 1994).

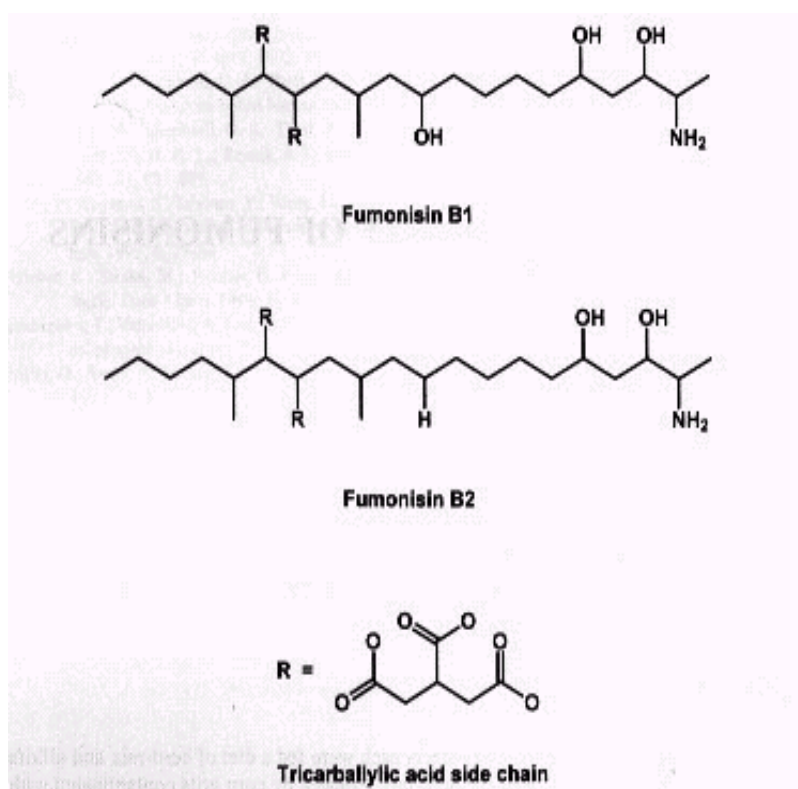
Micotoxinas de *Fusarium* spp. tem sido tradicionalmente associadas a regiões de clima temperado, devido a capacidade do fungo crescer em temperaturas baixas. Contudo, a descoberta de que as fumonisinas exercem efeito promotor de câncer, redirecionou o interesse para *Fusarium verticillioides* Sacc Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon), predominantes na região subtropical a tropical, devido a seriedade de contaminação do milho por esta micotoxina (VIQUEZ *et al.*, 1996; ONO *et al.*, 2000).

As fumonisinas pertencem ao grupo de fusariotoxinas descoberto em 1988 (GELDERBLOM *et al.*, 1998) e, constituem metabólito de *F. verticillioides* de maior toxicidade envolvido em intoxicações de animais (MARASAS, 1995). Atualmente são descritos 28 análogos de fumonisinas divididos em quatro grupos principais, denominados de A, B, C e P (RHEEDER *et al.*, 2002). Os análogos de fumonisinas B (FB) compreendem as fumonisinas toxicologicamente importantes: FB₁, FB₂ e FB₃, vindo a constituir os principais contaminantes naturais de milho e derivados, com FB₁ representando 70% do total de fumonisinas (MARASAS, 1996., RHEEDER *et al.*, 2002).

A FB₁ tem sido associada a doenças em animais, incluindo leucoencefalomalácea eqüina, edema pulmonar e hidrotórax em suínos, hemorragias gástricas e hepáticas em ratos (MARASAS *et al.*, 1984; GELBERBLOM *et al.*, 1998; PLATTNER *et al.*, 1990; ACKERMAN, 1991).

A FB₁ provavelmente esteja envolvida no desenvolvimento de câncer esofágico em humanos, sendo estatisticamente correlacionadas ao câncer esofágico de ratos em Traskei, África do Sul, assim como os estudos tentam associar o consumo de milho ao desenvolvimento de câncer hepático primário humano (SYDENHAM et al., 1992; UENO, 2000).

Embora os limites legais para fumonisinas ainda não sejam estabelecidos, “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda 5, 10, 50 e 50 µg/g para rações de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997). A Suíça recomenda o limite de 1 µg/g para os derivados de milho destinados ao consumo humano (VISCONTI & BOENKE, 1995). “Food and Drug Administration” (FDA) recomenda para o consumo humano, o nível de 2,0 mg.Kg⁻¹ de fumonisinas (FB₁+FB₂+FB₃) para farelos de milho, 3,0 mg.Kg⁻¹ para milho de pipoca e 4,0 mg.Kg⁻¹ para milho destinado à produção de massas (AVANTAGGIATO et al., 2002).



Devido à estrutura esfingolípídica, as fumonisinas prejudicam a síntese de ceramida, inibindo a N-acetil-transferase-esfinganina (ceramida

sintetase), resultando no aumento desproporcional da concentração intracelular de esfinganina (FINK-GREMMELE, 1999). A semelhança da estrutura química da fumonisinas com a esfingosina, que constitui o esqueleto eixo da molécula de esfingomielina, afeta o metabolismo de esfingolípídeos inibindo competitivamente a atividade da esfingosina N-acetil-transferase (ceramida sintetase), responsável pela acilação da esfinganina e esfingosina (SWEETLEY, 1991; WANG et al., 1991; BELL et al., 1993). A inibição causa rápido acúmulo de esfinganina e esfingosina “in vitro”, em contraste ao esgotamento de esfingolípídeo e evidente efeito sobre proliferação e diferenciação celular regulada pela apoptose, desencadeando indiretamente a ação promotora de câncer (WANG et al., 1991) (Figura 1).

Rações contaminadas por fumonisinas causaram lesões hepáticas, gastrointestinais, cerebrais e pulmonares em animais, assim como produtos a base de milho contaminados induziram a leucoencefalomalácia eqüina (ELEM) (PLACINTA et al., 1999). Casos de ELEM confirmados na Hungria, Brasil, África do Sul, Estados Unidos e em outros países tem sido atribuídos à atividade de fumonisinas, cuja doença caracteriza-se pela desordem neurológica fatal aguda em eqüinos, com ataxia, hipersensibilidade, desordens locomotoras e lesão cerebral com necrose liquefativa (GOEL et al., 1996).

Elevados valores de FB₁ foram relatados em amostras de milho da China e da Tailândia, onde detectou-se a co-ocorrência de AFB₁ (aflatoxina B₁) em 85 % das amostras. A contaminação simultânea de milho com fumonisinas e AFB₁ também ocorreu na região norte do Vietnã, enquanto que em Filipinas, Tailândia e Indonésia, a FB₁ e FB₂ ocorreram em mais de 50% do milho, sendo a co-ocorrência com aflatoxinas detectada em 48 (PLACINTA et al., 1999).

Desconhece-se a repercussão da co-ocorrência de aflatoxinas/fumonisinias, porém salienta-se que a presença simultânea de um carcinógeno primário (aflatoxina) com um promotor (fumonisina) poderia resultar no sinergismo, não devendo descartar o significado sob aspecto epidemiológico (PLACINTA *et al.*, 1999).

3.4 PATOGENICIDADE DE *F. VERTICILLIOIDES* EM GRÃOS

Fatores ambientais como temperatura, níveis de umidade e de nutrientes exercem ampla influência sobre o desenvolvimento de fitopatógenos, indicando a necessidade de adotar práticas agrícolas adequadas em relação à instalação e condução da cultura (PASCHOLATI & LEITE, 1994). A exemplo, a correção de acidez do solo pode contribuir com melhor absorção de nutrientes, tornando a planta vigorosa e menos suscetível ao ataque de patógenos (AGRIOS, 1978).

Os patógenos podem atacar os grãos através da produção de enzimas capazes de favorecer a penetração e clivagem de polímeros orgânicos, assim como produzir toxinas capazes de debilitarem funções de permeabilidade celular e síntese de reguladores de crescimento (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Os elementos minerais requeridos para o desenvolvimento das plantas aumentam ou reduzem a severidade de ataque dos patógenos (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993). Segundo MARSCHNER (1986), altas concentrações de N₂ aumentaram a severidade de infecção por parasitas obrigatórios, mas observou-se um efeito oposto com parasitas facultativos representados por *Alternaria* spp. e

Fusarium spp. As respostas contraditórias basearam-se nos requerimentos nutricionais, já que os parasitas obrigatórios requerem células vivas, enquanto que facultativos são semisaprófitas e preferem tecidos em senescência. No geral, todos os fatores capazes de manter a integridade de atividades celulares do hospedeiro e atrasam a senescência da planta hospedeira, aumentam a resistência a parasitas facultativos. Por outro lado, o excesso de N_2 reduziu a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de fenóis.

Deficiência em N_2 podem aumentar a suscetibilidade das plantas a murcha causada por *Fusarium* spp. em tomate, solanáceas, assim como murcha por *Pseudomonas solanacearum* e *Sclerotium rolfsii* (AGRIOS, 1978).

Dentre os sais de K^+ utilizados na agricultura, o KCL confere maior resistência contra doenças. Outrossim, os mecanismos pelos quais o K^+ afeta as doenças causadas por patógenos diferem amplamente e, incluem efeitos diretos e indiretos, sendo que os diretos estimulam ou reduzem a penetração, multiplicação e sobrevivência do patógeno no hospedeiro (PALTI, 1981).

3.5 SISTEMAS DE PLANTIO

O sistema de semeadura e rotação de culturas tem grande importância no controle fitossanitário na cultura de milho, já que as práticas agrícolas atuam diretamente nas características químicas e biológicas do solo e conseqüentemente, na micoflora contaminante do cereal (ZAMBOLIN & VENTURA, 1993).

Na cultura do milho empregam-se dois sistemas de semeadura: direta ou convencional. Na semeadura direta não ocorre aração do solo e conseqüentemente existe maior retenção de umidade no solo e decomposição mais lenta e gradativa dos restos culturais (MUZILLI, 1991). A semeadura em plantio direto (PD) se procede no solo não revolvido (sem prévia aração ou gradagem leve niveladora), empregando semeadeiras que abrem um pequeno sulco ou cova, capaz de garantir a cobertura e contato da semente com o solo (REGIÃO SUL DO BRASIL: EMBRAPA TRIGO, 2002).

No plantio convencional usa-se de aração e gradagem, cujo maior benefício consiste no controle de plantas daninhas através de revolvimento do solo. A planta de interesse (ex. milho, trigo) cresce livre de concorrência por água e nutrientes. No plantio convencional procede-se a semeadura entre 3 a 6 dias após chuva, enquanto que no plantio direto este período de plantio é entendido tempo de 2 a 12 dias, resultando no melhor aproveitamento de épocas de plantio, principalmente quando ocorrem chuvas esparsas (EPAGRI, 2002).

O plantio direto (PD) foi introduzido no Brasil no início dos anos setenta, na Região Sul. A seguir, a crescente adoção pelos agricultores permitiu alastrar-se até a região dos cerrados, totalizando numa área agrícola aproximada de 9 milhões de hectares (REGIÃO SUL DO BRASIL: EMBRAPA TRIGO, 2002).

Nos Estados Unidos da América, o sistema PD reduziu as perdas de solo por erosão em 93%, a de água em 69% e a de insumos em 70% (FAWCETT, 1997). Seguindo consenso mundial, o PD não afetou as águas subterrâneas e incorporou grande efeito benéfico para as águas superficiais (FUNDAÇÃO ABC, 2002).

Comparando os sistemas de plantio direto e convencional, perante adubação, no PD existe acúmulo de nutrientes na superfície, principalmente de fósforo devido à baixa mobilidade. O teor de carbono apresentou-se maior no sistema de PD também nas camadas mais profundas, devida redução da taxa de mineralização da matéria orgânica, associado ao aumento da biomassa resultante de atividade de flora/fauna do solo (Paraná/IAPAR, 2002a).

A consolidação da tecnologia de plantio direto pode acarretar mudanças consideráveis no sistema agrícola referente à disponibilidade d'água, temperatura, aeração, matéria orgânica, composição e microrganismos. Isto poderia desencadear alterações e mudanças na flora e nos microrganismos do solo afetando a susceptibilidade e/ou resistência das culturas, promover a seleção de espécies patogênicas e produtoras de toxinas.

3.6 RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLIMORFIC DNA)

Apesar da ampla distribuição e da grande importância econômica, o gênero *Fusarium* constitui um grupo taxonômico de difícil identificação (MARASAS, 1991), devida sua vasta variabilidade. Soma-se ainda a ocorrência de mutação, degeneração em subculturas repetidas e a existência de diversos sistemas taxonômicos para identificação de *Fusarium* spp. (GAN et al., 1997; ABRAMSON, et al., 1998).

Espécies de *Fusarium* são freqüentemente identificadas pela associação de técnicas de microscopia e da morfologia das colônias (NELSON et al, 1983). Na caracterização intra-específica utilizam-se os testes de patogenicidade

numa série de hospedeiros, determinação do grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) por experimentos pareados, ou por avaliação do perfil de capacidade de sistemas de produção de micotoxinas, ensaios estes que requerem tempo e necessidade de alta resolução para identificação individual dentro da população (JIMÉNEZ *et al*, 2000).

Os avanços na biologia molecular possibilitaram o desenvolvimento de marcadores moleculares, que detectam uma infinidade de locos polimórficos em genótipos individuais, permitindo avaliação direta de variação genética em populações. A técnica da reação de polimerase em cadeia-PCR baseia-se na amplificação *in vitro* de determinada seqüência de DNA utilizando DNA polimerase, cofatores e desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTP'S), oligonucleotídeo que flanqueiam a região alvo e pareiam-se às fitas opostas do DNA molde. A enzima Taq DNA polimerase (obtida de *Thermus aquaticus*) proporciona maior eficiência, eliminando a necessidade da adição de enzima a cada ciclo (WILLIAMS, 1990; GLIENKE, 1995).

A técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) é uma estratégia alternativa apresentando alta sensibilidade para geração de uma classe polimórfica de marcadores moleculares, i.e. capaz de detectar diferenças num único nucleotídeo sem necessidade de conhecimento de seqüências de DNA do organismo investigado (WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990). O RAPD identifica o grau de similaridade entre os genótipos, nos níveis inter e intra-específico. A técnica se baseia na amplificação de fragmentos não específicos de DNA, cuja estratégia utiliza oligonucleotídeos de 10-15 bases como iniciadores para amplificar o DNA genômico, através de PCR (SAIKI *et al.*, 1985).

Os marcadores RAPD proporcionam maior rapidez na análise, assim como mapeam regiões do genoma inacessíveis a análise por 'restriction fragment length polymorphism'-RFLP (MICHELMORE et al., 1991; WILLIAMS *et al.*, 1990; 1993; WANG *et al.*, 1993). O RAPD não envolve radioatividade na hibridação e utiliza pequena quantidade de DNA sem exigir alto peso molecular (MANULIS et al., 1994), além de detectar maior número de marcadores do que RFLP (WILLIAMS et al., 1990; MEGNEGNEAU et al., 1993).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Milho

Os cultivares de milho foram conduzidos em Londrina – Pr, na área de produção tradicional de agricultura pertencente à Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina. A semeadura empregada foi do tipo direta e convencional, semeando seis sementes/metro linear dos híbridos P30F80, AG-303 e Dekalb 333B. Foram avaliados os efeitos do pousio de cultivo de aveia no período de inverno, semeadura direta e convencional e adubação com 0; 22,5; 45 e 90 Kg/ha de nitrogênio em cobertura. 90 Kg/ha de nitrogênio + potássio (22 Kg de cloreto de potássio/ha); 90 Kg/ha de nitrogênio + pulverização de cálcio (40 Kg de cloreto de cálcio/ha) no florescimento. A DNRC foi de 90 Kg/ha tendo como fonte de nitrogênio a uréia (Tabela 1).

As unidades experimentais constituíram-se de quatro linhas de 5m e espaçamento de 0,90 entre linhas, totalizando 24 parcelas para cada sistema de semeadura por safra (Anexo 1).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Análise das Amostras

Para análise da micoflora contaminante, contaminação natural por fumonisinas, umidade, atividade de água, composição bromatológica das amostras de milho e variabilidade genética das cepas de *F. verticillioides* foram seguidas às etapas ilustradas na figura 2.

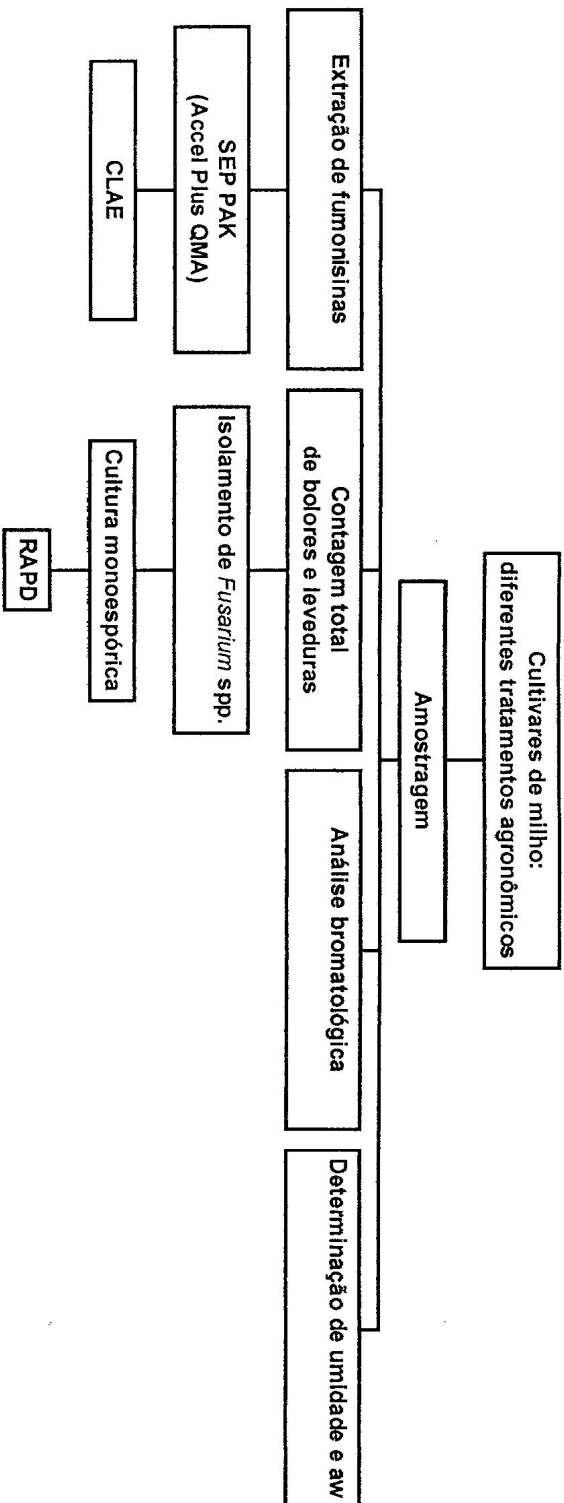


Figura 2. Metodologia experimental para avaliação da contaminação natural, produção de fumonisinas, umidade, atividade de água, composição bromatológica das amostras de milho e análise genética das cepas de *F. verticillioides*.

