



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HELENA PAULA VIARO

**INCIDÊNCIA DE *Aspergillus* SECÇÃO *Flavi* E
AFLATOXINAS EM GRÃOS DE MILHO SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Londrina
2015



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HELENA PAULA VIARO

**INCIDÊNCIA DE *Aspergillus* SECÇÃO *Flavi* E
AFLATOXINAS EM GRÃOS DE MILHO SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Londrina
2015

HELENA PAULA VIARO

**INCIDÊNCIA DE *Aspergillus* SECÇÃO *Flavi* E
AFLATOXINAS EM GRÃOS DE MILHO SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Daniele Sartori

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V619i Viaro, Helena Paula.
Incidência de *Aspergillus* seção *Flavi* e aflatoxinas em grãos de milho sob diferentes condições de fertilização nitrogenada / Helena Paula Viaro. – Londrina, 2015.
88 f. : il.

Orientador: Maria Helena Peleginelli Fungaro.

Coorientador: Daniele Sartori.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. *Aspergillus* – Teses. 2. Aflatoxina – Teses. 3. Milho – Genética – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. 5. Biologia molecular – Teses. I. Fungaro, Maria Helena Peleginelli. II. Sartori, Daniele. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Instituto Agrônomo do Paraná. V. EMBRAPA. VI. Título.

CDU 631.52:633.15

HELENA PAULA VIARO

**INCIDÊNCIA DE *Aspergillus* SEÇÃO *Flavi* E AFLATOXINAS EM
GRÃOS DE MILHO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE
FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Sílvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Lara Munique Ferracin
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 06 de Março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao Programa de Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade de aprimorar minha formação intelectual e profissional e por todo respaldo oferecido pela coordenação do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Dr^a Maria Helena P. Fungaro, por sua dedicação e empenho durante todo o trabalho e por ser um exemplo de profissional.

À professora Dr^a Daniele Sartori, pela co-orientação, amizade e por todas suas contribuições.

Ao professor Dr. Josué Maldonado Ferreira e toda equipe do Laboratório de Melhoramento Genético da UEL, pela fundamental parceria neste trabalho e apoio nos dados estatísticos.

A toda equipe do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas, especialmente aos professores Dr^a Claudete F. Ruas e Dr. Paulo M. Ruas, pelo auxílio na condução dos experimentos de AFLP. À professora Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono e à sua aluna Jaqueline Bordin pelo auxílio na extração e dosagem das aflatoxinas.

Aos meus colegas de laboratório, Fernanda Pelisson Massi, Josué Silva, Karla Murata, Larissa Ferranti, Rafael Penha, pela convivência e amizade.

Agradeço à minha família e amigos, especialmente à minha mãe, Lurdes, por todo apoio e compreensão nos momentos de dificuldade e de ausência pela falta de tempo.

Ao meu marido, Henrique, por seu companheirismo, amizade e grande amor.

A Deus, por ter me amado com amor incondicional.

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

Muito obrigada.

VIARO, Helena Paula. **Incidência de *Aspergillus* secção *Flavi* e aflatoxinas em grãos de milho sob diferentes condições de fertilização nitrogenada.** 2015. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais suscetíveis à contaminação por micotoxinas, especialmente fumonisinas e aflatoxinas. Neste trabalho foram investigadas a incidência de *Aspergillus* da secção *Flavi* e a contaminação por aflatoxinas em grãos provenientes de quatro diferentes genótipos de milho, cultivadas em dois locais (Florestópolis-PR e Londrina-PR), sob quatro condições de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal, fixadoras de nitrogênio. Das amostras de milho provenientes de ambas as localidades analisadas, três principais gêneros fúngicos foram identificados: *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Os grãos de milho colhidos em Florestópolis estiveram mais infectados com *Aspergillus* do que os grãos colhidos em Londrina. Cerca de 90% dos *Aspergillus* isolados foram identificados como espécies pertencentes à secção *Flavi*. Dentre as espécies pertencentes à secção *Flavi* detectou-se o predomínio de *A. flavus* (87%), seguido de *A. novoparasiticus* (5%), *A. parasiticus* (4%), *A. pseudocaelatus* (2%), *A. arachidicola* (1%) e de *A. tamarisii* (1%), com exceção da espécie *A. tamarisii*, todas potenciais produtoras de aflatoxinas. As condições de fertilização nitrogenada não interferiram na incidência de *Aspergillus* spp. Os valores médios de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) nos grãos recém-colhidos variaram entre os diferentes tratamentos, desde não detectado até 1.006 µg/kg, mas não houve correlação entre as diferentes condições de fertilização nitrogenada.

Palavras-chaves: *Aspergillus* secção *Flavi*. Aflatoxinas. Milho. AFLP. Identificação molecular.

VIARO, Helena Paula. **Incidence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in corn grains under different conditions of nitrogen fertilization.** 2014. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most susceptible crops to contamination by mycotoxins, especially aflatoxins and fumonisins. In this study, the incidence of *Aspergillus* section *Flavi* and the aflatoxin contamination were investigated in grains, which were harvested from four corn genotypes cultivated in two localities (Florestópolis-PR and Londrina-PR) in four conditions of nitrogen fertilization, including the use of inoculants containing the plant growth-promoting bacteria, nitrogen-fixing bacteria. Three main fungal genera were identified in maize samples from both localities: *Fusarium*, *Penicillium* and *Aspergillus*. The corn grains harvested in Florestópolis were more infected with *Aspergillus* section *Flavi* than the ones harvested in Londrina. About 90% of the isolates were identified as *Aspergillus* species belonging to the section *Flavi*. Among these species, a predominance of *A. flavus* was observed (87%), followed by *A. novoparasiticus* (5%), *A. parasiticus* (4%), *A. pseudocaelatus* (2%), *A. arachidicola* (1%) and *A. tamarii* (1%) all potential aflatoxin producers, except *A. tamarii*. The nitrogen fertilization conditions did not affect the incidence of *Aspergillus* spp. The levels of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) in freshly harvested corn grains was variable ranging from not detected up to 1,006 µg/kg, but no significant correlation between the variation in aflatoxin levels and different nitrogen fertilization conditions was detected.

Keywords: *Aspergillus* section *Flavi*. Aflatoxin. Maize. AFLP. Molecular identification.

LISTA DE ABREVIÇÕES E UNIDADES

μg	Micrograma
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Ab-V5	Estirpe bacteriana de <i>Azospirillum brasilienses</i>
AC	Adubação completa
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
<i>afID (nor-1)</i>	Gene que codifica uma enzima redutase
<i>afIE (norA)</i>	Gene que codifica uma enzima redutase/desidrogenase
<i>afIF (norB)</i>	Gene que codifica uma enzima desidrogenase
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
<i>afIK (vbs)</i>	Gene regulador da síntese de versicorolina B
AFM1	Aflatoxina M1
AFM2	Aflatoxina M2
<i>afIM (ver-1)</i>	Gene que codifica Cetoreductase
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
<i>afIP (omtA)</i>	Gene que codifica O-Metiltransferase
<i>afIR</i>	Gene regulador da transcrição do <i>cluster</i> de biossíntese da aflatoxina
<i>afIT</i>	Gene que codifica um transportador de aflatoxinas
AP	Adubação de plantio
a_w	Atividade de água
BPCV	Bactéria promotora do crescimento vegetal
Bt2a	<i>Primer</i> de β -tubulina <i>forward</i>
Bt2b	<i>Primer</i> de β -tubulina reverso
CA	Milho crioulo (Caiano)
cmd5	<i>Primer</i> de Calmodulina <i>forward</i>
cmd6	<i>Primer</i> de Calmodulina reverso

CYA	Meio Czapek Yeast Autolysate
DMST	Dimetil-esterigmatocistina
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
FAS	Ácido-graxo sintetase
HC	Híbrido comercial (P30F53HX).
IA	Adubação de plantio + Inoculante Ab-V5
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
IM	Adubação de plantio + Inoculante ZM
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
ITS	Espaços internos transcritos
ITS1	<i>Primer dos espaços internos transcritos forward</i>
ITS4	<i>Primer dos espaços internos transcritos reverse</i>
Kb	Kilobase
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mM	Milimolar
mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramas
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>
nm	Nanômetros
NOR	Ácido norsolorínico
NRRL	<i>Agricultural Research Service Culture Collection</i>
ND	Não detectável
Nt	Nucleotídeos
OMST	O-metil esterigmatocistina
pb	Pares de bases

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PKS	Policetídeo sintase
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
rRNA	RNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
S	Subunidade
ST	Esterigmatocistina
U	Unidades
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean</i>
UV	Luz ultravioleta
V1	Variedade sintética (ST0509)
V2	Variedade sintética (ST1309)
ZM	Estirpe bacteriana de <i>Methylobacterium komagatae</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química das principais aflatoxinas e do composto intermediário esterigmatocistina (ST). Na representação da aflatoxina B1, o núcleo cumarínico encontra-se destacado. Fonte: adaptada de VARGA et al. (2009)19
- Figura 2** – *Cluster* gênico da aflatoxina, composto de 29 diferentes genes, localizado próximo ao telômero do cromossomo 3. Os nomes mais recentes dos genes estão acima da linha vertical e os nomes antigos abaixo. As setas ao longo da linha vertical indicam o sentido da transcrição dos genes. As setas em cor-de-rosa indicam os genes reguladores da via; a seta azul indica o gene que codifica a poliketideosintase (pksA) que juntamente com os ácidos-graxos sintetases (aflA e aflB) formarão o primeiro precursor estável na via, o ácido norsolorínico (NOR); as setas alaranjadas indicam os genes que farão a conversão do NOR em esterigmatocistina (ST); as setas verdes indicam os genes responsáveis pela conversão de ST nos diferentes tipos de aflatoxinas; e as setas cinzas correspondem a genes cujas funções ainda não estão esclarecidas. Fonte: adaptado de AMAIKE e KELLER (2011).....30
- Figura 3** – Esquema mostrando os vários conjuntos de dados que podem ser combinados para uma identificação taxonômica polifásica em *Aspergillus*. Fonte: adaptado de SAMSON e VARGA (2009).32
- Figura 4** – Gráfico climatográfico referente às temperaturas médias e índices de pluviosidade registrados para Londrina e Florestópolis, no período de 02 de novembro 2012 (plantio) a 06 de abril de 2013 (colheita). Dados concedidos pelo Instituto Agronômico do Paraná (2014).37

Artigo Científico

- Figura 1** – Gráfico climatográfico referente às temperaturas médias e índices de pluviosidade registrados para Londrina e Florestópolis, no período de 02 de novembro 2012 (plantio) a 06 de abril de 2013 (colheita). Dados concedidos pelo Instituto Agronômico do Paraná (2014).....52
- Figura 2** – Dendrograma gerado pelo o método UPGMA baseado em uma matriz de similaridade obtida com o coeficiente de Jaccard, dos perfis gerados pela técnica de AFLP dos 86 isolados pertencentes à secção *Flavi*. Os valores de *bootstrap* > 70 % foram indicados por valores numéricos.59
- Figura 3** – Árvore de Neighbor-Joining (NJ) baseada nas sequências de β -tubulina dos isolados de *Aspergillus* secção *Flavi*. As sequências das linhagens tipo ou referência foram obtidas no GenBank (acesso em 17-10-2014). Os valores de *bootstrap* > 70 % foram indicados por valores numéricos.60
- Figura 4** – Representação do alinhamento de *A. novoparasiticus* e *A. parasiticus* utilizando-se o programa BioEdit.....61
- Figura 5** – Rede bipartida indicando a proporção entre as diferentes espécies de *Aspergillus* spp. (colunas de cima), nos diferentes tratamentos analisados em Florestópolis (colunas de baixo). O tamanho das barras indica quantitativamente o número de isolados de *Aspergillus* e a largura das linhas indica a quantidade proporcional de cada espécie de *Aspergillus* em cada tratamento. As cores das colunas de cima representam o potencial produtor de cada espécie fúngica isolada, sendo: verde escuro (potencial produtor de AFB), verde intermediário (produtor de AFB+AFG), verde claro (não produtor). As cores nas colunas de baixo representam os tipos de aflatoxinas encontradas nos diferentes tratamentos, sendo que o gradiente de cores representa: vinho (AFB+AFG), rosa intermediário (AFB), rosa claro (não detectado).62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites Máximos Tolerados (LMT) para aflatoxinas em alimentos determinados pela Resolução - RDC No. 7 de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011)	20
---	----

Artigo Científico

Tabela 1 – Percentual de infecção fúngica em ambos os locais de plantio (Londrina-PR e Florestópolis-PR).....	56
Tabela 2 – Percentual de grãos infectados, número de colônias de fungos, número de colônias de <i>Aspergillus</i> e percentual de espigas danificadas de milho cultivado em Londrina e Florestópolis, analisados de acordo com as diferentes condições de fertilização nitrogenada. Legenda: AC (Adubação completa); AP (Adubação de plantio); IA (Adubação de plantio + Inoculante Ab-V5); IM (Adubação de plantio + Inoculante ZM).....	57
Tabela 3 – Isolados do gênero <i>Aspergillus</i> obtidos nas regiões de Florestópolis-PR e Londrina-PR de grãos de milho cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada, identificados por métodos morfológicos e moleculares.	58
Tabela 4 – Relação entre as potenciais espécies aflatoxigênicas e os níveis de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) encontrados para os tratamentos de Florestópolis-PR.	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Micotoxinas	17
2.2	Aflatoxinas	18
2.3	Milho e aflatoxinas	21
2.4	Fungos produtores de Aflatoxinas: Secção <i>Flavi</i>	27
2.5	<i>Cluster</i> gênico da biossíntese de aflatoxinas	29
2.6	Identificação molecular de <i>Aspergillus</i> secção <i>Flavi</i>	32
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Material Biológico e Condições de Cultivo	36
4.1.1.	Inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).....	36
4.1.2.	Genótipos de milho	36
4.2	Identificação morfológica de fungos	38
4.3	Análise estatística: ANAVA e Tukey.....	38
4.4	Extração de DNA genômico	39
4.5	Tratamento dos ácidos nucleicos com RNase A e quantificação do DNA genômico	40
4.6	Análise da variabilidade genética de <i>Aspergillus</i> secção <i>Flavi</i> através de AFLP.....	40
4.7	Análise dos dados de AFLP	42
4.8	Amplificação das regiões ITS, β -tubulina e calmodulina	42
4.9	Purificação dos produtos amplificados: ITS, β -tubulina e calmodulina	43
4.10	Sequenciamento dos produtos amplificados e purificados correspondentes às regiões ITS, β -tubulina e calmodulina.....	44
4.11	Purificação da reação de sequenciamento	44
4.12	Análises das sequências de nucleotídeos obtidas	45
4.13	Determinação de Aflatoxinas	45

4.14	Rede bipartida	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Artigo científico: “Incidência de <i>Aspergillus</i> secção <i>Flavi</i> e aflatoxinas em grãos de diferentes genótipos de milho cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada”	48
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se encontra entre os três principais produtores mundiais de grãos de milho. No ano de 2013 o país produziu cerca de 80 milhões de toneladas, considerando as suas duas safras anuais (verão e safrinha). Dentre os fatores que podem interferir na comercialização e exportação dos grãos de milho está a contaminação por micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies fúngicas que causam agravos à saúde humana e animal (BRYDEN, 2012). Embora nos últimos anos a cultura do milho no Brasil tenha sido uma das que mais sofreu desenvolvimentos tecnológicos e a que obteve maiores avanços de produtividade, o controle da contaminação dos grãos por micotoxinas ainda se constitui em um desafio a ser vencido. De fato, a contaminação dos grãos de milho e seus derivados, especialmente rações, por micotoxinas têm sido relatada no mundo todo. No Brasil o clima predominantemente tropical favorece o plantio e a produção agrícola, mas essas mesmas condições, alta umidade e temperatura, também favorecem de forma substancial o desenvolvimento de fungos e a contaminação de grãos por micotoxinas (SALAY e MECADANTE, 2002; SIMAS et al., 2007; BINDER et al., 2007).

Dentre os fungos produtores de micotoxinas no milho, os pertencentes ao gênero *Aspergillus*, em especial à secção *Flavi*, que abarcam as principais espécies produtoras de aflatoxinas (VARGA et al., 2011) têm sido considerados como de grande relevância. Vários estudos têm buscado avaliar os níveis de contaminação do milho com aflatoxinas, bem como, sua relação com diferentes espécies do gênero *Aspergillus* secção *Flavi* (RAMOS et al., 2008; PLEADIN et al., 2014; PERRONE et al., 2014). A taxonomia dessa secção é muito complexa e tem sofrido constantes mudanças. A última revisão sobre essa secção foi feita por Varga e colaboradores (2011), que a subdividiram em sete clados, sendo eles: *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. nomius*, *A. togoensis*, *A. leporis*, *A. avenaceus* e *Petromyces alliaceus*, tendo sido consideradas no total, 21 espécies. No entanto, nos últimos três anos um total de cinco novas espécies foram descritas para essa secção: *A. novoparasiticus* (GONÇALVES et al., 2012a); *A. bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012); *A. mottae*, *A. sergii* e *A. transmontanensis* (SOARES et al., 2012).

A descrição de novas espécies nos mais diversos grupos de *Aspergillus* é, em grande parte, decorrente da incorporação de métodos moleculares que passaram a

permitir melhor discriminação de grupos taxonômicos. Embora os métodos moleculares estejam cada vez mais disponíveis nos laboratórios de pesquisa são poucos os estudos que têm utilizado a identificação molecular, em associação com dados morfológicos, de *Aspergillus* isolados de grãos de milho cultivados no Brasil (ROCHA et al., 2012).

Considerando a importância e a crescente preocupação com a ocorrência de micotoxinas em milho, medidas preventivas que procurem minimizar a infecção por patógenos são de suma importância. O desenvolvimento de cultivares de milho geneticamente modificadas tem minimizado os efeitos causados por insetos praga, aumentando indiretamente, a resistência à infecção fúngica, uma vez que danos aos grãos favorecem o estabelecimento desses patógenos e conseqüentemente a contaminação por aflatoxinas e fumonisinas (WU, 2006; FOLCHER et al., 2010).