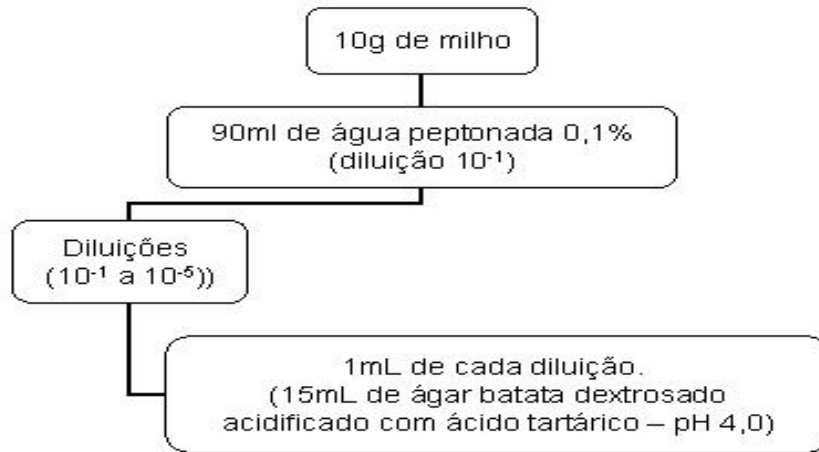


Figura 3. Delineamento experimental para avaliação da micoflora contaminante das amostras de milho.

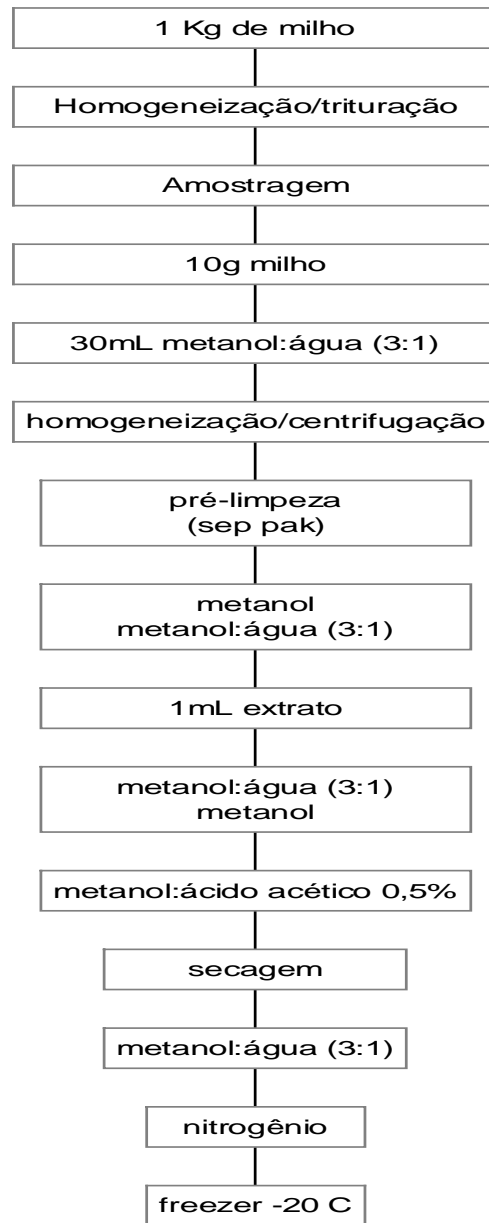


Figura 4. Fluxograma da extração de fumonisinas e método de pré-limpeza

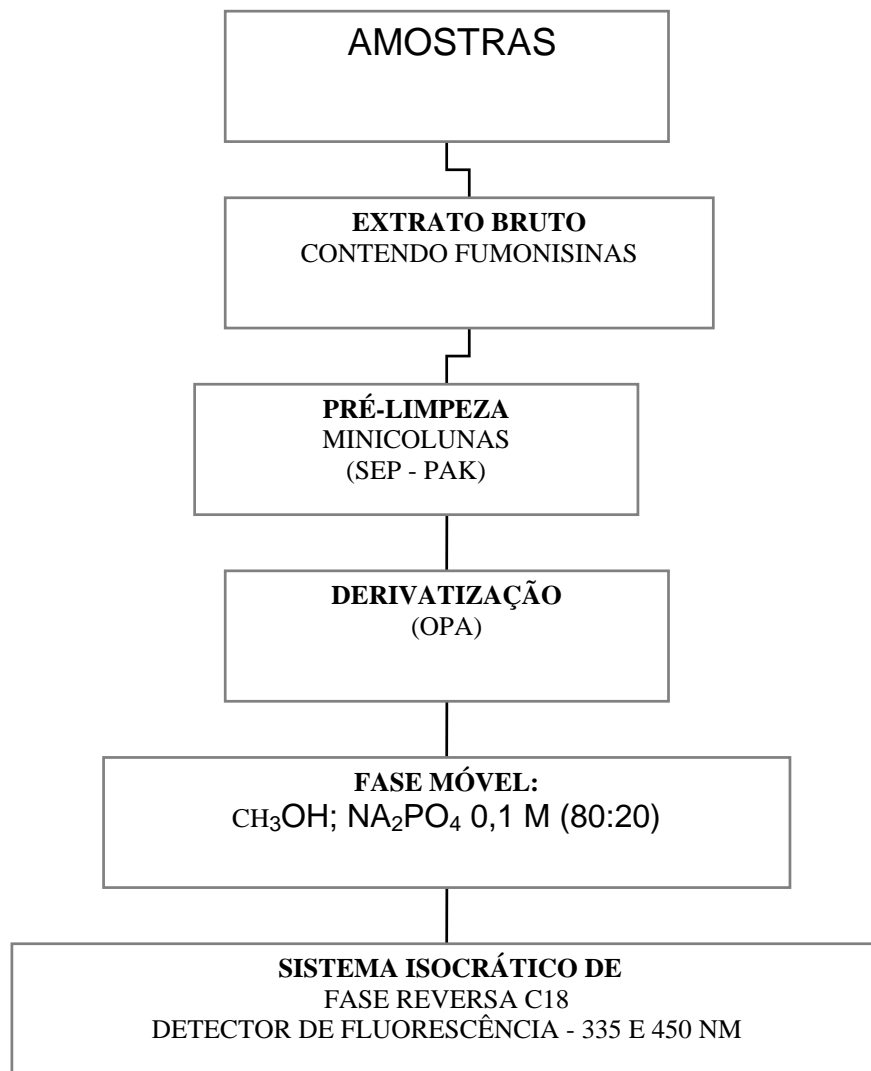


Figura 5. Fluxograma do método de CLAE (Shephard et al., 1990, modificado por Ueno et al., 1993).

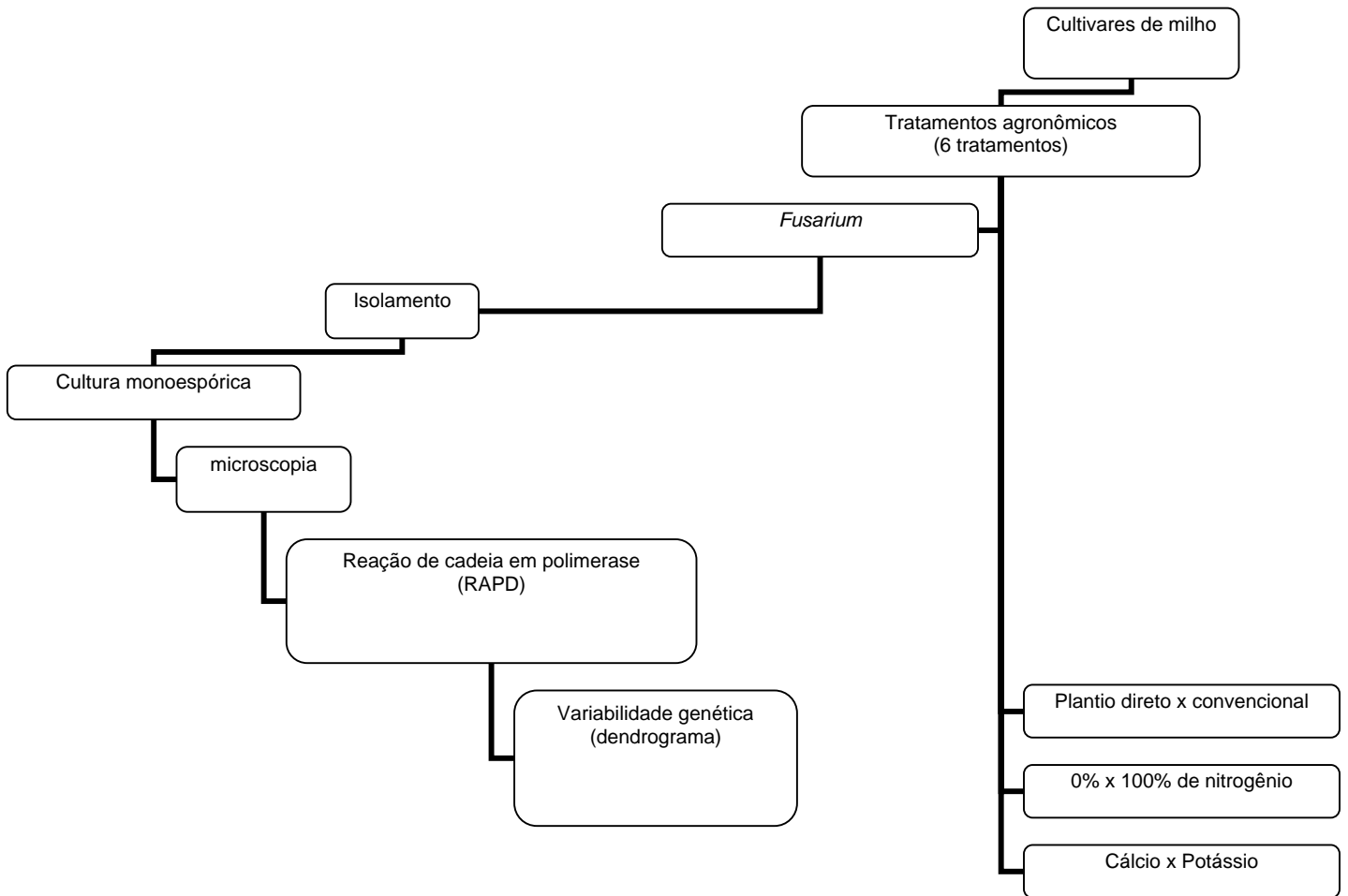


Figura 6. Delineamento experimental para obtenção dos isolados de *Fusarium verticillioides*, com base no tratamento agrônômico empregado e pureza da colônia visando à caracterização genética por RAPD.

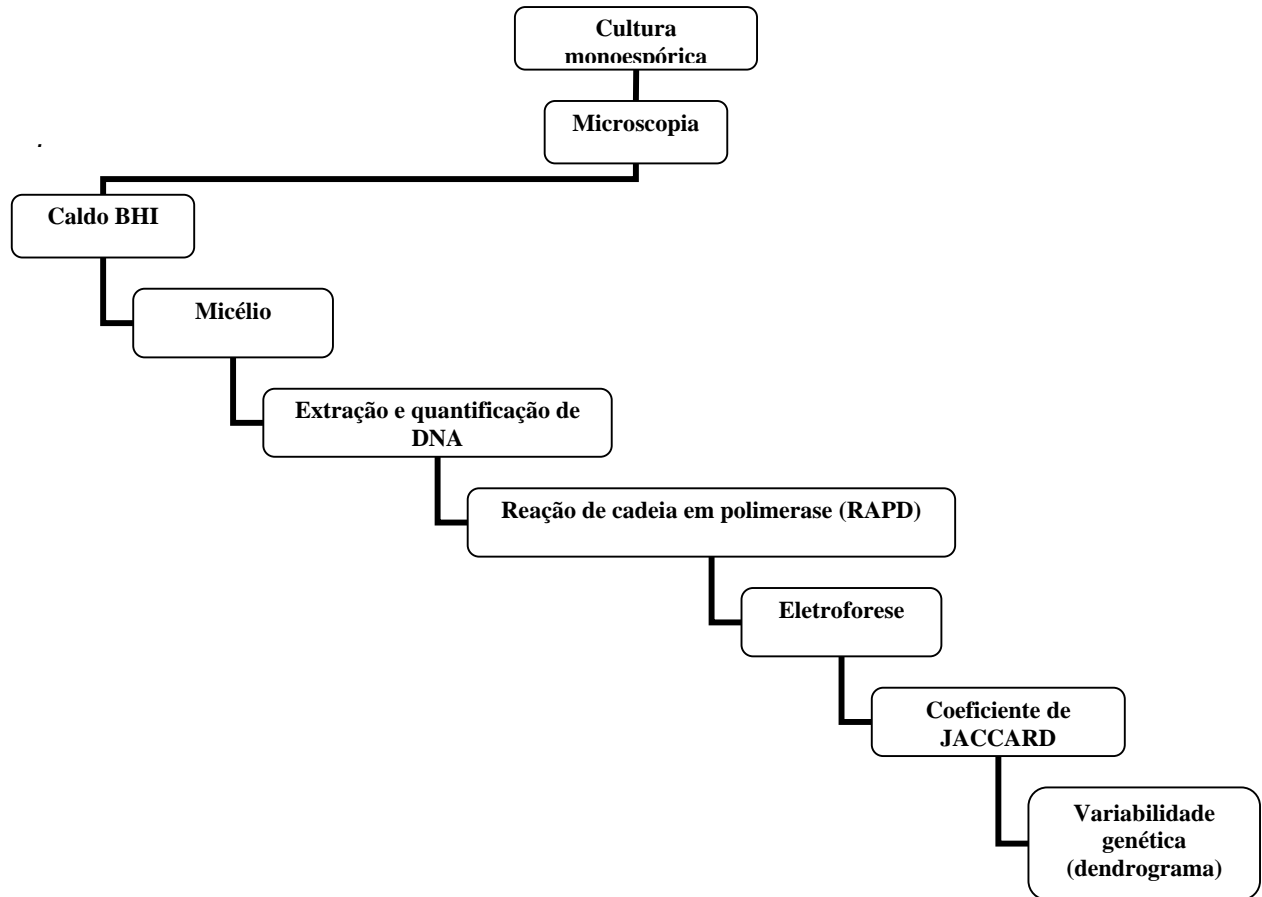


Figura 7 Delineamento experimental para cultura fúngica, extração e amplificação de DNA e análise genética das linhagens de *F. verticillioides*

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram descritos no formato de artigo científico, os quais encontram-se listados abaixo:

1) INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE PLANTIO E DA ADIÇÃO DE FERTILIZANTES NA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E NA PRODUÇÃO FUMONISINAS EM MILHO.

2) ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Fusarium verticillioides* ISOLADOS DE MILHO SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE PLANTIO.

CAPÍTULO I: INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE PLANTIO E DA ADIÇÃO DE FERTILIZANTES NA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA E NA PRODUÇÃO FUMONISINAS EM MILHO

1 INTRODUÇÃO

Sendo o Estado do Paraná o maior produtor de milho brasileiro e, que os produtos de origem agropecuária da região destinam-se ao consumo em todo o território nacional, o controle de patógenos fúngicos torna-se imprescindível, visando minimizar micotoxinas na cadeia alimentar. Em adição ao controle de qualidade no setor industrial, um fator primordial seria evitar a contaminação desde o campo empregando milho resistente (mecanismos naturais de defesa), ou procedimento prático e econômico, com destaque ao manejo de cultivo, i.e. associação entre sistemas de plantio, adubação e rotação de culturas (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000; FIGUEIRA et al., 2003).

Uma nutrição mineral balanceada permite produtividade adequada e protege a cultura contra ataque de patógenos, já que condição inadequada facilita a instalação de doenças e aumentam a severidade, estando a tolerância de planta a íons diretamente ligada aos nutrientes requeridos pelos patógenos (PALTÍ, 1981; REIS et al., 1995). O nitrogênio proporciona maiores rendimentos a grãos influenciando também na qualidade e teor de proteína (REIS et al., 2000). Todavia, este íon favorece o desenvolvimento de doenças devido a alterações no ambiente do solo e no crescimento da plantas, sendo que no milho, o amônio acidifica o pH e aumenta a severidade da doença (ZAMBOLIM & VENTURA, 1993).

O sistema de plantio (direto ou convencional) em rotação, aliado à adubação desempenha papel fundamental no controle fitossanitário no cultivo de milho, já que as práticas agrícolas atuam diretamente nas características químicas e

biológicas do solo (ZAMBOLIN & VENTURA, 1993). A monocultura favorece a sobrevivência e multiplicação dos patógenos, fornecendo maior inoculo e sítios de infecção próximos (ZAMBOLIN et al, 2000). A contaminação fúngica e conseqüente produção de micotoxinas são fatores principais na deterioração do milho (HIROOKA, 1996).

As fumonisinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos principalmente por *Fusarium verticillioides* Sacc Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon) e *F. proliferatum* (Matsushina) Nirenberg, patógenos de milho (SEO et al.; 2001). Esta micotoxina causa leucoencéfalomalácia eqüina, síndrome e edema pulmonar em suínos e câncer hepático em ratos, além da provável associação com o câncer esofágico humano em regiões onde a dieta rotineira baseia-se em milho e produtos derivados (ONO et al,; 2000).

Considerando que a contaminação de milho por micotoxinas na cadeia alimentar seja uma realidade de difícil controle, as medidas visando minimização da exposição dependem de um rigoroso controle e monitoramento seja no cultivo, colheita, armazenagem e processamento. Com o objetivo de avaliar a contaminação fúngica e os níveis de fumonisinas em milho submetido a diferentes tratamentos agronômicos (plantios direto e convencional, sobre pousio e rotação de aveia, com variação de 0 a 100% da dose de nitrogênio recomendada em cobertura, aliada à suplementação com potássio e cálcio), visando determinar a efetividade de prática agrícola no controle sanitário.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Delineamento Experimental1: ENSAIO NO CAMPO

3.1.1 Milho

Os híbridos comerciais P30F80, AG-303 e Dekalb 333B foram cultivados em safra normal dos anos 2000, 2001 e 2002, respectivamente. A semeadura foi conduzida na fazenda escola da Universidade Estadual de Londrina/Pr (Fazesc) foram semeadas seis sementes/metro linear. Os cultivares, totalizando em 24 por ano (6 plantios direto sobre aveia, 6 plantios convencional sobre aveia, 6 plantios direto sobre pousio e 6 plantios convencional sobre pousio) e 72 no total . Foram avaliados os efeitos do pousio de cultivo de aveia no período de inverno, semeadura direta e convencional e adubação com 0; 22,5; 45 e 90 Kg/ha de nitrogênio em cobertura. 90 Kg/ha de nitrogênio + potássio (22 Kg de cloreto de potássio/ha); 90 Kg/ha de nitrogênio + pulverização de cálcio (40 Kg de cloreto de cálcio/ha) no florescimento. A DNRC foi de 90 Kg/ha tendo como fonte de nitrogênio a uréia (Tabela 1)

As unidades experimentais constituíram-se de quatro linhas de 5m e espaçamento de 0,90 entre linhas, totalizando 24 parcelas para cada sistema de semeadura. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao caso, com quatro repetições (Anexo1).