Dentre as práticas agrícolas, a rotação de culturas tem se mostrado eficaz na redução de fungos micotoxigênicos que acometem a cultura do milho (BERZSENYI et al., 2000; MUNKVOLD, 2003; ABBAS et al., 2004; JAIME-GARCIA e COTTY 2010). O regime de fertilização também é uma prática cultural que pode afetar a contaminação dos grãos com micotoxinas. Vários autores demonstraram que a quantidade e a forma com que o nitrogênio é aplicado podem influenciar na incidência e quantidade de micotoxinas (TUBAJIKA et al., 1999; BLANDINO et al., 2008; ABBAS et al., 2009). Atualmente, alguns agricultores brasileiros, seja pelo alto custo do nitrogênio mineral ou pela conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente, têm se interessado pelo uso de inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal, fixadoras de nitrogênio. No entanto, até o presente, nenhum trabalho investigou o efeito do uso destes inoculantes, sob a microbiota e presença de micotoxinas em grãos de milho.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo identificar, por meio de análises morfológicas e moleculares, espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de grãos de milho de quatro genótipos sob diferentes condições de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de inoculantes à base de *Azospirillum brasilense* (AbV5) e *Methylobacterium komagatae* (ZM).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos filamentosos que podem contaminar alimentos (SWEENEY e DOBSON, 1998). Sabe-se que as micotoxinas podem induzir efeitos crônicos ou até mesmo agudos, quando ingeridas em grande quantidade, podendo desencadear atividades mutagênicas, carcinogênicas, teratogênicas e imunossupressoras (BINDER et al., 2007; BRYDEN, 2007).

A produção de micotoxinas é dependente de diferentes fatores, tais quais as espécies fúngicas, a composição dos substratos, as práticas agrícolas inadequadas e condições climáticas favoráveis (WICKLOW, 1995; KLICH, 2007; BRYDEN, 2009).

Já foram identificados aproximadamente trezentos tipos de micotoxinas. Contudo, apenas vinte são encontrados frequentemente como contaminantes de produtos agroindustriais (KONIETZNY e GREINER, 2003). Dentre os vinte tipos de micotoxinas recorrentes, seis são consideradas as de maior importância do ponto de vista da saúde pública: as aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), ocratoxina A, patulina, fumonisinas, deoxinivalenol e zearalenona (AMARAL et al., 2006).

Dentre as espécies fúngicas conhecidas por possuírem um elevado potencial na produção de micotoxinas, pode-se destacar, até o momento, algumas espécies do gênero *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., e *Penicillium* spp. (SWEENEY e DOBSON, 1998). As principais micotoxinas relacionadas a esses três principais gêneros são: Aflatoxinas, metabólito secundário biossintetizados por algumas espécies do gênero *Aspergillus*; Fusariotoxinas, produzidas por algumas espécies do gênero *Fusarium*, sendo as principais: zearalenona, fumonisina e tricoteceno; e as Ocratoxinas, produzidas por duas espécies do gênero *Penicillium* e várias espécies do gênero *Aspergillus* (ETZEL, 2002; KAWASHIMA et al., 2006).

As micotoxinas podem ser encontradas em diversos substratos alimentares, podendo comumente ser detectada a presença de diferentes micotoxinas em um mesmo substrato, fato este, que implica em uma grande preocupação em relação à saúde humana e animal, uma vez que os efeitos de interação entre as diferentes micotoxinas ainda estão sendo elucidados (SEDMIKOVA et al., 2001; PRELLE et al., 2014).

2.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram primeiramente identificadas em 1960 na Inglaterra após um surto causado por hepatite aguda, decorrente da ingestão de rações contaminadas com esta micotoxina, culminando com a morte de milhares de perus (BLOUNT, 1961).

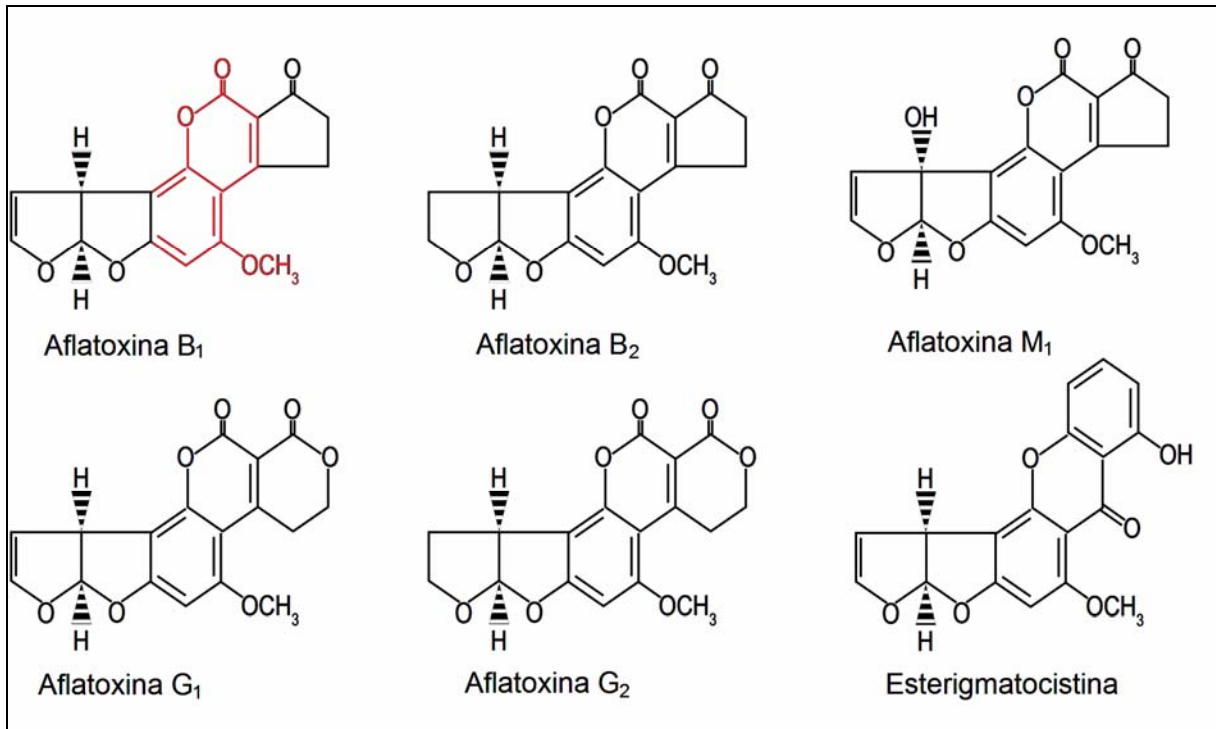
Atualmente sabe-se da existência de diferentes tipos de aflatoxinas, como as aflatoxinas do tipo B, (AFB₁ e AFB₂), do tipo G (AFG₁ e AFG₂) e do tipo M (AFM₁ e AFM₂). As aflatoxinas B e G receberam esta denominação por emitirem fluorescência azul (do inglês “blue”) e verde (do inglês “green”), respectivamente, quando expostas à luz ultravioleta em A_{366nm} (HARTLEY et al., 1963). Já as aflatoxinas M, são assim denominadas por terem sido primeiramente observadas por Allcroft e Carnaghan (1962) no leite (do inglês “milk”).

Em relação à estrutura química das aflatoxinas, esses metabólitos compõem um grupo de compostos heterocíclicos oxigenados (Figura 1), com núcleo cumarínico fundido com um anel bifurano, que pode estar ligado a uma pentatona, no caso das aflatoxinas B e M, ou um anel 6-lactona, no caso da estrutura das aflatoxinas G (ELLIS, 1991; COULOMBE, 1993), sendo a esterigmatocistina (ST) um dos principais metabólitos precursores da formação das aflatoxinas.

Quanto à toxicidade, a AFB₁ é a que possui maior potencial de ação quando ativada metabolicamente (CASTEGNARO e WILD, 1995), em contraste, com a AFM₁ que possui menor magnitude de toxicidade em relação aos outros tipos de aflatoxinas (PRANDINI et al., 2009).

Embora existam variações quanto aos efeitos tóxicos causados pela exposição à aflatoxinas, conforme a última resolução da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, há evidências suficientes em relação à carcinogenicidade das aflatoxinas, especialmente para o fígado, induzindo o carcinoma hepatocelular (IARC, 2012). Além do efeito carcinogênico, a exposição às aflatoxinas pode proporcionar o desenvolvimento de efeitos imunossupressores, hepatotóxicos, além de outros efeitos patológicos (ELLIS et al., 1991; LEWIS et al., 2005; BRYDEN, 2012).

Figura 1 – Estrutura química das principais aflatoxinas e do composto intermediário esterigmatocistina (ST). Na representação da aflatoxina B₁, o núcleo cumarínico encontra-se destacado.



Fonte: adaptada de VARGA et al. (2009).

As aflatoxinas podem ser encontradas em diversos substratos, como por exemplo, nozes, figos, sementes oleaginosas, tabaco, frutas secas, milho, amendoim, entre outros (BENNET e KLICH, 2003; KUMAR et al., 2008). Com o objetivo de prevenir a exposição a alimentos contendo micotoxinas, a maior parte dos países possui regulamentações para os níveis aceitáveis de aflatoxina em alimentos comumente contaminados.

No Brasil, a última resolução da ANVISA acerca dos limites toleráveis de micotoxinas em alimentos foi a Resolução - RDC n°7, de 18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011). Segundo esta resolução, os valores de aflatoxinas permitidos em alimentos correspondem ao somatório dos diferentes tipos de AFB e AFG, tendo sido relatados separadamente os níveis permitidos para AFM₁. No caso do milho, conforme a Tabela 1, o limite máximo tolerável de aflatoxinas para milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho é de 20 µg/kg.

Tabela 1 - Limites Máximos Tolerados (LMT) para os níveis de aflatoxinas em determinados alimentos.