Tabela 1. Tratamentos agronômicos para o plantio de milho

Número	Simbologia	N ₂ (Kg/ha)	K ⁺ (Kg/ha)	Ca ⁺⁺ (Kg/ha) *
1	PDA – 1	0	-	-
2	PDA – 2	22,5	-	-
3	PDA – 3	45,0	-	-
4	PDA – 4	90,0	-	-
5	PDA – 5	90,0	22,0	-
6	PDA – 6	90,0	-	40,0
7	PCA – 7	0	-	-
8	PCA – 8	22,5	-	-
9	PCA – 9	45,0	-	-
10	PCA – 10	90,0	-	-
11	PCA – 11	90,0	22,0	-
12	PCA – 12	90,0	-	40,0
13	PDP – 1	0	-	-
14	PDP – 2	22,5	-	-
15	PDP – 3	45,0	-	-
16	PDP – 4	90,0	-	-
17	PDP – 5	90,0	22,0	-
18	PDP – 6	90,0	-	40,0
19	PCP – 7	0	-	-
20	PCP – 8	22,5	-	-
21	PCP – 9	45,0	-	-
22	PCP – 10	90,0	-	-
23	PCP – 11	90,0	22,0	-
24	PCP – 12	90,0	-	40,0

Legenda: **PDA:** Plantio Direto em aveia; **PCA:** Plantio Convencional em aveia; **PDP:** Plantio Direto sob pousio; **PCP:** Plantio Convencional sob pousio; **DRNC:** dose recomendada de nitrogênio para cobertura; (*) no florescimento.

3.2 Delineamento Experimental 2: ENSAIO NO LABORATÓRIO

3.2.1 Análise das amostras

Para a análise da contaminação natural, produção de fumonisinas, umidade, atividade de água, composição bromatológica das amostras de milho e variabilidade genética das cepas de *F. verticillioides*, foram seguidas as etapas ilustradas na figura 2.

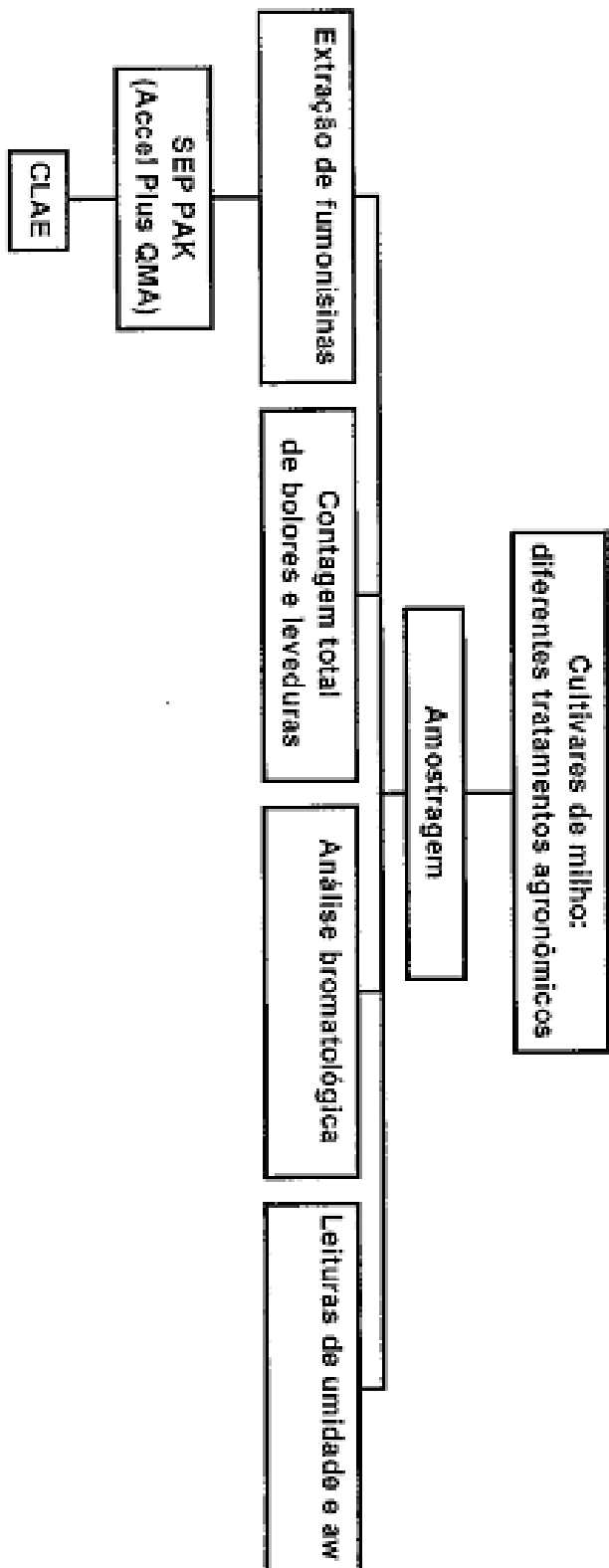


Figura 2. Metodologia experimental para avaliação da contaminação natural, produção de fumonisinas, umidade, atividade de água e composição bromatológica das amostras de milho.

3.2.2 Contagem total de bolores e leveduras

Para contagem total de bolores e leveduras as amostras de milho foram trituradas, diluídas em água peptonada e inoculadas em placas de Petri pela técnica “*pour plate*”, conforme descrito na figura 3.

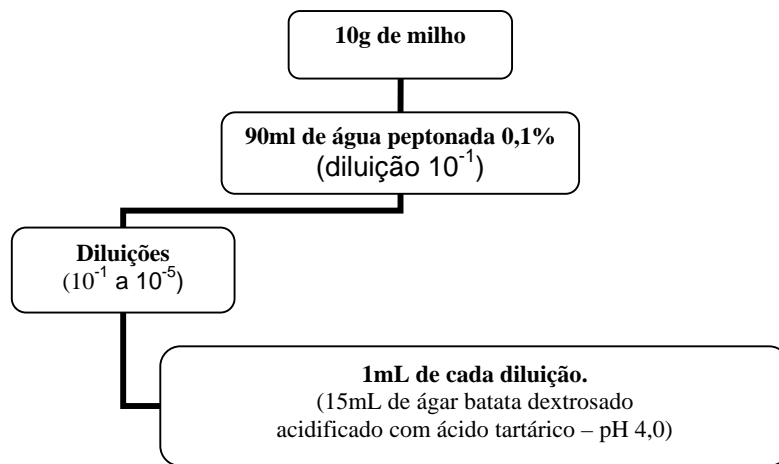


Figura 3. Metodologia experimental para avaliação da contaminação fúngica das amostras de milho.

3.2.2 Análise bromatológica

A análise bromatológica constituída de composição centesimal de proteína, lipídios e cinzas visou determinação do efeito de características climáticas e da suplementação mineralológica do solo nos componentes nutricionais básicos das amostras.

A análise bromatológica foi realizada segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.2. 4 Determinação de umidade do milho

A umidade foi determinada por radiação no infravermelho. O através do aparelho OHAUS – MB 200.

3.2.5 Determinação da atividade de água

A atividade de água das amostras de milho foi determinada instrumentalmente pelo aparelho AQUA LAB CX-2, da Decagon Devices Inc.

3.2. 6 Fumonisinias

3.2.6.1 Determinação de fumonisinias

Para a extração de fumonisinias FB₁ e FB₂ foram utilizados 10g de amostra de milho triturada e adicionado 30 mL solução metanol: água (3:1): após repouso (5 minutos), agitação (150 rpm por 30 min.) centrifugação (10.000 rpm por

10 min.) e filtragem em papel filtro, houve o condicionamento da mini coluna Sep Pak, com 5 mL de metanol e posteriormente mais 5 mL de solução metanol:água (3:1). A purificação, após passagem de 1mL de extrato filtrado, foi realizada com metanol:água (3:1) e em seguida com metanol. A eluição empregada com solução metanol: ácido acético (99:1) foi recolhida e evaporada até secagem a 40°C, redissolvida com 1 mL de metanol e seca novamente nas mesmas condições descritas anteriormente e por último redissolvida com 2 mL de metanol:água (3:1) coletada e seca por intermédio de nitrogênio gás a 60°C e estocada em freezer até o uso (Figura 4).

Antes de injetar as amostras no cromatógrafo líquida de alta eficiência (CLAE), procedeu-se a derivatização de 100 µL da amostra (anteriormente ressuspensa em acetonitrila: água 50:50) com 200 µL da solução O-phthaldialdeído (OPA – 0,02g, 500 µL de metanol, 2,5 mL de 0,1 M de tetraborato de sódio e 25 µL de 2-mercaptoetanol), por no máximo 1 minuto. A detecção das fumonisinas foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando-se cromatógrafo Shimadzu (Figura 4). Para separação foi utilizada coluna fase reversa C-18 (Nucleosil 100-5, 250 x 4,6 - Macherey-Nagel). Os derivados de fumonisinas FB₁ e FB₂ foram determinados em detector de fluorescência (Shimadzu RF 535), com comprimentos de onda de 335 e 450 (excitação e emissão, respectivamente). A fase móvel utilizada foi o sistema metanol: fosfato de sódio 0,1 M (4:1) com pH ajustado em 3,3 por intermédio de ácido orto-fosfórico. Com fluxo de 1mL/min, temperatura de coluna 20°C e pressão de 180 mmHg. Essa proporção permitiu a obtenção de pressão e viscosidade adequadas, com separação e tempo de retenção ótimo: t_r FB₁ = 6,5 – 7,0 min e t_r FB₂ = 11 – 11,5 min.

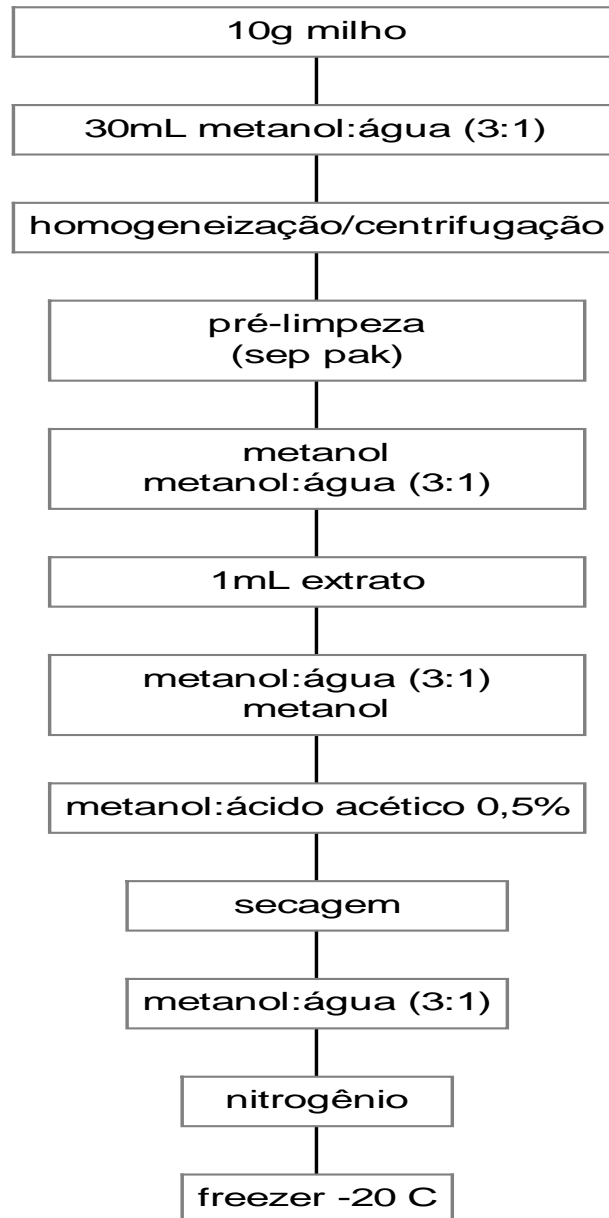


Figura 3. Fluxograma da extração de fumonisinas e método de pré-limpeza.

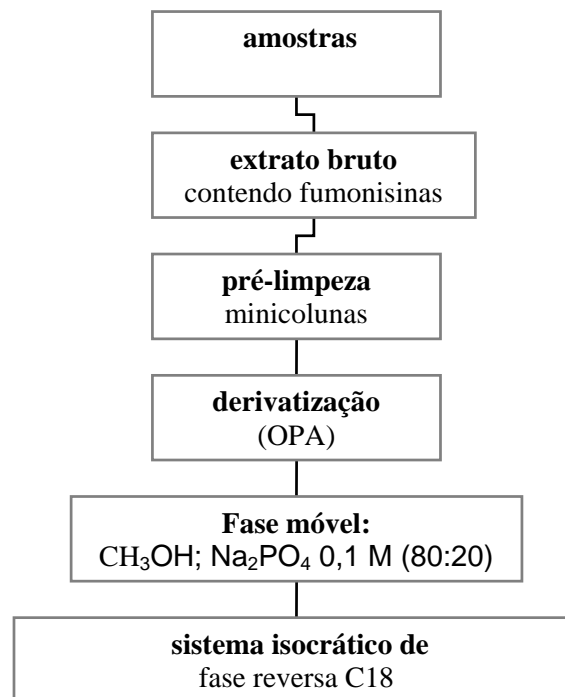


Figura 4 Fluxograma do método de CLAE (SHEPHARD et al., 1990 modificado por UENO et al., 1993).

3.2.7 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado para os ensaios foi inteiramente casualizado. Nos testes laboratoriais, cada repetição foi representada por triplicatas e as médias comparadas pelo teste de Tukey (0,05). Os dados foram analisados pelo programa “software Estatística versão 5.0”.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 2, 3 e 4 ilustram análises de 72 amostras de milho (24 por safra) provenientes de 3 safras consecutivas (2001, 2002 e 2003) submetidas a tratamentos agronômicos referentes ao sistema de plantio (direto X convencional), tipo de rotação de cultura (aveia x pousio) e adubação (0 a 100% da dose recomendada de nitrogênio, aliado à adição de potássio ou cálcio).

Na safra 2002 a contagem total de bolores e leveduras variou de $5,6 \times 10^3$ a $9,5 \times 10^5$ UFC/g (média $2,2 \times 10^5$ UFC/g). *Fusarium* spp. foi detectada em 100% das amostras analisadas, predominando em 50% destas com contagem variando de $2,4 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^6$ UFC/g (média $5,0 \times 10^5$ UFC/g). As leveduras predominaram em 9 amostras (34,5%) compreendendo uma contagem de $2,0 \times 10^3$ a $9,0 \times 10^5$ UFC/g (média $8,15 \times 10^4$ UFC/g). *Penicillium* spp. foi detectada em 58,3% das amostras, correspondendo de $1,0 \times 10^2$ a $6,8 \times 10^4$ UFC/g (média $5,35 \times 10^3$ UFC/g), predominando na amostra CP-8 com porcentagem de incidência 62% ($6,8 \times 10^4$ UFC/g). *Aspergillus* spp. foi detectada em 4 amostras (16,6%), com contagem variando de $2,0 \times 10^2$ a $3,0 \times 10^4$ UFC/g, sendo micoflora predominante em DP-6 com porcentagem de incidência 55% e contagem $2,1 \times 10^4$ UFC/g (média $5,05 \times 10^3$ UFC/g), conforme tabela 2.

Tabela 2: Micoflora contaminante e contaminação natural por fumonisinas (FB₁ e FB₂) de milho cultivado em áreas em sucessão a pousio ou aveia, semeado de forma convencional ou direta, com diferentes níveis de adubação nitrogenada de cobertura, em Londrina. Pr., safra 2002.

TRAT	MILHO							
	Total	Micoflora contaminante				Fumonisinas		
		Fus (%)	Pen (%)	Asp (%)	Lev (%)	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	Total (µg/g)
DA 1	2,86.10 ⁴	44	3	-	53	1,55	0,1	1,65
DA 2	7,2. 10 ⁴	35	3	-	62	3,59	1,47	5,06
DA 3	9,5.10 ³	68	6	-	26	1,62	0,12	1,74
DA 4	3,7.10 ⁵	100	-	-	-	3,44	1,37	4,81
DA 5	2,9.10 ⁵	66	-	-	34	0,76	ND	0,76
DA 6	3,6.10 ⁵	3	-	-	97	1,66	0,87	2,53
CA 7	1,7.10 ⁵	40	1	-	59	5,68	1,73	7,41
CA 8	9,1.10 ³	54	-	2	44	3,45	0,51	3,96
CA 9	1,5.10 ⁵	77	13	-	10	1,725	0,693	2,42
CA10	2,4.10 ⁵	87	-	12	1	1,55	0,21	1,76
CA11	3,7.10 ⁴	51	-	-	49	5,77	1,59	7,36
CA12	1,2.10 ⁴	26	-	-	74	2,33	0,54	2,87
DP 1	2,6.10 ⁴	9	30	-	61	3,83	1,44	5,27
DP 2	5,6.10 ³	43	4	-	53	1,22	0,51	1,73
DP 3	6,1.10 ⁴	100	-	-	-	1,08	0,6	1,68
DP 4	7,3.10 ⁴	82	-	-	18	2,32	1,34	3,66
DP 5	2,3.10 ⁴	49	9	-	42	6,3	2,93	9,23
DP 6	3,9.10 ⁴	31	1	55	13	2,75	2,11	4,86
CP 7	9,5.10 ⁵	5	-	-	95	1,52	ND	1,52
CP 8	1,1.10 ⁵	13	62	-	25	2,24	0,57	2,81
CP 9	1,010 ⁶	98	-	-	2	3,41	0,1	3,51
CP10	1,0.10 ⁵	1	1	-	98	0,465	0,258	0,26
CP11	1,9.10 ⁵	41	-	15	44	1,25	ND	1,25
CP12	9,3. 10 ⁵	86	-	-	14	3,71	1,3	5,01
Médias	2,5. 10⁵	50,4	5,5	3,5	40,1	2,73	0,85	3,58

Legenda: DA: Plantio Direto em aveia; CA: Plantio Convencional em aveia; DP: Plantio Direto sob pousio; CP: Plantio Convencional sob pousio; DRNC: dose recomendada de nitrogênio para cobertura; (*) no florescimento. 1: 0% N₂; 2: 25% N₂; 3: 50% N₂; 4: 100% N₂; 5: 100% N₂ + K⁺; 6: 100% N₂ + Ca⁺⁺; 7: 0% N₂; 8: 25% N₂; 9: 50% N₂; 10: 100% N₂; 11: 100% N₂ + K⁺; 12: 100% N₂ + Ca⁺⁺; ND: não detectado.

A tabela 3 mostra que a contagem total de bolores e leveduras nas amostras de milho pertencentes à safra 2003 variou de 2,0 x10⁴ a 2,2 x10⁶ UFC/g (média 2,30x10⁵ UFC/g). *Fusarium* spp. compôs micoflora predominante (11 a 100%) e contagem na faixa de 6,5x10³ a 4,2 x10⁵ UFC/g, com a exceção das amostras DA-3, DP-4, CP – 7 e CP-12 onde houve o predominância de *Penicillium* spp. (52%) e leveduras (50, 55 e 79%), respectivamente. *Penicillium* spp. foi detectada em 20 amostras (83,3%), correspondendo a contagem de 1,0 x10³ a 1,0 x10⁵ UFC/g.

Espécies de *Aspergillus* compuseram 20,8% das amostras analisadas com contagem variando entre $2,0 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^4$ UFC/g. As leveduras constituíram micoflora contaminante presente em 21 amostras (87,5%), compreendendo uma faixa de $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^6$ UFC/g.