Micotoxinas	LMT (µg/kg)	Alimento
Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	5	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada
	5	Feijão
	10	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas
	10	Frutas desidratadas e secas
	20	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto
	10	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto
	15	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior
	1	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)
	1	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância
	10	Amêndoas de cacau
	5	Produtos de cacau e chocolate
	20	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, pimentas: pimenta em pó pimentas, pimenta caiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo pimenta branca e preta); <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiberofficinal</i> (gengibre); <i>Curcuma longa</i> . Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das indicadas
	20	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim
20	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	

Continuação Tabela 1.

Micotoxinas	LMT (µg/kg)	Alimento
Aflatoxina M1	0,5	Leite fluído
	5	Leite em pó
	2,5	Queijos

Fonte: adaptado da Resolução - RDC No. 7,18 de fevereiro de 2011 (BRASIL, 2011).

2.3 Milho e aflatoxinas

O Brasil se encontra entre os três principais produtores mundiais de milho (*Zea mays* L.). No ano de 2013 o país produziu cerca de 80 milhões de toneladas de grãos considerando as suas duas safras anuais (safrinha e verão). Além da relevância do milho no agronegócio este cereal também se destaca como um dos mais cultivados pela agricultura familiar brasileira seja para a subsistência ou para venda local (CRUZ et al., 2006).

Em sua base, o grão de milho é composto em mais de 70% de amido, seguido de proteínas e fibras, que juntas somam mais de 20% de sua constituição, e também, por óleo em menor quantidade. Sendo assim, é considerado um alimento energético para as dietas humana e animal (PAES, 2006). Por conta de sua composição e alto valor nutricional, o milho é considerado um dos principais cereais cultivados no mundo, pois além de ser amplamente utilizado no setor alimentício, serve também de matéria-prima para diversos produtos industriais, como elementos espessantes e colantes, além da produção de óleos e etanol (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000; ASSIS, 2004; SILVA et al., 2009). No Brasil, mais de 53% do milho produzido é utilizado para a alimentação animal, especialmente de aves, cujo consumo corresponde à aproximadamente 58% do milho destinado a rações, seguido dos suínos (27%), bovinos (9%) e outros animais (7%) (ABIMILHO, 2014).

Por ser um cereal de grande influência no setor econômico e suscetível a doenças, pragas e a oscilações climáticas, fatores que contribuam com o aumento da produtividade e resistência dos grãos são constantemente investigados na cultura

do milho. Muitos programas de melhoramento genético já foram desenvolvidos em universidades, centros de pesquisas, e empresas públicas e privadas no Brasil para a geração de variedades ou híbridos mais resistentes a estresses bióticos e abióticos, bem como grãos com maior qualidade nutricional (BORÉM, 2005; LOPES et al., 2007).

Como consequência do melhoramento genético as populações de milho crioulo, acabaram sendo consideradas, comumente, pouco produtivas. O milho crioulo é aquele que não sofreu intervenções genéticas e que é cultivado invariavelmente pela agricultura familiar. Essas populações, porém, são de extrema importância por constituírem uma fonte de variabilidade genética que pode ser explorada na busca por genes tolerantes e/ou resistentes a fatores bióticos e abióticos (ARAÚJO e NASS, 2002). Além disso, em condições em que baixas tecnologias de cultivo são empregadas, as cultivares comerciais podem apresentar desempenho próximo ou mesmo inferior às variedades crioulas. Entre as vantagens do uso dessas variedades locais, se destacam a sustentabilidade da produção como, por exemplo, resistência a doenças, pragas, desequilíbrios climáticos e o armazenamento de sementes selecionadas para as safras seguintes, minimizando assim, os custos produtivos (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2010).

Em relação ao setor econômico, a qualidade dos grãos é um dos fatores mais preocupantes. Uma das formas frequentemente utilizadas para inferir sobre qualidade dos grãos é a avaliação da porcentagem de grãos ardidos, que são aqueles que apresentam consideráveis alterações em suas características morfológicas. A ocorrência de grãos ardidos está diretamente relacionada à resistência genética das diferentes variedades de milho a patógenos, como também às condições ambientais. Além disso, a presença de pragas e fungos, adubações desequilibradas, período chuvoso no final do ciclo, atraso na colheita e incidência de algumas doenças podem influenciar no incremento do número de grãos ardidos (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000; COSTA et al., 2010).

Apesar de em muitas regiões tropicais e subtropicais, o clima favorecer o plantio e a produção agrícola durante todo o ano, essas mesmas condições, alta umidade e temperatura, também propiciam o desenvolvimento de fungos nas plantações (RIBEIRO, 2003). No caso do milho, o processo de infecção por fungos nas sementes e grãos, geralmente, começa no campo, durante a fase de maturação,

e prossegue nas etapas seguintes: colheita, secagem, armazenamento, transporte e processamento (LAZZARI, 1997; CASELA et al., 2006).

Dentre os principais fungos que causam agravos à cultura do milho, se destacam: *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. A infecção por alguns gêneros fúngicos, como *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, pode resultar na produção de metabólitos tóxicos por parte desses fungos, as micotoxinas. Essas, por sua vez, acabam por comprometer a qualidade do milho e sua viabilidade ao consumo humano e animal (FREIRE et al., 2007).

Considerando a importância e a crescente preocupação com a ocorrência de grãos ardidos e micotoxinas em milho, medidas preventivas que procurem minimizar a infecção por patógenos são de suma importância. Dentre essas, pode-se destacar a rotação de culturas (PINTO et al., 2007). Esta técnica consiste na alternância ordenada de diferentes culturas, na mesma área e na mesma estação do ano, em determinado espaço de tempo (ciclo) (FRANCHINI et al., 2011). A rotatividade de culturas, além de contribuir para um maior rendimento, tem se mostrado eficaz na redução de fungos micotoxigênicos que acometem a cultura do milho (BERZSENYI et al., 2000; MUNKVOLD, 2003; ABBAS et al., 2004; JAIME-GARCIA e COTTY, 2010).

Sua eficácia está associada à redução dos inóculos abaixo do limiar numérico de infecção através da supressão de alimentos, uma vez que a fonte nutricional desses patógenos é eliminada a partir da decomposição ou mineralização da matéria orgânica dos restos culturais e exaustão nutricional do substrato, além de ocorrer o aumento da atividade de microrganismos antagonistas no solo, o que acaba por gerar competição e consequente redução dos possíveis contaminantes (REIS et al., 2011).

Por ser considerada uma medida preventiva, a rotação de culturas têm se mostrado uma estratégia eficaz na redução de danos, assim como a utilização de cultivares mais resistentes. Trabalhos como de Costa e colaboradores (2010) têm buscado a obtenção de híbridos experimentais menos suscetíveis a patógenos. Os autores observaram que a maior resistência esteve associada às características genéticas dos diferentes híbridos analisados e às condições ambientais nas quais foram submetidos.

Da mesma forma, o plantio do milho geneticamente modificado, também propõe minimizar efeitos causados por patógenos. O milho Bt, por exemplo, é uma cultivar resistente a determinadas espécies de insetos, no qual foram introduzidos genes específicos de uma bactéria presente no solo, *Bacillus thuringiensis* (Bt), que induz a produção de uma proteína tóxica na planta que é específica para determinados grupos de insetos (CRUZ et al., 2011).

A resistência de milhos Bt em relação à infecção fúngica foi analisada por Wu (2006) nos Estados Unidos. Segundo a autora, foi observada uma redução significativa na contaminação de híbridos transgênicos por aflatoxinas e fumonisinas. Folcher et al. (2010) ao analisar híbridos de milho com e sem a transgenia Bt, também obtiveram níveis significativamente menores de infecção por fumonisinas nas amostras de milho com a tecnologia Bt.

Segundo Cruz e colaboradores (2011), a redução do uso de inseticidas a partir de cultivares menos suscetíveis aos ataques de patógenos, como no caso do milho Bt, diminui os riscos de intoxicação, contaminação do meio ambiente, e entre outros fatores, as cultivares que possuem essa tecnologia, são menos atacadas por fungos, podendo assim, minimizar a contaminação por micotoxinas.

Outro fator relevante acerca da cultura do milho se refere à fertilização nitrogenada. Entre os macronutrientes fundamentais para a nutrição das plantas, o nitrogênio se destaca por ser um constituinte essencial de proteínas, além de interferir diretamente no processo fotossintético, pela sua participação na molécula da clorofila (ANDRADE et al., 2003). Por conta dessa grande importância, estudos envolvendo a utilização de inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), que propiciam a fixação de nitrogênio e outros nutrientes têm sido desenvolvidos (ARAUJO et al., 2010; PINTO JUNIOR et al., 2011; BRZEZINSKI et al., 2014).

Em um destes estudos, Cavallet e colaboradores (2000) testaram a inoculação de sementes de milho com um produto biotecnológico comercial à base de *Azospirillum* spp. denominado “Graminante”, para diversos aspectos da produtividade da planta. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo na produtividade média dos grãos, como também, aumento no comprimento das espigas. O desenvolvimento e rendimento do milho a partir da inoculação de *Azospirillum brasilense*, também foram testados por Swędrzyńska e Sawicka (2000). Os autores observaram que a inoculação do milho com a bactéria contribuiu para um

aumento do vigor e produtividade das plantas nas diferentes condições de cultivo a que foram submetidas.

A disponibilidade de nitrogênio tem sido descrita como possível interferente na ocorrência de micotoxinas em milho. Em um trabalho realizado por Blandino e colaboradores (2008), a influência da fertilização nitrogenada foi mensurada para diferentes micotoxinas que contaminam o milho. Os autores observaram que os níveis de aflatoxina B1 aumentaram significativamente com o estresse de N no solo (BLANDINO et al., 2008).

Da mesma forma, Tubajika et al. (1999) ao analisarem os efeitos da fertilização nitrogenada sobre a contaminação de aflatoxinas no milho observaram que os níveis de contaminação decresceram consideravelmente nos tratamentos que receberam diferentes doses de nitrogênio em comparação aos tratamentos em que a fertilização nitrogenada não foi aplicada.

Desta forma, devido a multiplicidade de fatores e as complexas interações envolvidas na infecção fúngica e ocorrência de aflatoxinas em milho muitos estudos têm buscado analisar os diferentes níveis de contaminação por esse metabólito toxigênico, bem como, sua relação com diferentes espécies fúngicas que contaminam essa cultura em diversos países (RAMOS et al., 2008; PERRONE et al., 2014; PLEADIN et al., 2014).

Em um estudo envolvendo amostras de milho na Índia, Bhat et al. (1997) detectaram a presença de aflatoxinas em 25,8% das amostras, sendo encontrados níveis superiores a 30 µg/kg. Já na Indonésia, um experimento revelou que 69% das amostras analisadas de milho estavam contaminadas com aflatoxinas com níveis médios de 119 µg/kg, sendo estes, considerados níveis preocupantes (ALI et al., 1998).

Níveis de contaminação considerados altos também foram encontrados em um estudo realizado por Pleadin et al. (2014), que buscaram investigar o teor de aflatoxina B1 em amostras de milho provenientes de fazendas e fábricas de ração, em diferentes regiões da Croácia, após a ocorrência de contaminação por AFM1 no leite bovino. Entre todas as regiões analisadas, os valores de AFB1 encontrados variaram de 81 até 2072 µg/kg. Segundo os autores, os altos valores podem ter sido decorrentes de um período extremamente quente e seco que ocorreu durante o crescimento e colheita do milho em 2012, e pode ter favorecido a contaminação por

AFB1 no campo e conseqüentemente, a contaminação do gado que foi alimentado com o milho proveniente de safras contendo altos níveis de aflatoxina.

Em um estudo realizado recentemente foram determinadas a incidência de *Aspergillus* da secção *Flavi* e os níveis de aflatoxinas em amostras de milho de fazendas e mercados da Nigéria e Gana. No total, 67% das amostras estavam contaminadas com *Aspergillus* spp., e em 40% dessas amostras, níveis detectáveis de aflatoxina foram encontrados variando de 5 até 1400 µg/kg, de acordo com as regiões amostradas (PERRONE et al., 2014).

No Brasil, diversos estudos também têm buscado determinar os níveis de aflatoxinas em amostras de milho. Bento et al. (2012), ao analisarem danos causados por fungos em grãos de milho no estado do Mato Grosso, encontram níveis de aflatoxinas variando de 1 µg/kg até 108,7 µg/kg.

Semelhantemente, Ramos et al. (2008) relataram a ocorrência natural de aflatoxinas em três locais do Estado de Goiás (Jataí, Montividiu e Goiânia), a partir de amostras de doze híbridos de milho (DAS766, DAS657, 30K75, 30F44, 30P70, 3F33, AG7000, DKB350, AG1051, Strike, Speed e Fort). Os autores detectaram a presença de *Aspergillus* spp. em todas as amostras provenientes de Jataí, em 41,7% das amostras de Goiânia e em apenas uma amostra de Montividiu. O local onde houve maior contaminação por aflatoxinas foi Jataí, seguido de Goiânia e Montividiu, respectivamente. Em Jataí, esse resultado foi correlacionado com a maior quantidade de chuvas durante a colheita. Os níveis de contaminação variaram entre "não detectada" (nd) e 277,8 µg/kg para AFB1; 34,1 µg /kg para AFB2; 0,7 µg/kg de AFG2. Entre os diferentes híbridos não foram encontradas diferenças significativas com relação à quantidade de aflatoxinas.

Ainda envolvendo estudos realizados no Brasil, Oliveira e colaboradores (2010) verificaram a contaminação por aflatoxinas totais em variedades crioulas de milho do estado do Paraná. Foi possível quantificar a contaminação por aflatoxinas em 70% das amostras analisadas, em níveis que variaram de 1 a 2,6 µg/kg. Destacou-se, no entanto, que nenhuma das amostras analisadas estava acima do preconizado pela legislação brasileira no tocante à contaminação por aflatoxinas totais.

Considerando que o milho é um alimento presente no dia-a-dia dos seres humanos, seja de forma direta ou indireta, e que a presença de aflatoxinas pode afetar negativamente a saúde de seus consumidores, alguns autores ressaltam a

importância da realização de trabalhos que visem a resistência dessa gramínea e também de outras culturas, contra fungos produtores de aflatoxinas (BROWN et al., 1999; PECHANOVA et al., 2011; CHEN et al., 2012).

Em uma revisão feita por Brown et al. (2013) foram apontados alguns trabalhos realizados com cultivares híbridas de milho que obtiveram sucesso na resistência contra a produção da aflatoxina, porém, muitos desses materiais não foram considerados comercialmente aceitos (CAMPBELL e WHITE, 1995; WINDHAM e WILLIAMS, 1998; MENKIR et al., 2008; GUO et al., 2011). Apesar disso, estes genótipos obtidos podem servir como fontes de genes para o desenvolvimento de plantas comercialmente resistentes e aceitáveis, ressaltando assim, a importância de estudos com diferentes genótipos e condições de cultivo.

2.4 Fungos produtores de Aflatoxinas: Secção *Flavi*

Dentre os fungos produtores de aflatoxinas, se destacam os pertencentes à secção *Flavi* do gênero *Aspergillus*. Por possuir o maior número de espécies aflatoxigênicas e, conseqüentemente, englobar as espécies mais preocupantes do ponto de vista da saúde pública, a secção *Flavi* é considerada uma das secções mais relevantes do gênero *Aspergillus*. No entanto, a taxonomia desta secção é complexa e dinâmica, passando por mudanças frequentes ao longo do tempo. Morfologicamente, *Aspergillus* secção *Flavi* inclui espécies com conídios de coloração verde-amarelo e esclerócios com coloração marrom escuro. Os conídios de espécies da secção *Flavi* se caracterizam por serem principalmente globosos podendo ser ásperos ou equinulados (PITT e HOCKING, 2009, VARGA et al., 2011).

Varga e colaboradores em 2011 reorganizaram a secção *Flavi* em sete clados: *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. nomius*, *A. togoensis*, *A. leporis*, *A. avenaceus* e *Petromyces alliaceus*, tendo sido consideradas no total, 21 espécies. Posteriormente à reorganização da secção *Flavi* realizada por Varga et al. (2011) foram descritas cinco novas espécies pertencentes a esta secção. Dentre estas espécies estão *A. sergii* e *A. transmontanensis*, pertencentes ao clado *A. parasiticus*, e *A. mottae* pertencente a um clado irmão aos clados *A. parasiticus* e *A. flavus* (SOARES et al., 2012). Já as espécies *A. novoparasiticus* (GONÇALVES et al., 2012a) e *A. bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012) foram consideradas como um novo clado, totalizando 26 espécies pertencentes à secção *Flavi*.

Mais recentemente, Samson et al. (2014), considerando as novas regras para nomenclatura fúngica, discutidas no Congresso Internacional de Botânica em Melbourne, descreveram em seu estudo as alterações no gênero *Aspergillus*. No trabalho desses autores, algumas espécies ao serem reavaliadas, foram desconsideradas por apresentarem classificações sinônimas com outras espécies, insuficiência de dados moleculares para sua denominação taxonômica, e até mesmo ausência de espécies tipos em bancos de cultura.

Quanto à secção *Flavi*, três espécies, *A. sojae*, *A. toxicarius* e *A. novoparasiticus*, não foram relatadas na atual listagem de espécies consideradas pelos autores, como válidas para o gênero *Aspergillus*. A ausência de *A. toxicarius* descrita por Murakami (1971) ocorreu provavelmente, por esta espécie ter sido considerada sinônima de *A. parasiticus*. Já a ausência de *A. sojae* descrita por Sakaguchi e Yamada (1944) pode ter sido decorrente do fato de que esta espécie já foi considerada como uma variedade domesticada de *A. parasiticus*. Em relação à espécie *A. novoparasiticus* descrita por Gonçalves et al. (2012a), apesar de esta ter sido relatada como produtora de AFB e AFG, possivelmente sua ausência tenha sido devido a falta de informações conforme os critérios científicos da nova nomenclatura (*Names in Current Use – NCU*) que exige informações polifásicas, incluindo a disponibilização do número de acesso no Genbank para sequências de ITS, β -tubulina e calmodulina.

Considerando as recentes alterações, 23 espécies são contempladas na secção *Flavi*. Dessas, 12 já foram classificadas como potenciais produtoras de aflatoxinas, sendo elas: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis*, *A. parvisclerotigenus*, *A. arachidicola*, *A. pseudocaelatus*, *A. pseudonomius*, *A. sergii*, *A. transmontanensis* e *A. mottae* (VARGA et al., 2011; SOARES et al., 2012; MASSI et al., 2014).