Das 72 amostras de milho analisadas (safras 2000/2001, 2001/2002 e 2002/2003), 70 (97,2%) apresentavam-se contaminadas naturalmente por fumonisinas. Em milho proveniente de safra 2001 os níveis de contaminação por FB₁ variaram de ND a 2,97 µg/g (média 0,47 µg/g) e de ND a 2,56 µg/g (média 0,19 µg/g) para FB₂. Na safra 2002 a variação para FB₁ foi de 0,46 a 6,30 µg/g (média 2,73 µg/g) e de ND a 2,9 µg/g FB₂ (média 0,89 µg/g). As amostras de milho originárias da safra 2003 apresentaram níveis de contaminação de FB₁ oscilantes entre 0,04 a 10,64 µg/g (média 3,5 µg/g) e ND a 5,14 µg/g (média 1,83 µg/g) para FB₂ (tabela 4, gráfico 2).

Fato semelhante foi observado por HIROOKA et al. (1996) e ONO et al. (2000) que ao avaliar a incidência de fumonisinas em amostras de milho colhidas no Estado do Paraná, observaram contaminação próxima a 100%, detectando-se concentrações de até 10,59 µg/g para FB₁ e 10,31 µg/g para FB₂.

A análise estatística dos dados sobre contaminação natural de fumonisinas por teste de Tukey detectou diferença significativa de contaminação entre as safras 2001, 2002 e 2003 ($p < 0,05$). A safra 2003 apresentou a contaminação média de fumonisina total (5,33 µg/g) cerca de 32% superior, em relação a safra 2002 (3,62 µg/g) e 87% acima dos valores de contaminação da safra 2001 (0,66 µg/g) (tabela 4). ALEXANDER (1977) relatou especificação de fungos quanto a toxigenicidade, i.e. aumento gradativo do potencial decorrente de cultivo sucessivo realizado em mesma área.

Tabela 3: Micoflora contaminante, contaminação natural por fumonisinas (FB₁ e FB₂), análise bromatológica/atividade d'água de amostras de milho (híbrido Dekalb 333b) cultivado em áreas em sucessão ao pousio ou aveia, semeado de forma convencional ou direta, com diferentes níveis de adubação nitrogenada de cobertura, K⁺ e Ca²⁺, em Londrina, Pr., safra 2003.

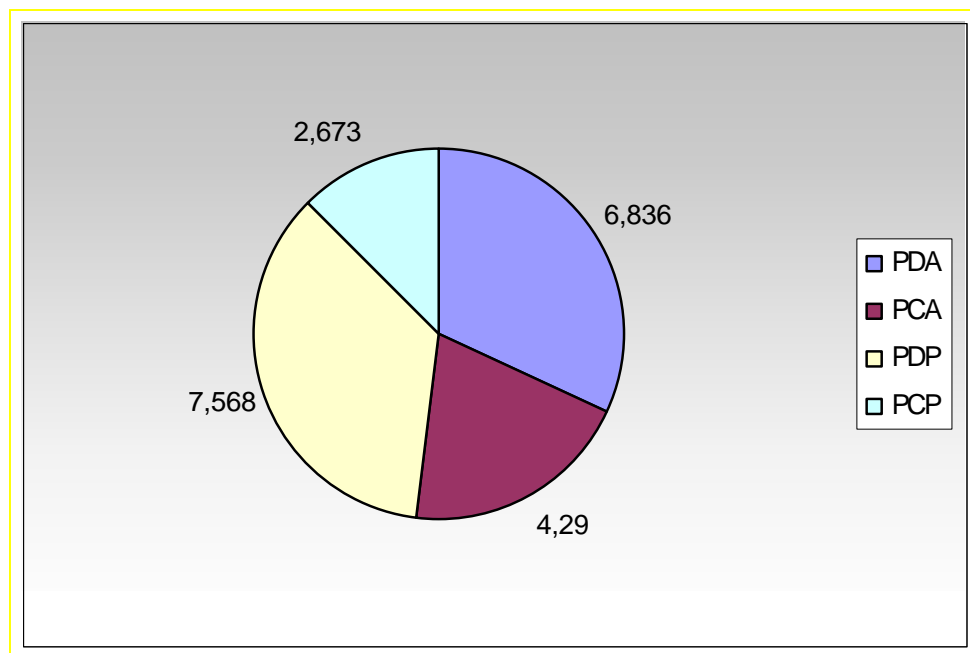
TRAT	Micoflora contaminante					MILHO		Análise físico-química (g%, P.S.)					Aw
	Total	Fus (%)	Pen (%)	Asp (%)	Lev (%)	FB ₁	FB ₂	Total	Lípidos (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Umidade (%)	
DA 1	2,3.10 ⁴	81	5	-	14	6,45	3,40	9,85	6,24	1,13	10,23	14,2	0,79
DA 2	1,7.10 ⁴	59	12	-	29	3,12	2,25	5,37	6,48	1,32	9,30	16,7	0,88
DA 3	2,1.10 ⁴	30	52	3	3	5,28	3,19	8,47	6,29	1,40	10,30	14,2	0,84
DA 4	4,1.10 ⁵	94	3	3	-	2,34	1,97	4,31	7,47	1,24	9,90	14,6	0,83
DA 5	3,1.10 ⁴	76	-	-	24	2,84	1,05	3,89	5,76	1,11	9,30	12,1	0,83
DA 6	2,7.10 ⁴	52	9	-	39	6,09	3,04	9,13	5,32	1,15	9,71	12,1	0,81
MÉDIAS	1,1.10⁵	65,3	13,5	1	18,2	4,3	2,5	6,8	6,3	1,2	9,8	14,0	0,8
CA 7	2,6.10 ⁵	80	4	-	36	2,08	1,04	3,12	6,11	0,79	9,07	11,8	0,75
CA 8	2,2.10 ⁴	62	13	-	25	3,31	2,56	5,87	5,75	1,07	8,32	14,3	0,83
CA 9	2,0.10 ⁴	57	2	-	41	0,39	ND	0,39	5,70	1,16	9,38	12,1	0,81
CA 10	4,7.10 ⁴	96	2	-	2	0,99	1,14	2,13	6,12	1,12	9,50	11,2	0,76
CA 11	2,4.10 ⁵	91	-	-	9	4,85	2,52	7,37	6,40	1,03	9,09	12,8	0,79
CA 12	6,1.10 ⁴	96	2	-	2	4,44	2,42	6,86	6,15	1,15	9,50	11,8	0,80
MÉDIAS	1,1.10⁵	77	3,8	0	19,2	2,7	1,9	4,3	6,1	1,1	9,1	12,3	0,8
DP 1	3,0.10 ⁴	90	3	-	7	2,72	1,89	4,61	5,86	1,10	8,70	13,2	0,80
DP 2	4,6.10 ⁴	93	2	-	5	1,76	0,07	1,85	5,96	0,95	7,91	13,3	0,81
DP 3	6,7.10 ⁴	87	13	-	-	2,59	0,18	2,77	6,94	1,13	7,91	12,7	0,80
DP 4	2,9.10 ⁵	43	7	-	50	10,64	5,14	15,80	6,43	0,80	7,52	12,8	0,80
DP 5	2,6.10 ⁵	93	5	-	2	7,78	2,8	10,60	5,76	0,97	8,31	11,7	0,80
DP 6	3,4.10 ⁴	84	3	-	13	6,25	3,57	9,82	6,43	1,11	7,91	12,1	0,77
MÉDIAS	1,1.10⁵	81,6	5,5	0	5,3	2,3	2,3	7,6	6,2	1,0	8,0	12,6	0,8
CP 7	2,2.10 ⁶	33	6	-	55	3,93	3,01	6,94	5,31	1,40	9,89	10,1	0,72
CP 8	5,5.10 ⁴	33	14	2	51	1,37	ND	1,37	6,28	1,22	7,92	14,1	0,78
CP 9	2,7.10 ⁵	73	7	10	10	2,67	2,52	5,19	6,80	1,41	9,48	12,2	0,80
CP 10	4,0.10 ⁵	67	-	-	33	0,73	ND	0,73	6,35	1,12	7,91	11,1	0,78
CP 11	4,4.10 ⁵	100	-	-	-	0,04	ND	0,04	6,04	1,19	9,30	12,5	0,78
CP 12	9,6.10 ⁴	11	8	2	79	1,15	0,62	1,77	6,07	1,23	9,30	12,2	0,79
MÉDIAS	6,2.10⁵	52,8	5,8	2,3	36,0	1,6	1,0	2,6	6,1	1,3	9,0	12,0	0,8
Média total	2,4.10⁵	69,2	7,2	0,8	22	3,5	1,8	5,3	6,2	1,1	9,0	12,7	0,8

Legenda: DA: Plantio Direto em aveia; CA: Plantio Convencional em aveia; DP: Plantio Direto sob pousio; CP: Plantio Convencional sob pousio; DRNC: dose recomendada de adubação para cobertura; (*) no florescimento; 1: 0% N₂; 2: 25% N₂; 3: 50% N₂; 4: 100% N₂; 5: 100% N₂ + Ca²⁺; 6: 100% N₂ + Ca²⁺; 7: 0% N₂; 8: 2% N₂; 9: 50% N₂; 10: 100% N₂; 11: 100% N₂ + K⁺; 12: 100% N₂ + Ca²⁺; Fus: *Fusarium* spp.; Pen: *Penicillium* spp.; Asp: *Aspergillus* spp.; Lev: leveduras; ND: não detectado.

CAPÍTULO I: Influência do sistema de plantio e da adição de fertilizantes na contaminação fúngica e na produção de fumonisinas em milho

Os resultados sugeriram que no milho cultivado sob sistema de semeadura direta, independentemente da safra analisada, tipo de adubação e rotação de cultura, ocorreu maior contaminação de fumonisinas (tabela 4, gráficos 1 e 2). Segundo PALTI (1981) a prática agrícola de semeadura direta tem efeito sobre a sobrevivência, multiplicação e infecção dos fitopatógenos na cultura. Por isso, em geral, as doenças e ocorrência de parasitas da agricultura, como o *Fusarium*, são mais severas sob o plantio direto do que quando os restos culturais são parcial ou totalmente incorporados ao solo (plantio convencional). E a semeadura direta associada à monocultura, favorece um aumento da intensidade de podridões da espigas de milho causada por *Fusarium sp.* (FLETT E WEHNER, 1991).

Figura 1: Percentagem de contaminação natural por fumonisinas de milho (híbrido Dekalb 333b) cultivado em áreas em sucessão a pousio ou aveia, semeado de foram convencional ou direta, com diferentes níveis de adubação nitrogenada de cobertura, em Londrina. Pr., safra 2003.



ONDE: PDA=Plantio direto sobre aveia; PCA=Plantio convencional sobre aveia; PDP=Plantio direto sobre pousio; PCP=Plantio convencional sobre pousio

Comparando os dados de contaminação natural por fumonisinas em relação ao perfil de micoflora contaminante, a tabela 3 mostra a menor média de contaminação total por fumonisinas (2,6 µg/g) foi quantificada no grupo de amostras oriundas de semeadura convencional sobre pousio e neste grupo as leveduras foram mais freqüentes, compreendendo 38% da microbiota contaminante do milho. Por outro lado, a maior média de contaminação por fumonisinas (7,6µg/g) foi quantificada em amostras de milho procedentes de semeadura direta sobre pousio, apresentando menor porcentagem de leveduras (5,3%) constituindo microbiota contaminante.

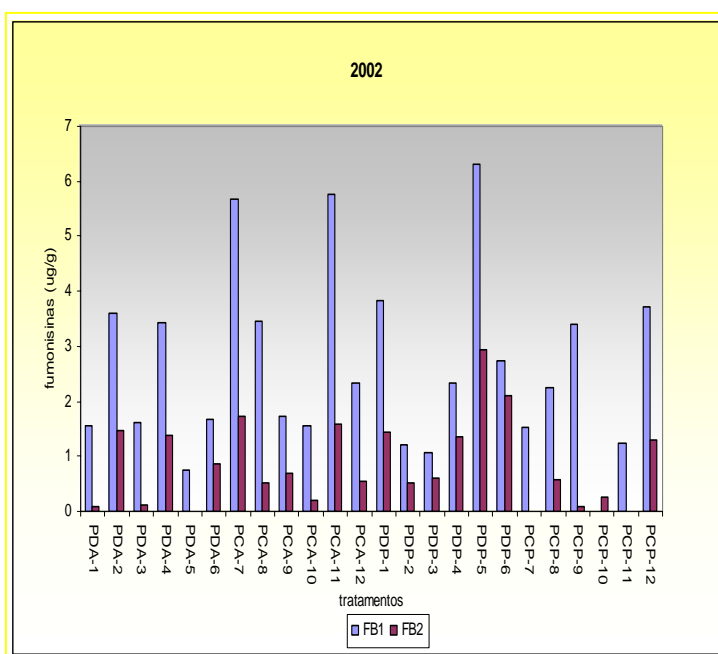
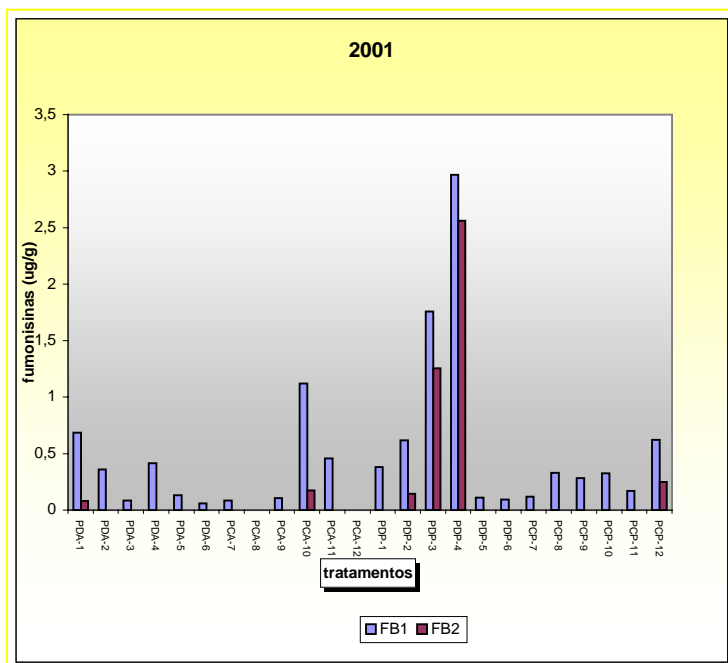
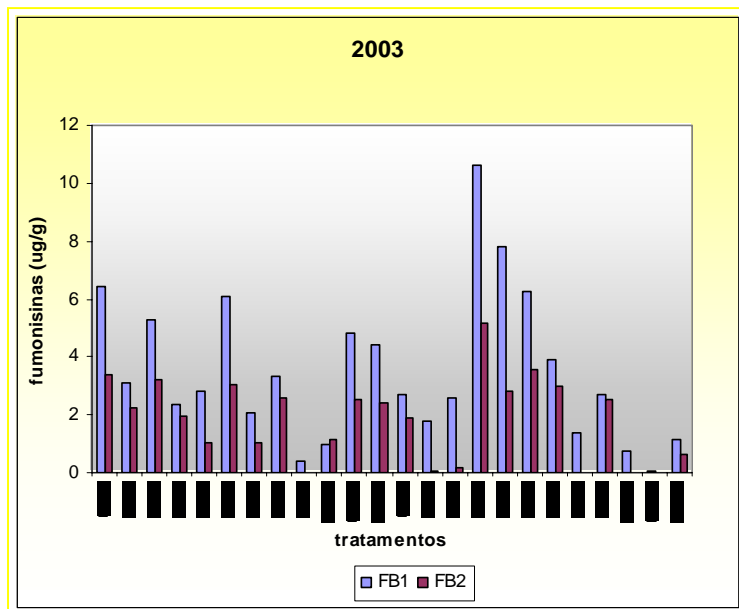
Infere-se que o aumento na concentração de fumonisinas esteve relacionado à diminuição na proporção de leveduras. As leveduras parecem constituir microbiota antagonista com potencial de controle sobre fungos fitopatogênicos / micotoxigênicos, com pesquisas demonstrando a sua efetividade no biocontrole, seja através de competição, ou antibiose (LEVY et al, 2002). MOTOMURA et al. (1996) isolaram diversos antagonistas contra *F. verticillioides* a partir de microbiota natural de milho e, embora a maior atividade pertencesse a bacilo esporulado, entre antagonistas também detectou-se leveduras. CAMILLO et al. (2000) observaram degradação in vitro de fumonisinas por antagonistas isoladas de milho. Posteriormente, HARA (2000) estudando interação de leveduras com *F. verticillioides* no milho, observou-se efeito detoxificador sobre fumonisinas, resultante do crescimento de leveduras, sendo a intensidade dependente da cepa utilizada no ensaio. O fato sugere que a composição natural de microbiota, oriunda de diferentes espécimens teria importante participação que regeria a predominância direcionada a determinado grupo microbiano e, conseqüente risco de contaminação por micotoxinas.

Tabela 4: Contaminação natural por fumonisinas (FB₁, FB₂ e total) de milho cultivado em áreas em sucessão a pousio ou azeite, semeado de forma convencional ou direta, com diferentes níveis de adubação nitrogenada de cobertura, em Londrina, Pr., safra 2001, 2002 e 2003.

TRAT	2001			2002			2003		
	FB1 (µg/g)	FB2 (µg/g)	TOTAL (µg/g)	FB1 (µg/g)	FB2 (µg/g)	TOTAL (µg/g)	FB1 (µg/g)	FB2 (µg/g)	TOTAL (µg/g)
DA-1	0,68	0,08	0,76	1,55	0,1	1,65	6,45	3,4	9,85
DA-2	0,36	ND	0,36	3,59	1,47	5,06	3,12	2,25	5,37
DA-3	0,08	ND	0,08	1,62	0,12	1,74	5,28	3,19	8,47
DA-4	0,41	ND	0,41	3,44	1,37	4,81	2,34	1,97	4,31
DA-5	0,13	ND	0,13	0,76	ND	0,76	2,84	1,05	3,89
DA-6	0,06	ND	0,06	1,66	0,87	2,53	6,09	3,04	9,13
CA-7	0,09	ND	0,09	5,68	1,73	7,41	2,08	1,04	3,12
CA-8	ND	ND	ND	3,45	0,51	3,96	3,31	2,56	5,87
CA-9	0,11	ND	0,11	1,72	0,69	2,42	0,39	ND	0,39
CA-10	1,12	0,17	1,29	1,55	0,21	1,76	0,99	1,14	2,13
CA-11	0,46	ND	0,46	5,77	1,59	7,36	4,85	2,52	7,37
CA-12	ND	ND	ND	2,33	0,54	2,87	4,44	2,42	6,86
DP-1	0,38	ND	0,38	3,83	1,44	5,27	2,72	1,89	4,61
DP-2	0,62	0,14	0,76	1,22	0,51	1,73	1,78	0,07	1,85
DP-3	1,78	1,25	3,00	1,08	0,6	1,68	2,59	0,18	2,77
DP-4	2,97	2,56	5,53	2,32	1,34	3,66	10,64	5,14	15,78
DP-5	0,11	ND	0,11	6,3	2,93	9,23	7,78	2,8	10,58
DP-6	0,09	ND	0,09	2,75	2,11	4,86	6,25	3,57	9,82
CP-7	0,12	ND	0,12	1,52	ND	1,52	3,93	3,01	6,94
CP-8	0,33	ND	0,33	2,24	0,57	2,81	1,37	ND	1,37
CP-9	0,28	ND	0,28	3,41	0,1	3,51	2,67	2,52	5,19
CP-10	0,33	ND	0,33	0,46	0,26	0,72	0,73	ND	0,73
CP-11	0,17	ND	0,17	1,25	ND	1,25	0,04	ND	0,04
CP-12	0,62	0,25	0,87	3,71	1,3	5,01	1,15	0,62	1,77
MÉDIAS	0,47	0,19	0,66	2,73	0,89	3,62	3,5	1,83	5,33

Legenda: DA: Plantio Direto em azeite; CA: Plantio Convencional em azeite; DP: Plantio Direto sob pousio; CP: Plantio Convencional sob pousio; DRNC: dose recomendada de nitrogênio para cobertura; (*) no florescimento; 1: 0% N₂; 2: 25% N₂; 3: 50% N₂; 4: 100% N₂; 5: 100% N₂ + K⁺; 6: 100% N₂ + Ca⁺⁺; 7: 0% N₂; 8: 25% N₂; 9: 50% N₂; 10: 100% N₂; 11: 100% N₂ + K⁺; 12: ...; N₂ + Ca⁺⁺.