Dentre as espécies aflatoxigênicas da secção *Flavi*, todas são consideradas potencialmente produtoras das aflatoxinas do tipo B. No entanto, algumas espécies não são capazes de produzir aflatoxinas do tipo G. *Aspergillus pseudotamarii*, é uma espécie produtora apenas de AFB₁ e AFB₂ e *A. togoensis*, por sua vez, pode produzir apenas AFB₁ (ITO et al., 2001; RANK et al., 2011). Dentre os isolados de *A. flavus*, podem ser encontradas cepas atoxigênicas, ou seja, incapazes de produzir aflatoxinas, como também linhagens produtoras, principalmente das aflatoxinas AFB₁ e AFB₂ (TANIWAK et al., 1993; ATEHNKENG et al., 2008).

Em decorrência do desenvolvimento de uma série de estudos genéticos sabe-se atualmente que as espécies produtoras de aflatoxinas possuem em seu genoma um conjunto de genes co-regulados e alinhados em tandem (*cluster* gênico) que determina a biossíntese de aflatoxinas. A incapacidade de alguns isolados de *A. flavus* em produzir aflatoxinas pode estar entre outros fatores, relacionada a deleções ou a mutações em genes essenciais da via biossintética (GEISEN, 1996; DONNER et al., 2010).

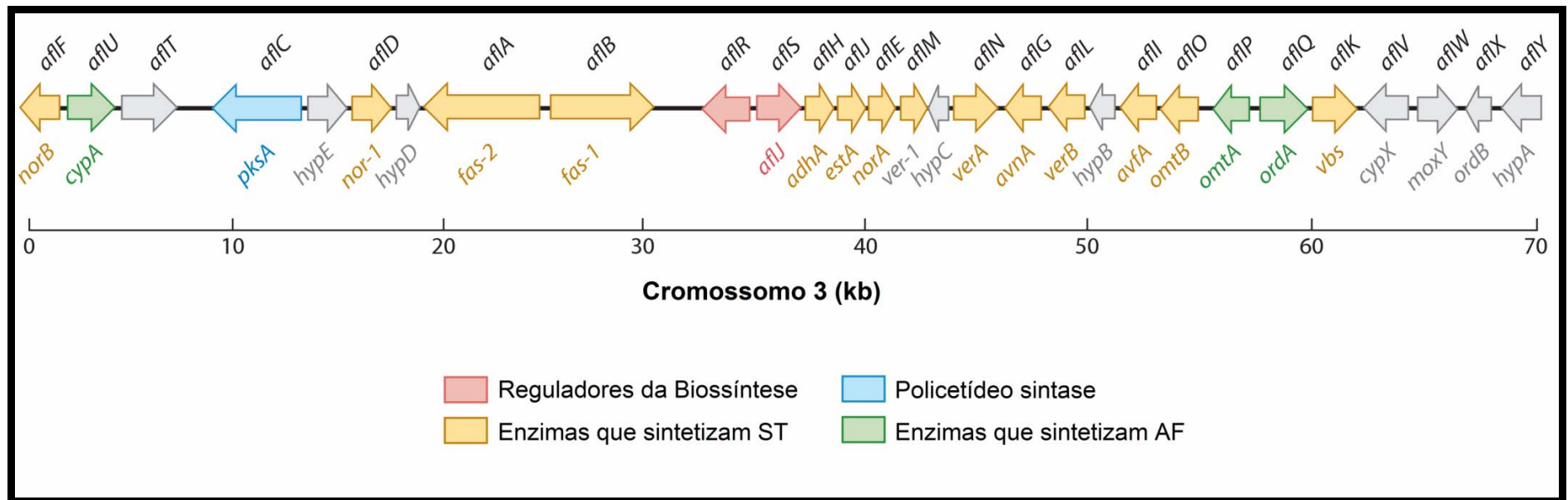
2.5 *Cluster* gênico da biossíntese de aflatoxinas

Na maioria dos fungos produtores de micotoxinas, os genes responsáveis pela biossíntese desses metabólitos tóxicos estão organizados em *clusters* gênicos. Em *A. flavus* o *cluster* gênico da aflatoxina está localizado no cromossomo três (Figura 2), em uma região subtelomérica de aproximadamente 70 Kb (YU et al., 2002) que contém 29 genes (AMAIKE e KELLER, 2011).

As aflatoxinas pertencem à classe dos policetídeos e são produzidas a partir de precursores de acetil-CoA e malonil-CoA que são catalisados em hexanoil-CoA, resultante da expressão dos genes *fas-1* e *fas-2*. A partir de reações de oxido-redução intermediadas por uma policetídeo sintase (*pksA*) ocorre a formação do ácido norsolorínico (NOR), o primeiro intermediário estável da via biossintética das aflatoxinas. NOR sofre várias conversões enzimáticas até ser formado outro composto intermediário denominado versicolorina B, que é um precursor comum de duas rotas da via, a rota de aflatoxinas do tipo 1 e a rota de aflatoxinas do tipo 2.

A primeira rota, que ocorre a partir da ativação do *afIQ* (*ordA*), consiste na conversão da versicolorina B em versicolorina A, dimetilesterigmatocistina, esterigmatocistina (ST) e O-metil esterigmatocistina (OMST), precursora da aflatoxina B₁ e G₁. Na segunda rota ocorre a conversão do composto versicolorina B em dihidrodimetilesterigmatocistina (DHDMST), dihidroesterigmatocistina (DHST), dihidro-O-metilesterigmatocistina (DHOMST), que dará origem à aflatoxina B₂ e G₂ (YU et al., 2002; CARBONE et al., 2007; ROZE et al., 2013).

Figura 2 – Cluster gênico da aflatoxina, composto de 29 diferentes genes, localizado próximo ao telômero do cromossomo 3. Os nomes mais recentes dos genes estão acima da linha vertical e os nomes antigos abaixo. As setas ao longo da linha vertical indicam o sentido da transcrição dos genes. As setas em cor-de-rosa indicam os genes reguladores da via; a seta azul indica o gene que codifica a policetideosintase (*pksA*) que juntamente com os ácidos-graxos sintetases (*aflA* e *aflB*) formarão o primeiro precursor estável na via, o ácido norsolorínico (NOR); as setas alaranjadas indicam os genes que farão a conversão do NOR em esterigmatocistina (ST); as setas verdes indicam os genes responsáveis pela conversão de ST nos diferentes tipos de aflatoxinas; e as setas cinza correspondem a genes cujas funções ainda não estão esclarecidas.



Fonte: adaptada de AMAIKE e KELLER (2011).

No *cluster* gênico das aflatoxinas, foram descritos elementos reguladores como *afIR* e *afIS* (*afIJ*), que desempenham um papel fundamental na formação desse metabólito. O gene *afIR* codifica uma proteína binuclear de zinco, que atua como regulador transcricional da maioria dos genes estruturais presentes no *cluster* (CHANG et al., 1995; EHRLICH et al., 1999). Já o produto do gene *afIS* (*afIJ*) interage com o regulador transcricional *afIR* acentuando a expressão dos genes estruturais (YU e KELLER, 2005; GEORGIANNA et al., 2010).

Sabe-se que, dentre as espécies potencialmente produtoras de aflatoxinas a capacidade de produção desta micotoxina está relacionada tanto a fatores genéticos, quanto às condições ambientais. As condições favoráveis à produção de micotoxinas envolve fatores como temperatura, pH, fonte de carbono, estresse e atividade de água (a_w), cuja oscilação pode alterar a expressão gênica dos reguladores *afIR* e *afIS* (*afIJ*), e como consequência influenciar a produção de aflatoxinas (SCHMIDT-HEYDT et al., 2009; 2010).

No estudo de Abdel-Hadi et al. (2012) foram observadas variações na produção de AFB₁ por *A. flavus*, associadas a mudanças de temperatura e atividade de água. Os autores observaram que o gene *afIR* apresenta maior variação de expressão em relação ao gene *afIS* (*afIJ*), o qual apresentou pequena oscilação de expressão nas diferentes condições ambientais avaliadas.

Outro fator acerca da potencialidade para produção de aflatoxinas é a integridade do *cluster* gênico. Diversos estudos têm demonstrado que deleções de genes estruturais do *cluster* são responsáveis pelas diferenças entre isolados produtores e não produtores de aflatoxinas (GEISEN, 1996; EHRLICH et al., 2004; DONNER et al., 2010).