Figura 2: Contaminação natural por fumonisinas de milho (híbrido Dekalb 333b) cultivado em áreas em sucessão a pousio ou aveia, semeado de forma convencional ou direta, com diferentes níveis de adubação nitrogenada de cobertura, em Londrina. Pr., safra 2002/2003.



Estatisticamente não foi possível correlacionar a produção de fumonisinas a fatores intrínsecos do milho (safra 2003), como composição bromatológica, atividade d'água e umidade. As análises físico-químicas indicaram o teor (g%, P.S) de lipídios variou de 5,32 a 6,80% (média 6,2%), cinzas de 0,79 a 1,41% (média 1,1%) e proteínas de 7,91 a 10,30% (média 9,0%). Os valores de atividade d'água para estas amostras oscilaram de 0,72 a 0,88 (média 0,80) e umidade de 10,1 a 16,7 % (média 12,7%), conforme descrito na tabela 3.

CONCLUSÕES

- A concentração de fumonisinas aumentou gradativamente no decorrer de anos consecutivos de semeadura (safra 2001, 2002 e 2003).
- O milho cultivado sob sistema de semeadura direta apresentou maior contaminação natural por fumonisinas, independentemente de safra, adubação e rotação de cultura.
- *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e leveduras ocorreram em frequência de 100, 66, 20 e 80%, respectivamente, na micoflora de milho, justificando a positividade de fumonisinas em 97% das amostras.
- As leveduras poderiam desempenhariam papel importante como antagonista potencial no controle de *F. verticillioides*, já que milho sob práticas agrícolas aonde se observou maior porcentagem de leveduras apresentaram com menor teor de fumonisinas.

CAPÍTULO II: ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

ISOLADOS DE MILHO SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE PLANTIO

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) se enquadra entre os cereais mais cultivados no mundo, com o Brasil ocupando uma das maiores áreas, correspondente a 12,3 milhões de hectares. O Estado do Paraná participa com 2,8 milhões de hectares, equivalente a aproximadamente 25-30% da produção, contemplado por 14,5 milhões de toneladas (safra 2003/2004, Divisão de Conjuntura Agropecuária – DCA, 2003). Recentemente, o recuso a alimentos geneticamente modificados oriundos de grandes exportadores, aliado à exigência do setor importador de suínos e aves perante certificação de rastreamento a matérias primas de ração, enquadrou o Brasil na categoria dos exportadores de milho (AGRONOTÍCIAS, 2004).

Fusarium verticillioides Sacc. Nirenberg (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) predomina na microbiota do milho e produz fumonisinas, onde a toxina mais abundante, a FB₁ tem sido associada a leucoencéfalomalácia eqüina, edema pulmonar/hidrotórax em suínos e efeito hepatocarcinogênico em ratos (MARASAS *et al.*, 1984; GELBERBLOM *et al.*, 1988; PLATTNER *et al.*, 1990; ACKERMAN, 1991). Em humanos, a FB₁ provavelmente esteja relacionada ao câncer esofágico em Traskei, África do Sul e China, com os estudos associando o consumo de milho ao desenvolvimento de câncer hepático primário (UENO, 2000).

A Organização Mundial de Comércio reduziu as tarifas alfandegárias, mas as crescentes preocupações enfatizaram barreira contra contaminantes fitossanitários naturais (AGRONOTÍCIAS, 2004), com constantes

propostas a limites de tolerância contra micotoxinas (MILLER, 1996). “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda 5, 10, 50 e 50 $\mu\text{g/g}$ para rações de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997). A recomendação para consumo humano iniciou-se com proposta com o limite de 1 $\mu\text{g/g}$ (VICONTI & BOENKE, 1995), sendo que posteriormente “Food and Drug Administration” (FDA) adotou 2,0 mg.Kg^{-1} de $\text{FB}_1+\text{FB}_2+\text{FB}_3$ (farelos de milho), 3,0 mg.Kg^{-1} (pipoca) e 4,0 mg.Kg^{-1} (milho para massas) (AVANTAGGIATO et al., 2002).

Embora o monitoramento eficaz imposto pela barreira sanitária, aliado a perspectivas de milho geneticamente resistente sejam promissores, salienta-se uma alternativa de controle prático através de manejo de cultivo, i.e. direcionar plantio / adubação que minimize a proliferação fúngica e conseqüente produção de micotoxinas. *F. verticillioides* é capaz de sobreviver por 8 a 13 anos (DHINGA E COELHO NETTO, 1998) e apresenta crescimento ótimo de 22,5 a 27,5 °C, máximo entre 32 a 37 °C e o mínimo entre 2,5 a 5,0°C (JOFFE et al., 1973) e se destaca no clima tropical brasileiro, dificultando a obtenção de cultivares resistentes (ANON, 1995).

O sistema de semeadura (direto ou convencional) em rotação, aliado a fertilização parecem desempenhar importante função no controle fitossanitário, devida atuação direta de práticas agrícolas nas características químicas / biológicas do solo (ZAMBOLIN & VENTURA, 1993). A contínua implementação da tecnologia de plantio direto resultaria em mudanças no ecossistema agrícola devido à modificação na disponibilidade d’água, temperatura, aeração, teor de matéria orgânica, afetando a microbiota do solo resultante de plantio convencional. Em termos fitopatológicos, a resteva de palha no solo do plantio direto favoreceria a

sobrevivência fúngica, comprometendo efeitos benéficos da prática conservacionista (ALEXOPOULOS et al.; 1996).

A vasta variabilidade de *Fusarium* spp. dificulta a identificação, além de alterações devido a mutação, degeneração pela subcultura repetida e existência de diversos sistemas taxonômicos de identificação (GAN et al., 1997; ABRAMSON, et al., 1998). Fato este, que poderia também ser desencadeado pela mudança nas condições extrínsecas de plantio. A identificação de *Fusarium* baseia-se na associação de técnicas microscópicas e macroscópicas (Nelson et al, 1983). Todavia, a caracterização intraespecífica individual dentro da população requer testes complexos como patogenicidade, determinação do grupo de compatibilidade vegetativa (VCG) por experimentos pareados, ou perfil da produção de micotoxinas (JIMÉNEZ et al, 2000).

Os avanços na biologia molecular permitiram desenvolvimento de marcadores moleculares capazes de detectar uma infinidade de locos polimórficos em genótipos individuais e avaliação direta de variação genética em populações. A técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) é uma estratégia alternativa, capaz de estabelecer similaridade genética entre a mesma espécie, sem necessidade de conhecimento de seqüências de DNA do organismo investigado (WILLIAMS et al., 1990). O RAPD permitiu análise de “matting” de *Fusarium* pertencentes à divisão *Liseola* (AMOAH et al., 1996), variabilidade populacional em *F. graminearum* Schwabe (OULLET & SEIFERT, 1993) e *F. solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *cucurbitae* Snyder e Hans. (CROWHURST et al., 1991), diferenciação entre *F. oxysporum* Schlectt. f. sp. *vasinfectum* e f. sp. *pisi* (J. C. Hall) Snyder e Hans. (ASSIGBETSE et al., 1994; GRAJAL-MAETIN et al., 1993), assim como identificação das espécies de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (MANULIS et al., 1994).

O presente trabalho visa analisar as alterações na contaminação natural de fumonisinas decorrentes do sistema de plantio / adubação em safras consecutivas de milho aliadas à análise de variabilidade genética dos isolados de *F. verticillioides* por polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), sendo as cepas selecionadas de milho submetidas a tratamentos agronômicos extremos, i. e., plantio convencional sem nenhum tratamento a plantio direto sobre aveia suplementado com $N_2 + K^+ + Ca^{++}$.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de *F. verticillioides*

Um total de 23 cepas de *F. verticillioides* provenientes de micoflora contaminante de milho, obtido de duas safras consecutivas (ano 2002 e 2003), foram selecionados para o estudo da variabilidade genética por RAPD. As práticas agronômicas consistiram de seis tratamentos distintos, acoplado sistema de plantio (direto X convencional) ao tipo de rotação (aveia x pousio) e adubação (0 X 100% da dose recomendada de nitrogênio, aliado a adição de potássio ou cálcio) (SILVA, 2004). Para análise de fumonisinas consideram-se amostras de milho proveniente de três safras consecutivas (2001 a 2003), enquanto que a contagem de bolores e leveduras.

F. verticillioides selecionados foram obtidos por plaqueamento utilizado para contagem total de bolores e leveduras em ágar batata dextrose, empregando a técnica de semeadura em profundidade. As colônias de *Fusarium*

spp. com características macroscópicas distintas (pigmentação superficial e profundidade), proveniente do plaqueamento de milho pertencente a cada tratamento agrônômico, foram repicadas para tubos contendo ágar batata dextrose inclinado e, submetido a cultura monoespórica. Após identificação microscópica, procedeu-se a análise de polimorfismo de DNA ao acaso (RAPD) para avaliar padrão de variabilidade.

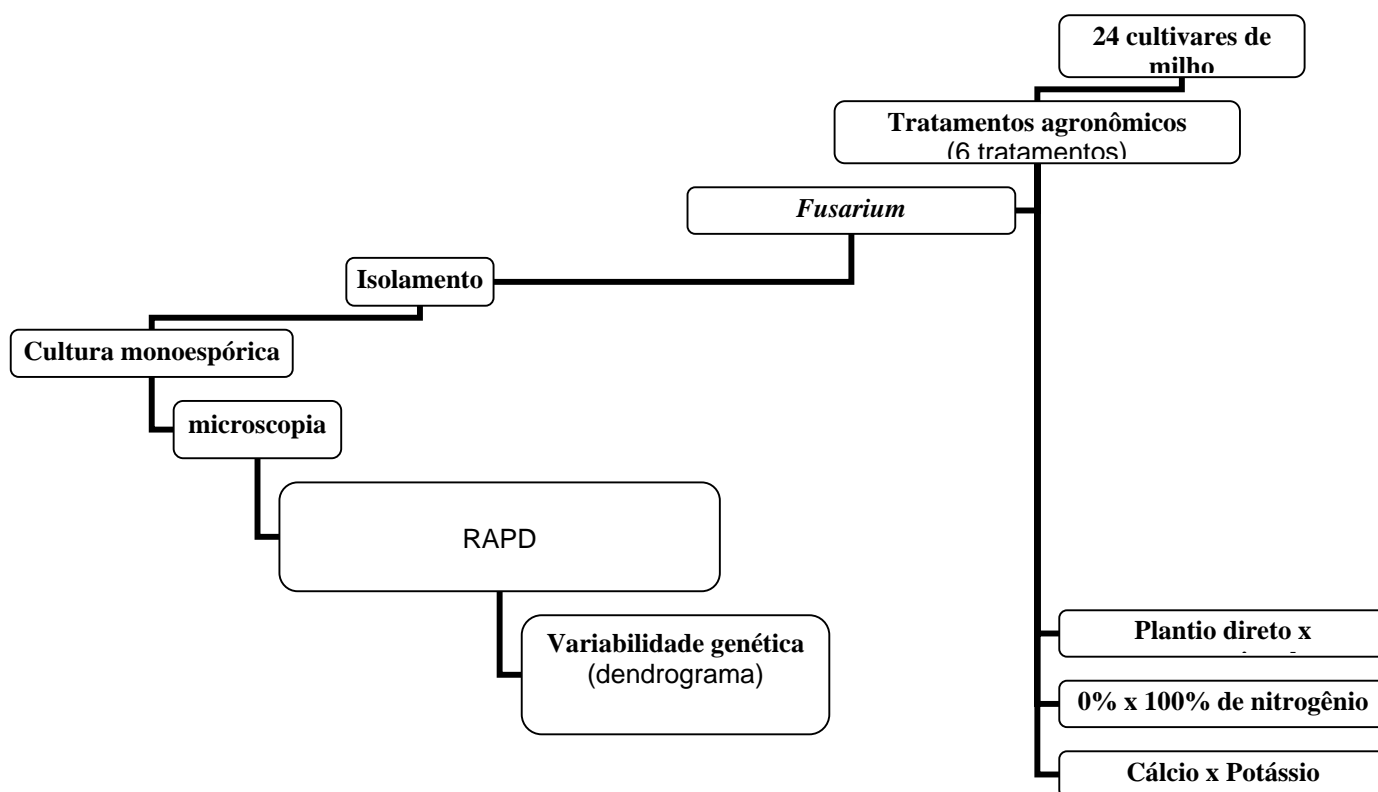


Figura 1. Esquema para seleção e caracterização genética por RAPD de *F. verticillioides* isolados de milho submetido a diferentes sistemas de plantio/adubação.

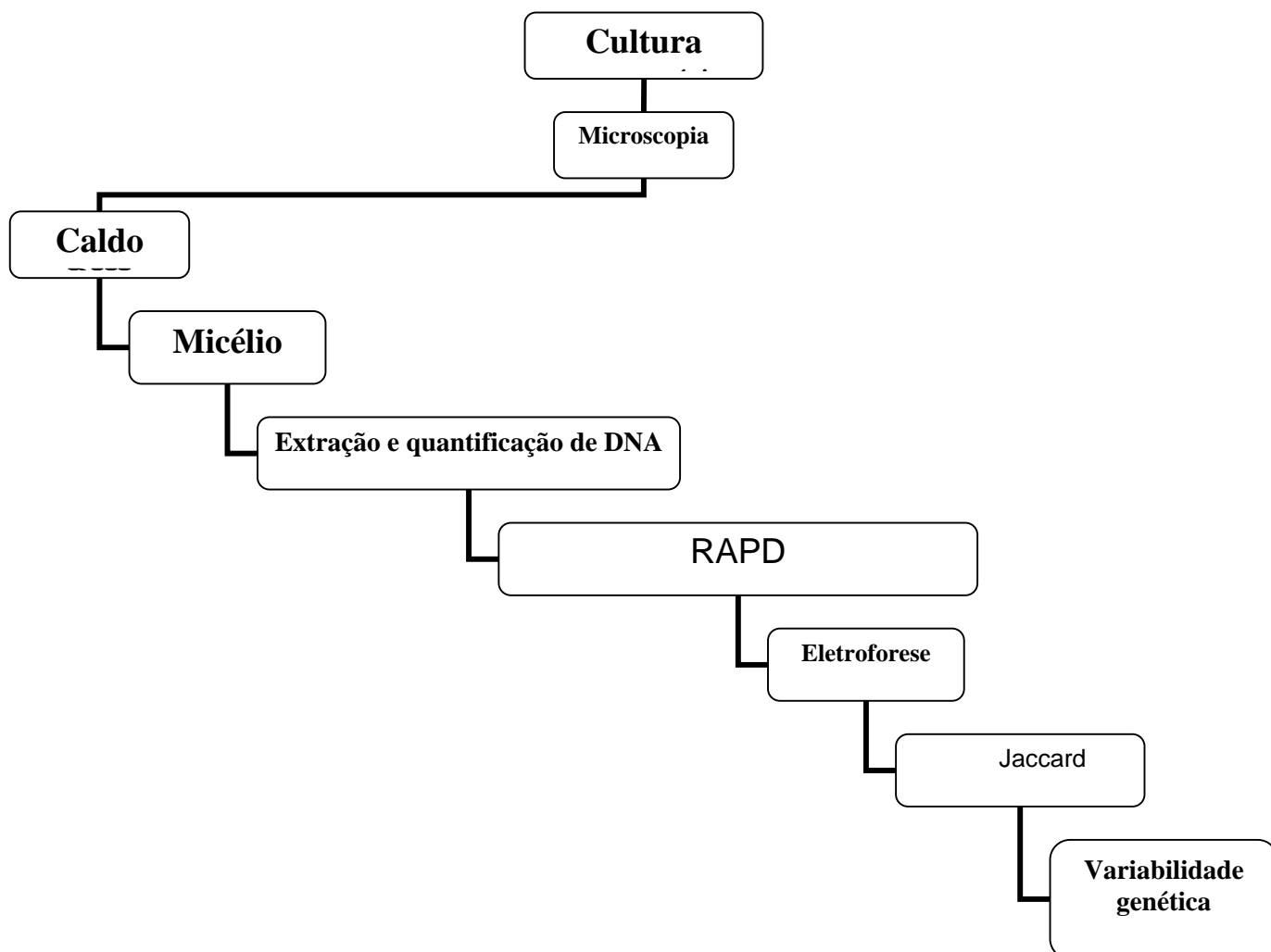


Figura 2: Fluxograma de análise genética das cepas de *F. verticillioides*.

3.1.2 Cultura Monoespórica

As colônias com aspecto de *Fusarium* spp foram repicadas para tubos de ágar batata dextrose inclinados e incubadas a 25° C por sete dias. Três gotas de água estéril foram colocadas assepticamente sobre uma lâmina de microscópio e uma alçada de cultura transferida para a primeira gota e homogeneizada. A seguir, uma alçada desta gota foi transferida para a segunda e desta para a terceira. Uma alçada da segunda e da terceira gota foi semeada em estrias em placas de Petri contendo ágar a 2% e incubada por 16 a 25°C. O esporo germinado foi transferido para tubo contendo agar batata dextrose. Utilizando agulha de níquel com auxílio de um estereoscópio (NIKON SMZ 1B), usando aumento de 30 vezes. Uma série de três esporos obtidos de cada cultura foi incubada a 25° C por sete dias (um tubo de cultura monoespórica foi selecionado para identificação). A fim de conservar por mais tempo as culturas, foram realizados repiques em tubos com àgar batata dextrose, e em seguida adicionado, assepticamente, óleo vaselina, diminuindo desta forma a atividade fúngica.

3.1.3 Extração de DNA

Para extração do DNA total das cepas de *F. verticillioides* o micélio foi macerado após adição de nitrogênio líquido por intermédio de grill e pistilo. Após a maceração o “pó” obtido foi acondicionado em tubo de 2,5 mL e adicionado 800 µL de tampão de extração (tris HCl 200mM; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 1%) e colocado em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após este período adicionou-se ao

tubo 800 μL de solução fenol:clorofórmio (1:1) e centrifugado a 12.000 G por 10 min. Após centrifugação o sobrenadante presente no tubo foi retirado cuidadosamente com intuito de não carregar restos celulares e fenol. Ao sobrenadante retirado foi precipitado pela adição 800 μL de clorofórmio e centrifugado a 12.000G por 5 minutos. Novamente, o sobrenadante contido no tubo foi cuidadosamente pipetado e adicionado a 40 μL de solução salina e 1 mL de etanol absoluto gelado, centrifugado por 5 minutos e vertida a solução presente no tubo com o cuidado em não descartar o pellet de DNA. Lavou-se o pellet com álcool 70% com posterior secagem e diluição em água ultrapura.

3.1.4 Primers testados

As seqüências de DNA fúngico foram amplificadas com primers produzidos pela Operon Technologies, alameda, CA, USA. Os dezesseis primers usados foram: OP-W2, OP-W3, OP-W4, OP-W5, OP-W6, OP-W9 ,OP-W11, OP-W12, OP-W14, OP-W19, OP-X3, OP-X4, OP-X5, OP-X9, OP-X12, OP-X13. Nas reações de amplificação, o volume total foi de 25 μL e as condições eram: 0,25 μM de primer, 2 U de Taq DNA polimerase nativa (Invitrogen), 4,5 mM de MgCl_2 , 0,25 mm de cada dNTP e 5 ng de DNA

3.1.5 Amplificação do DNA (RAPD)

Para amplificação do DNA utilizou-se o termociclador, sendo cada reação submetida a 40 ciclos após desnaturação inicial a 92°C de 3 minutos. Cada ciclo se constituiu de 40 segundos a 92°C, 1 minuto e 30 segundos a 40°C e 2 minutos a 72°C. Os ciclos foram seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C e 10 minutos a 10°C.

3.1.6 Análise de polimorfismo

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel agarose 2%, corado por brometo de etídio, evidenciado sob luz UV (SAMBROOK et al, 1989) (figura 3).

Cada linhagem de *F. verticillioides* foi analisada quanto à presença e ausência de produtos de amplificação. Os dados eram introduzidos em uma matriz binária, e uma matriz de similaridade foi construída utilizando o Índice de Similaridade de Jaccard (JS). A partir do cluster da similaridade gerada pôde-se construir um dendrograma (figura 4).

3.1.6 Análise Genética

A análise de RAPD foi determinada por comparação dos perfis eletroforéticos do DNA amplificado dos indivíduos analisados, com cada um dos primers. Cada cepa de *F. verticillioides* foi marcada quando a presença ou ausência de produtos de amplificação. Os dados foram introduzidos em uma matriz binária, e foi construída uma matriz de similaridade pareada usando o Índice de Similaridade de Jaccard (JS).

Para análise de similaridade genética entre os indivíduos utilizou-se o programa computacional NTSYS-PC (Numerical Taxonomy System, Applied Biostatistics, Setauket, New York) por meio do coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA (unweighted pair group method using average-linkage) foi construído o dendrogram de similaridade genética. O agrupamento evidenciou a formação de 4 grupos denominados A, B, C, D.

3.2 FUMONISINAS

3.2.1 Determinação de fumonisinas

Para a extração de fumonisinas FB₁ e FB₂ foram utilizados 10g de amostra de milho triturada e adicionado 30 mL solução metanol:água (3:1): após repouso (5 minutos), agitação (150 rpm por 30 min.) centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos) e filtragem em papel filtro, houve o condicionamento da mini coluna Sep Pak, com 5 mL de metanol e posteriormente mais 5 mL de solução metanol:água

(3:1). A purificação, após passagem de 1 mL de extrato filtrado, foi realizada com metanol:água (3:1) e em seguida com metanol. A eluição empregada com solução metanol:ácido acético (99:1) foi recolhida e evaporada até secagem a 40°C, redissolvida com 1 mL de metanol e seca novamente nas mesmas condições descritas anteriormente e por último redissolvida com 2 mL de metanol:água (3:1) coletada e seca por intermédio de nitrogênio gás a 60°C e estocada em freezer até o uso (Figura 3).

Antes de injetar as amostras no cromatógrafo líquida de alta eficiência (CLAE), procedeu-se a derivatização de 100 µL da amostra (anteriormente ressuspensa em acetonitrila:água 50:50) com 200 µL da solução *O*-phthaldialdeído (OPA – 0,02g, 500 µL de metanol, 2,5 mL de 0,1 M de tetraborato de sódio e 25 µL de 2-mercaptoetanol), por no máximo 1 minuto. A detecção das fumonisinas foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando-se cromatógrafo Shimadzu (Figura 4). Para separação foi utilizada coluna fase reversa C-18 (Nucleosil 100-5, 250 x 4,6 - Macherey-Nagel). Os derivados de fumonisinas FB₁ e FB₂ foram determinados em detector de fluorescência (Shimadzu RF 535), com comprimentos de onda de 335 e 450 (excitação e emissão, respectivamente). A fase móvel utilizada foi o sistema metanol: fosfato de sódio 0,1 M (4:1) com pH ajustado em 3,3 por intermédio de ácido orto-fosfórico. Com fluxo de 1 mL/min, temperatura de coluna 20°C e pressão de 180 mmHg. Essa proporção permitiu a obtenção de pressão e viscosidade adequadas, com separação e tempo de retenção ótimo: t_r FB₁ = 6,5 – 7,0 min e t_r FB₂ = 11 – 11,5 min.

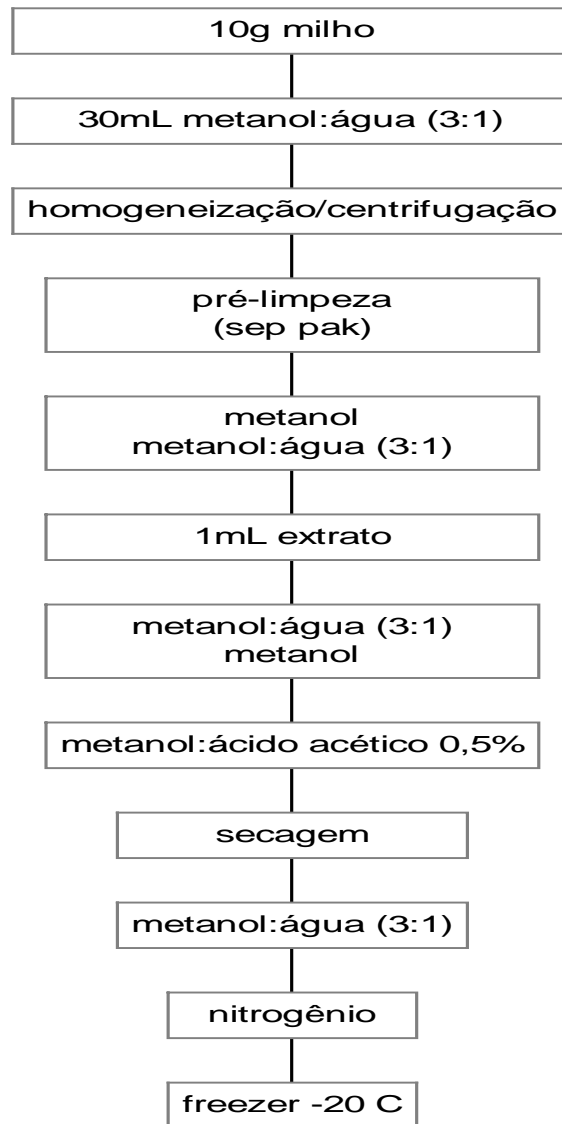


Figura 3. Fluxograma para extração de fumonisinas

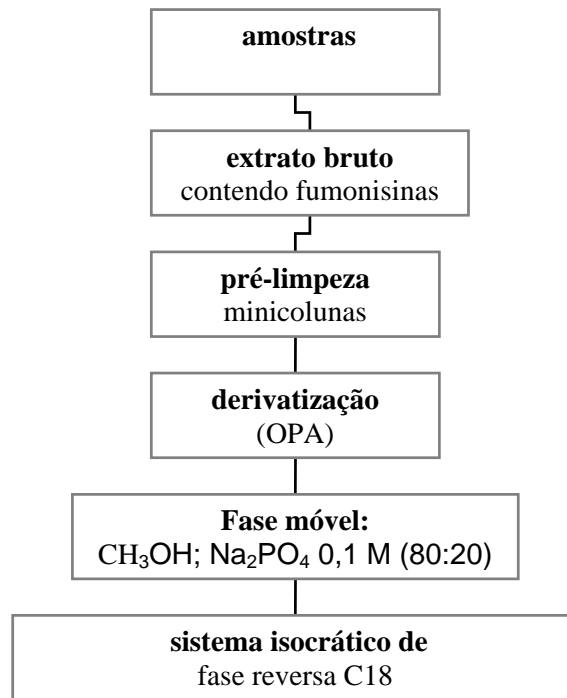


Figura 4. Fluxograma do método de CLAE (SHEPHARD et al., 1990 modificado por UENO et al., 1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de micoflora contaminante e níveis de fumonisinas detectados em 12 amostras de milho, provenientes de cultivo submetido a seis tratamentos agronômicos referente a sistema de plantio (direto X convencional), tipo de rotação de cultura (aveia x pousio) e adubação (0 X 100% da dose recomendada de nitrogênio, aliado a adição de potássio ou cálcio) em duas safras consecutivas (2002 e 2003), estão ilustrados na tabela 1. Um total de 23 cepas de *F. verticillioides* isoladas destas amostras foram selecionadas, baseado em características macroscópicas quanto a pigmentação e, analisadas perante variabilidade genética por RAPD (tabelas 1 e 2, figuras 5, 6 e 7).

A tabela 1 mostra que a contagem total de bolores e leveduras nas amostras de milho pertencentes à safra 2002 variou de $2,80 \times 10^4$ a $9,53 \times 10^4$ UFC/g (média $4,60 \times 10^5$ UFC/g), enquanto que a safra 2003 apresentou contagem de $2,26 \times 10^4$ a $2,25 \times 10^6$ UFC/g (média $4,78 \times 10^6$ UFC/g). As leveduras compuseram a micoflora predominante (34 a 88%) de milho proveniente da safra 2002, com contagem na faixa de $1,3 \times 10^4$ a $9,0 \times 10^5$ UFC/g (média $1,46 \times 10^6$ UFC/g), com a exceção de amostra DA-5, onde houve predominância de *Fusarium* spp. (66%). *Fusarium* spp. foi detectada em todas as amostras ($2,86 \times 10^4$ a $1,90 \times 10^5$ UFC/g) e compôs entre 7 a 66% da micoflora determinada pela contagem total de bolores e leveduras, enquanto que *Penicillium* spp. foi detectada em 2 amostras, correspondente a $4,0 \times 10^2$ UFC/g (3% da contagem total) e $1,5 \times 10^3$ UFC/g (5% da contagem total) (tabela 1).

Na safra 2003, *Fusarium* spp. foi detectada em 100% das amostras analisadas, além de constituir gênero predominante no milho (11 a 91%), com a

contagem variando de $1,2 \times 10^4$ a $7,0 \times 10^5$ UFC/g (média $1,18 \times 10^6$ UFC/g), exceto na amostra oriunda de tratamento agrônômico CP-7 (plantio convencional sobre pousio sem adubação nitrogenada) e CP-12 (plantio convencional sobre pousio suplementado por 100% de nitrogênio mais Ca^{+2}), onde houve predominância de leveduras (55 e 79%, respectivamente). Leveduras foram detectadas em 83,3% das amostras, correspondendo de $3,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^6$ UFC/g (média $1,09 \times 10^6$ UFC/g). *Penicillium* spp. foi detectado em 4 amostras (66,6%), com contagem variando de $1,0 \times 10^3$ a $1,0 \times 10^5$ UFC/g (média $1,1 \times 10^5$ UFC/g). O milho oriundo de tratamento CP-11 (plantio convencional sobre pousio suplementado por 100% de nitrogênio mais K^+) apresentou micoflora constituída exclusivamente de *Fusarium* spp., com a contagem de $4,2 \times 10^5$ UFC/g (tabela 1).

A mesma tabela também indicou que 100% de milho avaliado apresentaram-se naturalmente contaminado por fumonisinas. A contaminação na safra 2002 variou de 3,71 a 0,76 $\mu\text{g/g}$ (média 1,74 $\mu\text{g/g}$) para FB_1 e de ND a 1,3 $\mu\text{g/g}$ (média 0,38 $\mu\text{g/g}$) para FB_2 . Para milho/safra 2003 a contaminação por FB_1 e FB_2 variou de 0,04 a 6,45 $\mu\text{g/g}$ (média 3,42) e de ND a 3,4 $\mu\text{g/g}$ (média 1,85 $\mu\text{g/g}$), respectivamente (tabela 1).

Fato semelhante foi observado por HIROOKA et al. (1996) e ONO et al. (2000), ao avaliar a contaminação natural de fumonisinas em milho do Estado do Paraná. I.e., contaminação aproximada de 100%, sendo detectada concentrações de até 10, 59 $\mu\text{g/g}$ para FB_1 e 10, 31 $\mu\text{g/g}$ para FB_2 . Salienta-se que a literatura relata a dose de FB_1 envolvida em LEM na faixa de 6 a 10 $\mu\text{g/g}$ (UENO, 2000).

A contaminação máxima por FB_1 (6,45 $\mu\text{g/g}$) ocorreu no milho submetido ao plantio direto sobre aveia sem adubação nitrogenada (DA-1), porém com menor contagem fúngica total ($2,26 \times 10^4$ UFC/g); o nível mínimo de fumonisina

pertenceu à amostra CP-11 (plantio convencional sobre pousio suplementado por 100% de nitrogênio mais K⁺) com 0,04 µg/g e contagem fúngica intermediária (4,2x10⁵ UFC/g UFC/g), sendo as ambas amostras provenientes da safra 2003 (tabela 1). Nesta amostra com menor teor de fumonisina, salienta-se que a microbiota constituiu-se exclusivamente de *Fusarium* spp. (4,2x10⁵ UFC/g), sendo a contagem total, um valor intermediário.

Tabla 1: Quadro geral sobre isolados de *F. verticillioides* submetidos à análise de variabilidade genética (RAPD): efeito de manejo, coltura natural do milho (microbiota e fumonisina) e seleção de cepas.

Manejo	MICROFLORA CONTAMINANTE					FUMONISINAS ($\mu\text{g/g}$)		MILHO			<i>F. verticillioides</i>	
	Total	Fus. %	Pen. %	Asp. %	Lev. %	FB ₁	FB ₂	Total	Cepas (pigmento)	Freq.(%)	(%)	(%) média
DA - 1	2,8.10 ⁵	7	5	-	88	1,55	0,1	1,85	#10 (R. averm.) #23 (R. claro)	75 25	75 72	73,5
DA - 5	2,9.10 ⁵	68	-	-	34	0,76	ND	0,76	#6 (Acast.) #17 (Laranja) #22 (R. escuro)	25 25 50	70 72 72	71,3
DA - 6	3,63.10 ⁵	37	3	-	60	1,88	0,87	2,53	#13 (R. escuro) #19 (Laranja)	30 70	75 75	75
CP - 7	9,53.10 ⁵	5	-	-	95	1,52	ND	1,52	#1 (R. claro)	100	75	75
CP - 11	1,95.10 ⁵	41	-	15	44	1,25	ND	1,25	#7 (Roxo) #16 (R. escuro) #20 (Rosa)	16 37 47	75 72 72	73
CP - 12	9,26.10 ⁵	39	-	-	61	3,71	1,3	5,01	#21 (R. acast.) #24 (Roxo)	50 50	72 72	72
Médias						1,74	0,77	2,51				73,05
DA - 1	2,26.10 ⁴	81	5	-	14	6,45	3,4	9,85	#4 (R. claro) #9 (R. escuro) #14 (Rosa)	15,8 36,8 47,4	75 75 70	73,3
DA - 5	3,80.10 ⁴	76	-	-	24	2,84	1,05	3,89	#5 (Rosa)	100	75	75
DA - 6	2,65.10 ⁴	91	2	-	7	6,09	3,04	9,13	#2 (R. averm.)	100	75	75
CP - 7	2,25.10 ⁵	39	6	-	55	3,93	3,01	6,94	#12 (R. escuro) #15 (R. claro)	40 60	75 75	75
CP - 11	4,4.10 ⁵	100	-	-	-	0,04	ND	0,04	#11 (R. claro)	100	75	75
CP - 12	9,6.10 ⁴	11	8	2	79	1,15	0,62	1,78	#8 (R. escuro) #16 (R. claro)	41,7 58,3	75 68	71,5
Médias						3,42	2,22	5,64				74,13

agenda: DA: Plantio Direto em aveia; CP: Plantio Convencional sobre pouso; 1, 7: 100% N₂; 5, 11: 100% N₂+K⁺; 6, 12: 100% N₂+Ca⁺⁺; R: rosa; Averm: verticilhado; Acast: acastanhado; ND: não detectado.

Este resultado infere que a ausência de competição microbiana provavelmente permitiu o desenvolvimento de *F. verticillioides* empregando-o apenas como substrato de sobrevivência, sem necessidade de induzir a expressão gênica favorável à competição, resultando em menor produção de metabólitos secundários. Conseqüentemente, as colônias provavelmente apresentaram-se com pouca pigmentação (rosa clara), assim como baixo teor de fumonisinas. ONO et al., (2003) observaram diminuição drástica na produção de FB1 em linhagens de *F. verticillioides* mantidas ob estoque (efeito de expressão gênica). Cepa 164 G mostrou produção de intenso pigmento avermelhado, mas a mais baixa produção de fumonisina (15,5 mg/g), o qual depois de 8 anos de armazenamento diminuiu a um nível indetectável (0,002 mg/g), em contraste com pigmentação intensificada. Produção de fumonisina deriva da via acetil CoA que compartilhada com biossíntese ácida isoprenóide/policetida/lipídica; Isto pode deduzir que a troca que favorece uma rota específica pode diminuir o metabólito derivado de rota complementar.

Os resultados sugeriram que no milho cultivado sob sistema de semeadura direta, independentemente do tipo de adubação e rotação de cultura empregada, ocorreu maior contaminação de fumonisinas. No mesmo grupo ocorreu menor contagem total ($1,80 \times 10^4$ UFC/g), mas *Fusarium* spp. constituiu-se na maior porcentagem da micoflora (média, 83%). De acordo com PALTÍ (1981), a prática agrícola de semeadura direta afetou diretamente a sobrevivência, multiplicação e infectividade de fitopatógenos na cultura. O fato justifica que geralmente as doenças devido a fitopatógenos, a exemplo de *Fusarium* resultaram em maior severidade sob o plantio direto, se comparado ao plantio convencional (restos culturais parcial ou totalmente incorporados ao solo). Em adição, a semeadura direta associada à

monocultura intensificou podridões da espigas de milho causada por *Fusarium* spp. (FLETT & WEHNER, 1991).

A análise estatística dos dados sobre contaminação natural de fumonisinas por teste de Tukey detectou diferença significativa de contaminação entre safra 2002 e 2003 ($p < 0,05$). A safra 2003 apresentou a contaminação média de fumonisina total (5,16 $\mu\text{g/g}$) cerca de 60% superior, em relação a safra 2002 (2,12 $\mu\text{g/g}$). ALEXANDER (1977) relatou especiação de fungos quanto a toxigenicidade, i.e. aumento gradativo do potencial decorrente de cultivo sucessivo realizado em mesma área.