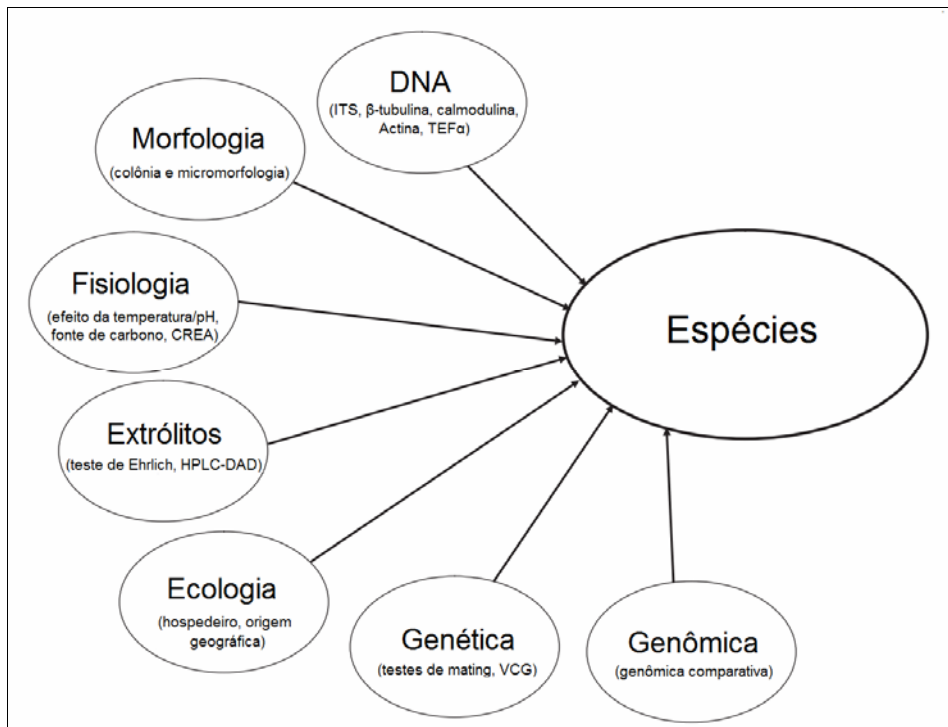
Um dos relatos de maior relevância quanto à importância de deleções de genes do *cluster* é o de Ehrlich et al. (2004). Neste estudo os autores comparam sequências de genes responsáveis pela produção de aflatoxina de *A. flavus* com sequências de *A. parasiticus* e *A. nomius*. Em *A. flavus* foram encontradas deleções compreendendo a região onde estavam localizadas partes dos genes *afIU* (*cypA*) e *afIF* (*norB*), em isolados que produziam somente AFB₁. No entanto, em *A. parasiticus* e *A. nomius*, ambos produtores de AFB₁ e AFG, os autores observaram que a região *afIU* (*cypA*) se manteve íntegra, revelando assim, que sua presença é necessária para a produção de AFG.

2.6 Identificação molecular de *Aspergillus* secção *Flavi*

A identificação taxonômica de fungos foi por muito tempo baseada somente em caracteres morfológicos. No entanto, várias espécies de fungos apresentam morfologia muito semelhante, como é o caso de algumas espécies da secção *Flavi*, o que tornou o método insuficiente para determinadas situações (FRISVAD et al., 2005).

A atual abordagem para a correta identificação de espécies de *Aspergillus* recebeu o nome de taxonomia polifásica (Figura 3), que faz uso de características morfológicas definidas, aliadas ao uso de ferramentas moleculares, como variações em sequências de DNA e uso de características bioquímicas, como a produção de metabólitos secundários (SAMSON e VARGA, 2009). A introdução das ferramentas moleculares aliadas aos caracteres morfológicos e produção de metabólitos, trouxe grande contribuição na identificação taxonômica das espécies, possibilitando distinguir espécies muito semelhantes e até mesmo identificar espécies indistinguíveis morfológicamente.

Figura 3 – Esquema mostrando os vários conjuntos de dados que podem ser combinados para uma identificação taxonômica polifásica em *Aspergillus*.



Fonte: adaptada de Samson e Varga (2009).

No atual contexto de identificação taxonômica de espécies do gênero *Aspergillus*, diversos autores vêm utilizando a amplificação e sequenciamento de determinadas regiões de DNA. As regiões de DNA mais comumente utilizadas são os Espaços Internos Transcritos (ITS – *Internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal, e regiões parciais dos genes que codificam para β -tubulina e calmodulina (PILDAIN et al., 2008; VARGA et al., 2011; DAVOLOS et al., 2012; MASSI et al., 2014).

Na reorganização da secção *Flavi*, descrita por Varga et al. (2011), as espécies citadas foram identificadas com auxílio de análise de sequências de nucleotídeos das regiões ITS, β -tubulina e calmodulina. Neste mesmo trabalho, fazendo uso das regiões nucleotídicas citadas, associadas às características morfológicas e bioquímicas, foram descritas duas novas espécies, *A. pseudocaelatus* e *A. pseudonomius*.

Assim como Varga et al. (2011), muitos estudos fizeram uso da análise de sequências de DNA, para identificação ou descrição de novas espécies da secção *Flavi*, como Rodriguez et al. (2011), Gonçalves et al. (2012a), Soares et al. (2012), Taniwaki et al. (2012).

Dentro da abordagem de amplificação de sequências específicas para identificação de espécies, no caso da secção *Flavi*, cujos genes responsáveis pela via biossintética da aflatoxina são conhecidos, têm-se utilizado esta informação para distinguir entre isolados produtores e não produtores de aflatoxina.

No estudo de Nakamura et al. (2011) foi utilizado *primers* específicos para amplificação de regiões do *cluster* gênico da aflatoxina passíveis de diferenciar espécies produtoras e não produtoras desta micotoxina na secção *Flavi*. As regiões gênicas utilizadas foram: *afIR*, *afIT*, *afIE* (*norA*) e *afIK* (*vbs*).

Já o grupo de Fiori et al. (2010), com o intuito de identificar as espécies aflatoxigênicas *A. flavus* e *A. parasiticus*, fez uso de *primers* específicos para a amplificação das regiões correspondentes aos genes *afIP* (*omtA*), *afIM* (*ver 1*) e *AfIR*, diretamente no substrato, neste caso o milho. Ao utilizar DNA genômico obtido de grãos de milho infectados com *A. flavus* e *A. parasiticus*, os autores obtiveram sucesso quanto à identificação das espécies.

Outra ferramenta molecular bastante útil no auxílio de identificação de espécies é obtida por técnicas que permitem conhecer a diversidade de grupos de isolados fúngicos. Os marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic*

DNA) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) têm demonstrado serem adequados a tal finalidade. Ambos fazem uso de *primers* destinados à amplificação de regiões aleatórias do DNA genômico, permitindo a detecção de polimorfismos de DNA, a fim de estabelecer a relação genética entre populações fúngicas. Exemplos podem ser vistos em diversos estudos como o de Montiel et al. (2003), onde os autores fazendo uso do AFLP, com 12 diferentes combinações de *primers*/enzimas obtiveram aproximadamente 500 fragmentos polimórficos numa população de 24 isolados fúngicos pertencentes às espécies *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. sojae* e *A. oryzae*. Os autores foram beneficiados pela técnica de AFLP ao observarem evidente separação entre as espécies *A. oryzae* / *A. flavus* em relação *A. sojae* e *A. parasiticus*, além de encontrarem marcadores passíveis de distinguir *A. sojae* de *A. parasiticus*.

Barros et al. (2007), utilizando AFLP, caracterizaram 82 isolados da secção *Flavi* provenientes de amendoim. Com três combinações distintas de *primers*/enzimas foi possível distinguir isolados de *A. flavus* de *A. parasiticus*.

Já o estudo realizado por Gonçalves et al. (2012b) fez uso da técnica de RAPD para analisar a variabilidade genética de fungos da secção *Flavi* isolados de castanha-do-brasil. Os autores observaram alta diversidade genética entre alguns isolados, que juntamente com a análise de sequências nucleotídicas do gene β -tubulina e calmodulina, citados anteriormente, resultou num indicativo de possibilidade de uma nova espécie desta secção. O indicativo veio a culminar em um segundo estudo, com a descrição de que aqueles isolados pertenciam a uma nova espécie, descrita como *A. bertholletius* (TANIWAKI et al., 2012).

Recentemente, Massi e colaboradores (2014) fizeram uso de marcadores RAPD e AFLP para analisar a variabilidade genética de 40 isolados obtidos de castanha do Brasil, previamente identificados como *Aspergillus nomius*, conforme caracteres morfológicos. Os autores observaram alta variabilidade genética entre grupos definidos de isolados, posteriormente identificados como duas espécies distintas a partir do sequenciamento de regiões gênicas de β -tubulina e calmodulina, a saber, *A. pseudonomius* e *A. nomius*.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo identificar através de métodos moleculares espécies do gênero *Aspergillus* infectando grãos de milho produzidos em diferentes condições de fertilização nitrogenada. Além disso, objetivou-se analisar a presença de aflatoxinas nos grãos recém-colhidos dos diferentes tratamentos e possíveis correlações entre: a) condições de fertilização e incidência de *Aspergillus* spp.; b) condições de fertilização e concentração de aflatoxinas; c) relação entre as espécies identificadas como sendo da secção *Flavi* e presença de aflatoxinas B e G nos diferentes tratamentos analisados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico e Condições de Cultivo

4.1.1. Inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)

Foram utilizadas duas estirpes bacterianas como componentes dos inoculantes utilizados, uma estirpe de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5), registrada no Ministério da Agricultura para inoculantes comerciais de milho, trigo e arroz (HUNGRIA et al., 2010), e uma estirpe de *Methylobacterium komagatae* (ZM), isolada de girassol, ainda sem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculantes comerciais (GOES et al., 2012).

Os inoculantes foram multiplicados em 250 mL de meio M15 líquido (composição do meio de cultivo em processo de patente), composto por concentrações definidas de glicerol, açúcar cristal, extrato de levedura, monodrogenofosfato de potássio e solução de micronutrientes (MARCELINO, 2012), por 48h, 160 rpm a 28°C. Após este período, os cultivos foram interrompidos e a concentração de células foi normalizada a $2,5 \times 10^9$ células/mL. As células foram utilizadas para preparo dos inoculantes líquidos (composição em processo de patente) pela mistura de concentrações definidas de polivinilpirrolidona – (PVP), glicerol, extrato de levedura, goma xantana, Fe, EDTA, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, nitrato de amônio, solução de micronutrientes, diidrogenofosfato de potássio e monodrogenofosfato de potássio, conforme Marcelino (2012). A concentração final de células nas formulações inoculantes foi de 10^6 células/mL, utilizada em volume adequado para a embebição dos substratos “germitest”. Um volume de 20 mL dos inoculantes foi misturado com 1 kg de sementes de milho 12 horas antes do plantio.