Comparando os dados de contaminação natural por fumonisinas em relação ao perfil da contagem de leveduras, a tabela 1 mostra que este grupo compreendeu a média de 63,7% na microbiota de milho pertencente à safra 2002, porém observou-se redução drástica desta proporção para 35,8%, na safra 2003 (Tabela 1).

A mesma tabela mostra que o aumento na concentração de fumonisinas esteve relacionado à diminuição na proporção de leveduras, detectada na safra 2003 (estatística). As leveduras parecem constituir microbiota antagonista com potencial de controle sobre fungos fitopatogênicos / micotoxigênicos, com pesquisas demonstrando a sua efetividade no biocontrole, seja através de competição, ou antibiose (LEVY, 2002). MOTOMURA et al. (1996) isolaram diversos antagonistas contra *F. verticillioides* a partir de microbiota natural de milho e, embora a maior atividade pertencesse a bacilo esporulado, entre antagonistas também detectou-se leveduras. CAMILLO et al. (2000) observaram degradação in vitro de fumonisinas por antagonistas isoladas de milho. Posteriormente, HARA (2000) estudando interação de leveduras com *F. verticillioides* no milho, observou-se efeito

detoxificador sobre fumonisinas, resultante do crescimento de leveduras, sendo a intensidade dependente da cepa utilizada no ensaio. O fato sugere que a composição natural de microbiota, oriunda de diferentes espécimens teria importante participação que regeria a predominância direcionada a determinado grupo microbiano e, conseqüente risco de contaminação por micotoxinas.

Para o estudo genético empregou-se 23 cepas de *Fusarium* spp., provenientes de amostras de milho positivas para fumonisinas, pertencentes a diferentes tratamentos agronômicos (tabela 1). Estas cepas foram isoladas pelo plaqueamento de milho e selecionadas, com ênfase a características coloniais distintas (pigmentação superficial e profundidade), submetidas à cultura monoespórica e denominadas de *F. verticillioides* cepa fus1 a fus24. Após identificação microscópica, procedeu-se a análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) para avaliar padrão de variabilidade genética das cepas (tabela 1 e 2, Figuras 5, 6 e 7).

Destas cepas de *F. verticillioides* selecionadas, 13 pertenceram a milho cultivado sob plantio direto e 10 ao plantio convencional. A análise de *F. verticillioides* pelo RAPD, empregando padrões genéticos gerados por dezesseis primers proveram 105 locos, sendo que 75 (71,5%) apresentaram-se polimórficos (Figura 6).

Estes 75 locos de RAPD polimórficos detectados demonstraram valor suficiente para discriminar todos os isolados, considerando que na identificação genotípica, o número de locos polimórficos e freqüência alélica determinam o poder de resolução. A exemplo, maioria dos clones genotípicos de populações do patógeno de coníferas de campo *Gremmeniella abietina* pôde ser identificada com

uma probabilidade de erro de apenas 10^{-10} a 10^{-5} , utilizando 32 locos de RAPD (WANG et al., 1997).

A figura 7 apresenta o dendrograma produzido pela análise dos dados originados pelos padrões de amplificação, mostrando relações genéticas entre os isolados de *F. verticillioides*. Observa-se uma similaridade de 70%, i.e. muito próxima entre os indivíduos analisados, porém possibilitou formação de quatro subgrupos distintos baseados na escala de similaridade e denominou-se de subgrupo A, B, C e D.

Tabela 2: Contaminação natural por fumonisinas FB₁ e FB₂ em milho, safras 2002 e 2003, cultivado sob diferentes tipos de manejo (plântio x adubação x rotação de cultura) e características das cepas *F. verticillioides* (pigmentação x frequência x padrão de variabilidade genética) isoladas.

Grupo	% Simil.	Safr	Plântio	ORIGEM <i>F. verticillioides</i>			FUMONISINAS NO MILHO			VARIACÃO INTRAGRUPPO	
				Cepa (pigmentação)	Freq. (%)	FB1 (µg/g)	FB2 (µg/g)	Total (µg/g)	Faixa	Fator	
A	75	2002	CP7 (100% N)	#1 (R. claro)	100	1,52	ND	1,52	ND	1,25	0,04 – 9,85 246,25
		2002	CP11 (100% N+K ⁺)	#7 (Roxo)	16	1,25	ND	1,25	ND	1,25	
		2002	DA1 (0% N)	#10 (R. averm)	75	1,55	0,10	1,65	1,65	1,65	
		2002	DA6 (100% N+Ca ⁺⁺)	#13 (R. escuro)	30	1,66	0,87	2,53	2,53	2,53	
		2003	CP12 (100% N+Ca ⁺⁺)	#8 (R. escuro)	41,7	1,15	0,62	1,77	1,77	1,77	
		2003	CP11 (100% N+K ⁺)	#11 (R. claro)	100	0,04	ND	0,04	0,04	0,04	
		2003	DA1 (0% N)	#9 (R. escuro)	36,8	6,45	3,40	9,85	9,85	9,85	
		2003	CP7 (100% N)	#12 (R. escuro)	40	3,93	3,01	6,94	6,94	6,94	
		2003	CP7 (100% N)	#15 (R. claro)	60	3,98	3,01	6,99	6,99	6,99	
		2003	DA1 (0% N)	#4 (R. claro)	15,8	6,45	3,40	9,85	9,85	9,85	
Médias		2003	DA5 (100% N+K ⁺)	#5 (Rosa)	100	2,84	1,05	3,89	3,89	3,89	
		2003	DA5 (100% N+K ⁺)	#2 (R. averm.)	100	6,09	3,04	9,13	9,13	9,13	
		2003	DA6 (100% N+Ca ⁺⁺)	#2 (R. averm.)	100	6,09	3,04	9,13	9,13	9,13	
		2003	DA6 (100% N+Ca ⁺⁺)	#2 (R. averm.)	100	3,07	1,54	4,61	4,61	4,61	
B	72	2002	CP11 (100% N+K ⁺)	#18 (R. escuro)	37	1,25	ND	1,25	ND	1,25	0,76 – 5,01 6,59
		2002	CP11 (100% N+K ⁺)	#20 (Rosa)	47	1,25	ND	1,25	ND	1,25	
		2002	CP12 (100% N+Ca ⁺⁺)	#21 (R. acast.)	50	3,71	1,30	5,01	5,01	5,01	
		2002	DA6 (100% N+Ca ⁺⁺)	#19 (Laranja)	70	1,66	0,87	2,53	2,53	2,53	
		2002	DA5 (100% N+K ⁺)	#17 (Laranja)	25	0,76	ND	0,76	0,76	0,76	
		2002	CP12 (100% N+Ca ⁺⁺)	#24 (Roxo)	50	3,71	1,30	5,01	5,01	5,01	
		2002	DA1 (0% N)	#23 (R. claro)	25	1,55	0,10	1,65	1,65	1,65	
		2002	DA5 (100% N+K ⁺)	#22 (R. escuro)	50	0,76	ND	0,76	0,76	0,76	
		2002	DA5 (100% N+K ⁺)	#22 (R. escuro)	50	1,83	0,44	2,27	2,27	2,27	
		Médias	70	2002	DA5 (100% N+K ⁺)	#6 (Acast.)	25	0,76	ND	0,76	
2003	DA1 (0% N)			#14 (Rosa)	47,4	6,45	3,40	9,85	9,85	9,85	
Médias	68	2003	CP12 (100% N+Ca ⁺⁺)	#16 (R. claro)	58,3	1,15	0,623	1,773	1,773	1,773	1,15 – 0,62 1,77
		2003	CP12 (100% N+Ca ⁺⁺)	#16 (R. claro)	58,3	1,15	0,623	1,773	1,773	1,773	

Legenda: DA: Plântio Direto em aveia; CP: Plântio Convencional sobre posso; 1, 7: 100% N; 5, 11: 100% N+K⁺; 6, 2: 100% N+Ca⁺⁺; R: rossi; Averm: avermelhado; Acast: acastanhado; ND: não detectado.

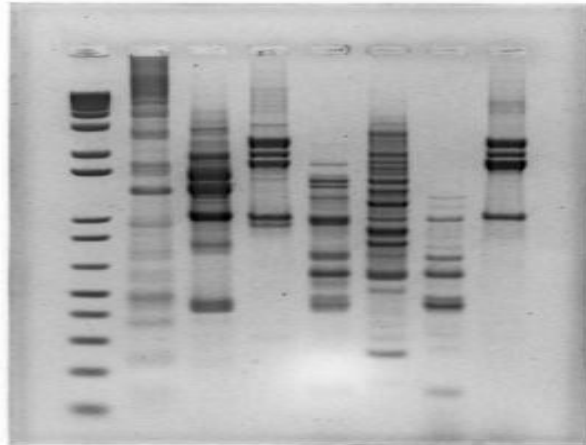


Figura 5: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD de *F. verticillioides*: Linhas 1 e 2, padrão de massa molecular; cepa #1 (linhas 3, 4 e 5) e cepa #2 (linhas 6, 7 e 8) tratados com primers OP-X3, OP-X4 e OP-W4. Padrão de massa molecular linha 1 é 100 pb ladder (Invitrogen Life Technologies, USA) e linha 2 é 100 pb ladder plus (Invitrogen Life Technologies, USA). (eletroforese em gel agarose a 2% corado com brometo de etídio).

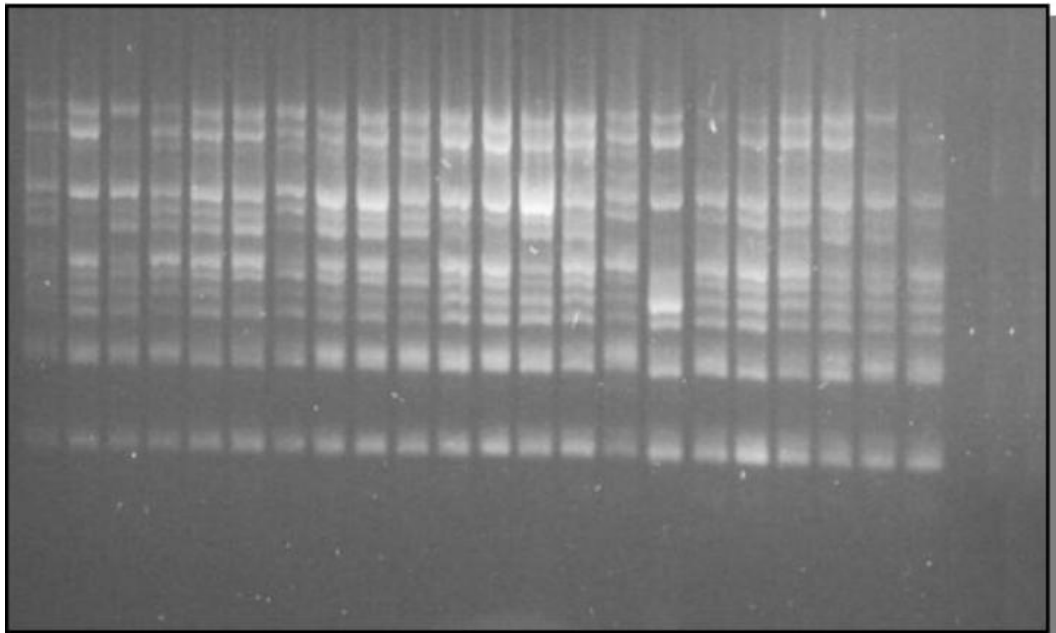


Figura 6: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso – RAPD de 23 cepas de *F. verticillioides* empregando primer OP-X4, linha 2 a 24, *F. verticillioides* #1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24, respectivamente. O padrão de massa molecular (linha 1) 100 pb ladder (Invitrogen Life Technologies. (eletroforese em gel agarose a 2% corada com brometo de etídio).

O subgrupo A constituiu-se de 12 cepas com similaridade média em torno de 75%, no subgrupo B envolveu-se 8 cepas na faixa de 73%, sendo o subgrupo A conectado ao B ao nível de 70% de similaridade (Figura 3). O grupo C, formado por 2 cepas, apresentou similaridade média de 70%. Apenas uma cepa compôs o subgrupo D e, conectou-se a outros subgrupos a nível de 68% de similaridade.

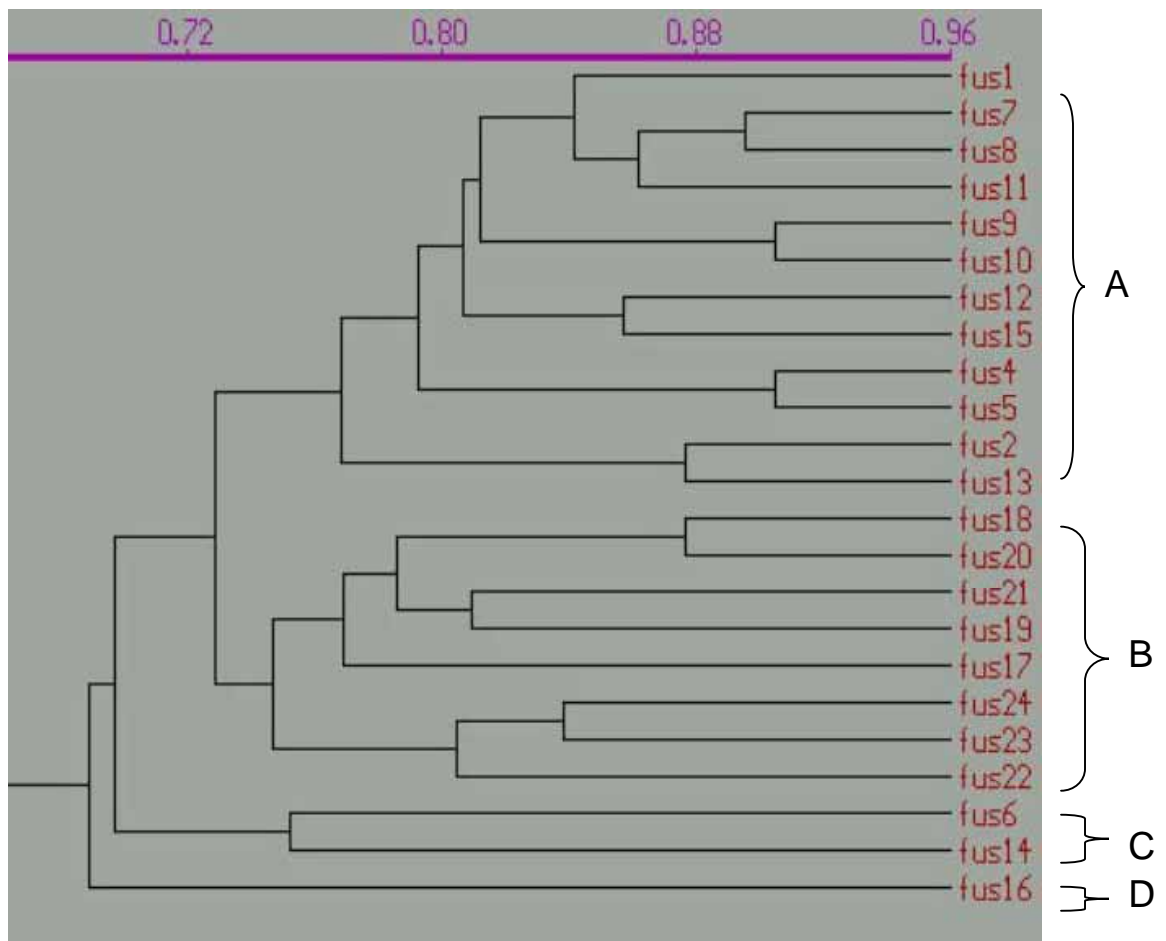


Figura 7: Dendrograma de similaridade genética obtido empregando-se coeficiente de Jaccard e método UPGMA para as cepas de *F. verticillioides*, utilizando-se os dados obtidos pela técnica de RAPD.

O subgrupo A constituiu-se de *F. verticillioides* cepa fus1 (plantio convencional), 7 (plantio convencional) e 8 (plantio convencional), 11 (plantio convencional), 9 (plantio direto), 10 (plantio direto), 12 (plantio convencional), 15 (plantio convencional), 4 (plantio direto), 5 (plantio direto), 2 (plantio direto) e 13 (plantio direto). O subgrupo B apresentou cepa fus18 (plantio convencional), 20 (plantio convencional), 21 (plantio convencional), 19 (plantio direto), 17 (plantio direto), 24 (plantio convencional), 23 (plantio direto) e 22 (plantio direto). O subgrupo C constituiu-se de cepa fus6 (plantio direto) e 14 (plantio direto), enquanto que apenas a cepa fus16(plantio convencional) constituiu o grupo D (Figura 7).

A análise dos indivíduos pertencentes ao subgrupo B (72% de similaridade) constatou-se sua composição exclusiva por cepas de *F. verticillioides* oriundas de amostras de milho provenientes da safra 2002. O grupo A apresentou em sua composição cepas isoladas de amostras de milho que se apresentaram superiormente contaminadas, naturalmente, por fumonisinas. Uma vez que, a contaminação média por fumonisinas total neste subgrupo foi de 4,617 $\mu\text{g/g}$ (fator de variação 246,25), valor este expressivamente superior ao encontrado para o grupo B, 2,777 $\mu\text{g/g}$ (fator de variação 6,59), conforme tabela 2.

Para as cepas isoladas de milho procedente da safra 2002 observou-se que quatro cepas (30,8%) apresentaram similaridade de 75%. As 10 cepas provenientes da safra 2003 apresentaram similaridades entre 68 a 75%. Das quais 8 (80%) apresentaram similaridade de 75% (figura 7). Indicando que as cepas de *F. verticillioides* estão tendendo a homogeneidade e formação de um grupo no qual os constituintes apresentem similaridades entre si de 75%. O fato sugere provável interferência de fatores inerentes do sistema cultivado, híbrido cultivado e/ou mesmo condições climáticas, favorecendo determinadas cepas sob condição de

cultivo empregado e conseqüentemente induziu a seleção natural direcionada a determinadas cepas de *F. verticillioides*. Conforme princípio da biodiversidade, inúmeras linhagens de interesse científico / econômico constantemente se extinguem, devido à interferência humana.

A análise das cepas que apresentaram 75% similaridade para as safras 2002 e 2003. Verificou-se que na safra 2002 a contaminação média por fumonisinas foi de 1,74 µg/g, sendo a variação de 1,25 a 2,53 µg/g para fumonisinas total. Para safra 2003 a contaminação média por fumonisinas foi de 5,27 µg/g, com variação de 0,04 e 9,85 µg/g. O aumento significativo ($p > 0,05$) de 60% na contaminação por fumonisinas em duas safras consecutivas (2002 e 2003) levanta a hipótese de que uma possível seleção natural esteja favorecendo linhagens de *F. verticillioides* mais adaptadas às condições empregadas no cultivo de milho, onde a falta de competição pelo substrato para crescimento, água e minerais permitiriam a estas linhagens o direcionamento à biossíntese de metabólitos secundários, como as fumonisinas.

Apesar do extenso número de bandas polimórficas encontradas entre as cepas, não se encontrou 'clusters' correlatos entre os dados de RAPD e os níveis de fumonisinas detectados. TRAN-DINH et al. (1999), analisando linhagens de *Aspergillus flavus* e/ou *A. parasiticus* toxigênicas e não-toxigênicas, afirmaram a não existência de associações entre genótipo de RAPD e potencial de produção de toxinas.

Todavia, JIMENEZ et al. (2000) analisando 29 cepas de *Fusarium* sp. (24 pertencentes ao complexo *Gibberela fujikuroi*) isoladas de banana e milho, estabeleceram correlação entre a produção de FB₁/FB₂ e variação genética determinada por RAPD.

6 CONCLUSÕES

- *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e leveduras foram detectadas em 100, 50, 16,6 e 92% das amostras de milho analisadas, respectivamente, constituindo-se na base para seleção das cepas de *F. verticillioides* visando caracterização molecular.
- No sistema de plantio direto observou-se maior contaminação natural de fumonisinas, com aumento gradativo de contaminação nos anos consecutivos de semeadura (safra 2002 e 2003).
- A estratégia de plantio da cultura do milho não interferiu, a princípio, na composição genética de populações de *F. verticillioides*, já que não se detectou 'clusters' correlatos entre análise por RAPD e níveis de fumonisinas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, D. et al. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. **International Journal of Microbiology**, v. 45, p. 217-224, 1998.
- ABRAMSON, D. Toxicans of genus *Penicillium*. In: D'Mello, J. P. F. (Ed), **Handbook of Plant and Fungal Toxicants**. CRC Press, Boca raton, FL, pp. 303-317. 1997.
- ACKERMAN, T. H., Fast thin layer chromatographic systems for fumonisins isolation and identification. **Journal Applied Toxicology**. 11, 451-455. 1991.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 3.ed. San Diego, Academic Press, 703p.,1978
- AGRONOTÍCIAS [on line]. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agronoticias>> Acesso em: 10 de abril de 2004.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York, 2. ed. 1977. 467 p.
- ALEXOPOULOS, C. J., MINS, C. W., BLACK NELL, M. **Introductory mycology**, 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- AMOAHA, B. K., MACDONALD, M. V., REZANOOR, N., NICHOLSON, P. The use of the random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section *Liseeola*. *Plant Pathology*. v.45, p.115-125. 1996.
- ANON, A. Grãos ardidos e micotoxinas no milho. **A Granja**, out/nov., p.38-43, 1995.
- ASSIGBETSE, K. B. et al. differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, v.84, p.622-626. 1994.
- AVANTAGGIATO, G. et al. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p.13-18, 2002.
- BELL, R.M., HANNUN, Y.A., MERRILL Jr, A.H. **Advances in lipid research: Sphingolipids and their metabolites** Orlando: Academic FL, v. 25-26, 1993.
- BULLERMAN, L.B.; TSAI, W.Y.L. Incidence and levels de fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of food protection**, v.57, n.6, p.541-546, 1994.
- CAMILO, S.B.; ONO, C.J.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Anti-*Fusarium moniliforme* activity and biodegradation by corn and silage microflora. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 43, n.2, p.159-164, 2000.

- CROWHURST, R. N., HAWTHORNE, B. T. RIKKERINK, E. H. A., TEMPLETON, M. D. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplified polymorphic DNA. **Curr. Genet.** v.20, p.391-396. 1991.
- DHINGA, O. D; COELHO NETTO, R.A. Micotoxinas em grãos. In: FERNJANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E.C. (Eds.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p. 49-101, 1998.
- DIVISÃO DE CONJUNTURA AGROPECUÁRIA (DCA) [on line]. Disponível em: <http://pr.gov.br/sead/serviço>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2004.
- D'MELLO, J. P. F., MACDONALD, A. M. C. Micotoxins. **Animal Feed Science and Technology**. 69, 155-166. 1997.
- Epagri, 2002. Disponível em: <<http://www.epagri.rct-sc.br>>. Acesso em 30 setembro 2002.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, **Produção de milho**. Guaíba: Agrishow Agropecuária, p.360, 2000.
- FAO/WHO. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em 25 de janeiro de 2004.
- FAWCETT, R.S. Influências do sistema plantio direto na potabilidade de água. **Plantio Direto**, n.42, p.36, 1997.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLA-OLAYA, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. New amylase inhibitor present in corn seeds active in vitro against amylase from *Fusarium verticillioides*. **Plant Disease**. v. 87, n. 3, p.233-240, 2003.
- FINK-GREMMELE, J. and GEORGIU, N. A. Risk Assessment of Micotoxins for the Consumer. In: Ennen G.; Kuiper, H. A.; Valentin, A.; eds. **Residues of Veterinary Drugs and Micotoxins in Animal Products**. NL-Wageningen, 1996. p.159-74.
- FINK-GREMMELE, J. Mycotoxins: their Implications for Human and Animal Health. **The veterinary Quartely**. v.21, n.4. p.115-20, 1999.
- FLETT, B. C.; WEHNER, F. C. Incidence of *Stenocarpilla* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **Journal of Phytopatology**. New York, v.133, n.2, p.327-333. 1991.
- Fundação ABC Disponível em: <<http://fabc@convoy.com.br>>. Acesso em 30 setembro 2002.
- GAN, Z. et al. The characterization of chicken antibodies raised against *Fusarium* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.191-200, 1997.

- GRAJAL-MAETIN, M. J., SIMON, C. J., MUEHLBAUER, E. J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f., sp. *pisi*. **Phytopathology**, v.83, p.612-614. 1993.
- GELDERBLOM, W. C., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W. F., THIEL, P. G., HOROK, R. M., VLEGGAR, R., N. P. Fumonisin – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental microbiology**, v.54. p.1806-1811.1998.
- GLIENKE, C. **Viabilidade Genética no Fungo Endófito *Guignardia citricarpa* Kiely Detectado por RAPD**. Tese (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1995.
- GOEL, S., SCHUMACHER, J., LENZ, S. D., KEMPPAINEN, B. W. Effects of *Fusarium moniliforme* isolates on tissue and serum sphingolipid concentrations in horses. **Vet. Human Toxicol.** v.38, p.265-270. 1996.
- HARA, L.N. **Interação entre *Fusarium verticillioides* e leveduras: antagonismo e produção de fumonisin no milho**. Mestrado: Londrina, PR, 2000.
- HIROOKA, E.Y. et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn Kernels. **Food Additives and Contaminants**, v.13, p.173-183, 1996.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, v.1. 533p.1985.
- JIMÉNEZ. M, RODRIGUEZ. S. MATEO J.J., GIL J. V. MATEO, R. Characterization of Gibberella fujikuroi complex isolates by fumonisin B₁ and B₂ analysis and by RAPD and restriction anaçysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Systematic and Applied Microbiology**,v.23, p.546-555. 2000.
- JOFFE. A.Z.; PALT, J.; ARBEL-SHERMAN, R. *Fusarium moniliforme* Sheld. In Israel (Gibberela fujikuroi [Saw.] Wollenw.) **Mycopath. Mycol. Appl**, v.50, p.85-107, 1973. Jungerson.
- KUIPER-GOODMAN, T, Food Safety: **Micotoxins and Phytotoxins in Perspective**. In: Miraglia, van Egmond, H.; Brera, C.; Gilbert, J.; eds. *Micotoxins and Phycotoxins – Desenlopmnts in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, p.25-48. 1998.
- LESLIE, J. F.; PLATTNER; DESJARDINS, A.E; KLITTICH, C.H.R. Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Gilbberela fujikuroil* (*Fusarium* section Liseola). **Mycotoxicology**. v.82, p.341-345, 1992
- LEVY, R.M.; PAGNOCCA, F.C.; ODA, P.; CARRERO, S.; HIROOKA, E.Y. Inibição de isolados toxigênicos de *Penicillium* e biodegradação de patulina promovidos por isolados de levedura. **Rev. brasileira de Armazenamento**, v.27, n.1, p.41-47, 2002.
- MANULIS, S., KOGAN, N., REUVEN, M., BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathology**, v.84, p.98-101. 1994.

MARASAS, W.F.O. Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In: JACKSON, L.S.; DE VRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. EDS. **Fumonisin in Food**, New York: Plenum, p.1-17, 1996.

MARASAS, W. F. O. Fumonisin: their implications for human and animal health. **Natural Toxins**, n. 3, p. 193-198, 1995.

MARASAS, W.F.O. Toxigenic Fusaria. In: SMITH, J.E.; HEDERSON, R.S. (Eds.) **Mycotoxins and Animal Foods**, Boca Raton: CRC Press, p.119-139, 1991.

MARASAS, W. F. O., NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A. **Fusarium species: Identity and Mycotoxicology**. Pennsylvania State Univ. Press. Pennsylvania State University, College Park, P. A. 1984.

MARSCHNER, H. Relationship between mineral nutrition and plant disease and pest. In: **Mineral nutrition of higher plants**. London: Acad. Press, p.369-390. 1986.]

MEGNEGNEAU, P.; DEBETS, F.; HOCKSTRA, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, Berlin, v.23, p.323-329, 1993.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings National Academy Science of the United States America**, Washington, v.88, p.9828-9832, 1991.

MILLER, J. D. Global significance of mycotoxins and phycotoxins. In: International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 9, Rome, **Anais...** Rome: Instituto Superiore di Sanità, 1996.

MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in grain: Compounds other than aflatoxin**. Minnesota: Eagan, 1994.

MOTOMURA, M.; LOURENÇO, C.E.; VENTURINI, D.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Screening and isolation of anti-*Fusarium verticillioides* compounds producing microorganisms from soil and corn. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.213-217, 1996.

MUNKVOLD, G.P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v.81, p.556-565, 1997.

MUZILLI, O. O milho em sistemas integrados de produção. In: IAPAR. **A cultura de milho no Paraná**. Londrina. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, 270p. 1991.

NELSON, P. E., TOUSSON, T. A., MARASAS, W. F. O. **Fusarium species – an illustrated manual for identification**. Pennsylvania State University Press, 193 p, 1983.

ONO, E.Y.S. et al. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. **Food and Agricultural Immunology**, v.12, p.5-14, 2000.

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

OULLET, T., SEIFERT, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD e PCR amplification. **Phytopatology**, v. 83, p.1003-1007. 1993.

PALTI, L. **Cultural practices and infectious crop diseases**. Berlin: Springer, p. 243. 1981.

PANIGRAHI, S. Alternaria toxins. In: D'Mello, J. P. F. (Ed), Handbook of Plant and Fungal Toxicants. CRC Press, Boca raton, FL, p.269-285.1997.

PARANÁ (Estado). SEAD. Paraná, 2002. Disponível em: <<http://www.sead.gov.br>> Acesso em 20 maio 2002.

PARANÁ (Estado). Instituto Agronômico do Paraná. Paraná, 2002. Disponível em: <<http://www.iapar.gov.br>>. Acesso em 20 maio 2002 a.

PARANÁ (Estado). Instituto Agronômico do Paraná. Paraná, 2002. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/celepar/seab/iapar>>. Acesso em 30 setembro 2002 b.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos Bioquímicos e Resistência às Doenças. In: LUZ, W.C. et al. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Pe. Berthier, p.1-51, 1994. v.2.

PEREIRA, O.A.P. Doenças de milho. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 538-554.1997. v.2.

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

PLATTNER, R. D., ROSS, P. F., STEDELIN, J. RICE, L. G. Analysis of corn and cultured corn for fumonisin B1 by HPLC and CG-MS by four laboratories. **J. Vet. Diagn. Invest.** v. 3. p.357-358. 1990.

PROCTOR, R.H. et al. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 38, p. 237-249, 2003.

PROCTOR, R.H. et al. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. **Fungal Genetics and Biology**. V. 27, p. 100-112, 1999.

Região Sul do Brasil: Embrapa Trigo, (www.cnpt.embrapa.br),2002. Disponível em: <http// (www.cnpt.embrapa.br),>. Acesso em 30 setembro 2002.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; HOFFMANN, L.L. Controle cultural de patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M. **Patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal rural de Pernambuco, 2000.

REIS, E.; PORCELINI, C.A. Controle cultural. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres**. v.1, p.710-716, 1995.

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

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, n. 230, p.1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J., FRISTSCH E. F. MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2. ed., 1989.

SEO, J. A.; PROCTOR, R.H.; PLATTNER, R.D. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, p.155-165, 2001.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELBERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. liq. Chromatogr.** n.13, p.2077-2087, 1990.

SILVA, R.T.V. **Incidência de *Fusarium verticillioides* e outros fungos em grãos de milho produzidos sob diferentes sistemas de semeadura, sucessões de cultura e adubações de cobertura**. 2004. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina.

SWEELEY, C.C. Sphingolipids. In: **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**, VANCE, D.E., VANCE, J.E. Eds, Elsevier Science Publ., Amsterdam, p.327-361, 1991.

SYDENHAM, E. W., SHERPHERD, GT. S., THIEL, P. G. Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** v. 75, p. 313-318. 1992.

TRAN-DINH, N. PITT, J. I, CARTER. D. A. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Mycological Research**; v. 103, p.1485-1490. 1999.

UENO, Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. **Mycotoxins**, v. 50, p. 13-22, 2000.

_____. et al. Natural toxins series: (2) sphingosine like mycotoxin fumonisin. **The Journal of Toxicological Science**, v. 12, p.27-39, 1996.

_____. et. al A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin. Res**, n.9, p.27-34, 1993.

VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. In: FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Eds.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p.303-338, 2000.

VISCONTI, A.; BOENKE, A. Improvement of the determination of fumonisins (FB₁ and FB₂) in maize –based feeds. **European Commission BCR Information – Chemical Analysis**, Belgium, Brussels, 1995.

VIQUEZ, O. M., CASTELL-PEREZ, M. E., SHELBY, R. A., Ocurrence of fumonisin in maize grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.* v. 44, p.2789-2791

ZAMBOLIN, L.; CASA, R.T.; REIS, E.M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.4, p.585-595, 2000.

_____.; VENTURA, J.A. Resistência estável a doenças de plantas. In: LUZ, W.C. et al. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Pe. Berthier, v.1, p.239-273, 1993.

WANG, G.; et al. (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related strains. **Nucleic Acids Research**, London, v.21, p.5930-5933, 1993.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal Biol. Chem.**, v. 266, p.14486-14490, 1991.

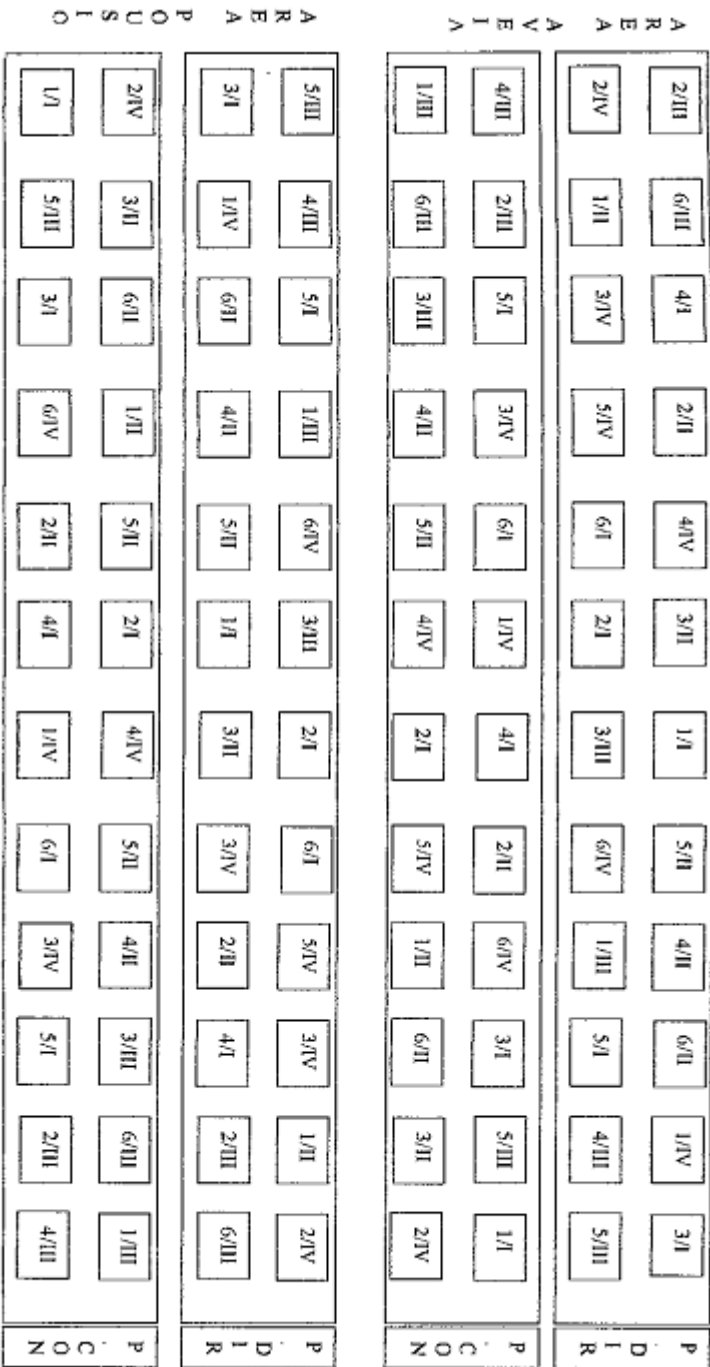
WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K. et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v. 218, p.704-740, 1993.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p.6531-6535, 1990.

ANEXO

Anexo 1: Croqui para o cultivo de milho na área experimental FAZESC-UEL, **1-SEM** APLICACAO DE N; **2- 50%** DNRC; **3- 100%** DNRC; **4- 200%** DNRC; **5- 100%** DRNC+ K; **6- 100%** DRNC+ Ca



Onde: DRNC= dose de nitrogênio recomendada para cobertura; P. DIR=plântio direto; P. CONV=plântio convencional

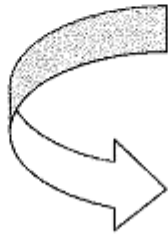
Continue...

Probabilities for Post Hoc Tests
INTERACTION: 1 x 2

VAR2	VAR5	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1 d	(1)	.973417	.337333	3.580000	3.342500	7.200833	3.480833
1 c	(2)	.993602	.087462	.155755	.076119		
2 d	(3)	.087462	.999703		.999994		
2 c	(4)	.155755			.999968		
3 d	(5)						
3 c	(6)	.076119	.999994	.999968			

Means (ee sta) Fumonisinas total
F(2,138)=6.52; p<.0020

Ano/ plantio	VAR4
1 d	.973417 bc
1 c	.337333 c
2 d	3.580000 b
2 c	3.342500 b
3 d	7.200833 a
3 c	3.480833 b



Means (ee sta) FBI
F(2,138)=6.08; p<.0030

Ano/ plantio	VAR3	Cdef
1 d	.638167	Cdef
1 c	.301750	ef
2 d	2.510000	Bede
2 c	2.758333	Bd
3 d	4.560000	A
3 c	2.425833	Bede



Continue...

Probabilities for Post Hoc Tests
INTERACTION: 1 x 2

VAR2	VAR5	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1 d	(1)	.638167	.301750	2.510000	2.758333	4.560000	2.425833
1 c	(2)	.990121	.998121	.052523		.056665	
2 d	(3)	.062523		.997692		.999982	
2 c	(4)					.986193	
3 d	(5)						
3 c	(6)	.056665	.999982	.986193			