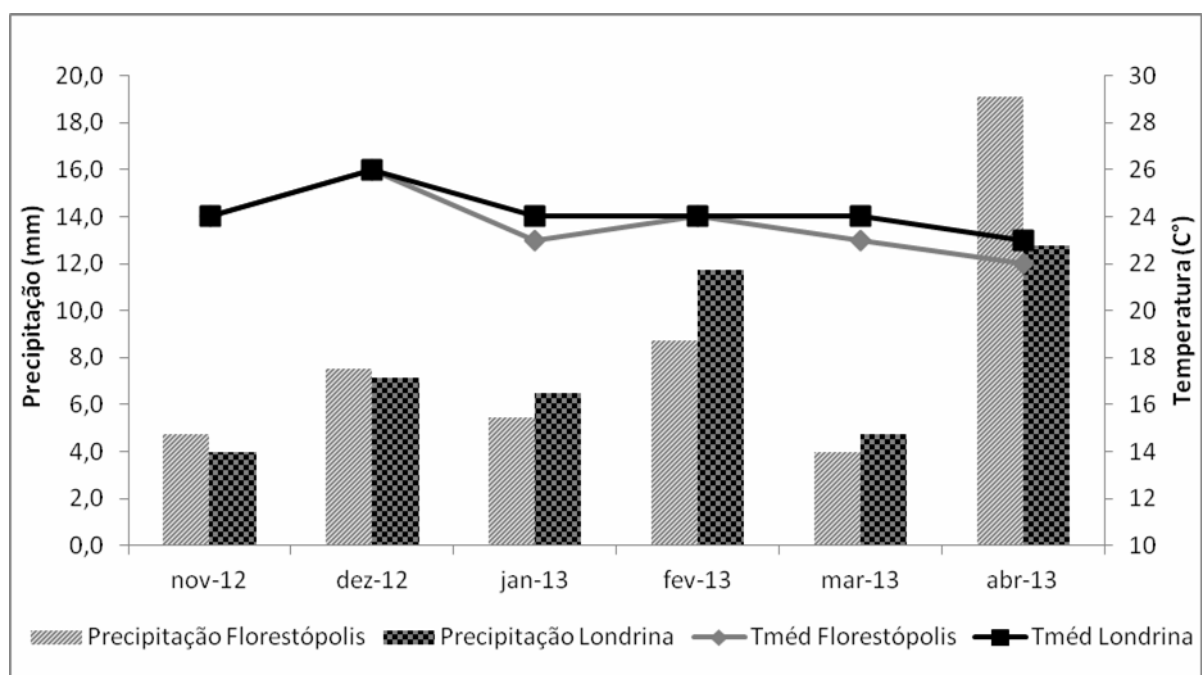
4.1.2. Genótipos de Milho

O delineamento experimental foi do tipo multifatorial 4x4, onde testou-se quatro genótipos de milho em quatro diferentes formas de manejo. Os genótipos avaliados foram: híbrido comercial transgênico P30F53HX (Pioneer); duas variedades sintetizadas pelo Programa de Melhoramento da UEL (ST0509 e

ST1309) e uma variedade crioula denominada “Caiano”. Quanto às condições de manejo foram avaliadas: adubação de plantio e de cobertura, como também, o uso de inoculantes bacterianos, sendo uma estirpe de *Azospirillum brasilense* e outra de *Methylobacterium komagatae*. Para a adubação de plantio foi usada a formulação 4-14-8 (14 kg de Nitrogênio + 49 kg de Fósforo + 28 kg de Potássio), 350 kg/ha, e para a adubação de cobertura utilizou-se 100 kg/ha de nitrogênio.

Já as combinações de genótipos e manejo foram: adubação completa (plantio + cobertura, sem inoculantes); adubação de plantio (sem adubação de cobertura, sem inoculação); inoculante Ab-V5 (somente adubação de plantio + inoculante); inoculante ZM (somente adubação de plantio + inoculante). O experimento foi realizado em duas localidades do Estado do Paraná: Londrina (Lat. 23° 18' 36" S Long. 51° 09' 46" O) e Florestópolis (Lat. 22° 51' 48" S Long. 51° 23' 14" O), com plantio do milho realizado em novembro de 2012. Os registros climatológicos para as duas áreas de plantio se apresentam na Figura 4. Em Londrina, a cultura anteriormente cultivada no local de plantio foi o trigo, em Florestópolis o plantio anterior foi realizado com a cultura do milho.

Figura 4. Gráfico climatográfico referente às temperaturas médias e índices de pluviosidade registrados para Londrina e Florestópolis, no período de 02 de novembro 2012 (plantio) a 06 de abril de 2013 (colheita). Dados concedidos pelo Instituto Agrônômico do Paraná (2014).



O delineamento 4x4 foi disposto em blocos completamente casualizados, empregando parcelas de 6 fileiras de 4 m de comprimento, no espaçamento de 0,90m entre fileiras e 0,20 m entre plantas na fileira. Foram semeadas duas sementes por cova, sendo realizado o desbaste das plantas excedentes, com a finalidade de serem obtidas 20 plantas por fileira. Apenas as quatro fileiras centrais foram utilizadas para a coleta de dados.

A coleta das espigas foi realizada manualmente, seguido da debulha das mesmas com auxílio de debulhador industrial e uma parcela de aproximadamente 800 g de cada tratamento foi separada em sacos de papel previamente identificados. Posteriormente, foram feitas mensurações de umidade relativa e atividade de água.

4.2 Identificação morfológica de fungos

Um total de 3840 grãos de milho (30 grãos por tratamento, 16 tratamentos, 4 repetições, 2 locais), foi submetido à lavagem com hipoclorito de sódio 0,4% por 2 minutos. Um total de 10 grãos/placa foram plaqueados em meio de cultivo DG18 e incubados por 7 dias a 25°C (HOCKING e PITT, 1980).

Decorrido o período de incubação, foi feita a contagem dos grãos de milho contaminados, seguida da análise morfológica dos fungos por observação microscópica de lâminas confeccionadas com o material fúngico imerso em uma mistura de 10 µL de álcool 70% e 10 µL de ácido láctico (Anidrol).

A identificação dos materiais até gênero e seção foi feita conforme o manual de Pitt e Hocking (2009). Desta forma, os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus* foram transferidos para meio de cultivo CYA (K₂HPO₄ 1g/L, Czapek concentrado 10 ml/L, ágar 15g/L, extrato de levedura 5g/L, sacarose 30g/L e q.s.p 1L de água destilada). Posteriormente à identificação, as colônias foram esgotadas em meio CYA a fim de obter colônias monospóricas.

4.3 Análise estatística: ANAVA e Tukey

A partir dos dados obtidos referentes ao: número de grãos infectados, número total de colônias fúngicas, número de colônias de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., atividade de água nos grãos de milho e número de espigas danificadas, foi realizada a análise de variância (ANAVA), para ambos os locais

amostrados, Londrina e Florestópolis. Para comparação entre as médias obtidas das duas localidades, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de significância.

4.4 Extração de DNA genômico

Os fungos morfologicamente identificados como do gênero *Aspergillus* foram inoculados em meio completo líquido de Pontecorvo et al. (1953) [6,0 g de NaNO_3 ; 1,5 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de KCl ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de FeSO_4 ; 0,01 g de ZnSO_4 ; 10,0 g de glicose; 2,0 g de peptona bacteriológica; 1,5 g de caseína hidrolisada; 0,5 g de extrato de levedura; 1,0 mL de solução de vitaminas (10,0 mg de $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$; 1,0 mg de $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$; 5,0 mg de $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}$; 20,0 μg de $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; 5,0 mg de $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$; 10,0 mg de $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$; q.s.p. 10 mL de água destilada); pH 6,8, q.s.p 1L], e incubados por 4 dias a 25°C. Em seguida, cerca de 200 mg de micélio foram macerados com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Ao macerado foi imediatamente adicionado 800 μL de tampão de extração (4 mL de Tris-HCl 1M, pH 8,0; 1 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0; 1 mL de NaCl 5M; 2 mL de SDS 10% p/v e q.s.p 20 mL de água destilada). Os microtubos contendo o pó micelial imerso no tampão de extração foram incubados em banho-Maria a 65°C durante 20 minutos. Após este período, foram adicionados aos microtubos, 800 μL de fenol (Invitrogen®), seguido de homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. À fase aquosa obtida foram adicionados 800 μL da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, respectivamente e novamente centrifugando a 12000 rpm por 15min. Procedeu-se à nova transferência da fase aquosa, seguido da adição de 800 μL de clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção 24:1, respectivamente, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 15min.

À fase aquosa foi acrescentado 1/10 do volume de NaCl 3M e 2 volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizado e incubado a -20°C por 1 h a fim de precipitar os ácidos nucleicos. Logo após, o material foi centrifugado por 5 min. a 12000 rpm e o *pellet* lavado com 300 μL de etanol 70%. O *pellet* completamente seco foi ressuscitado em tampão TE (1 mL de Tris-HCl 1M pH 8,0; 200 μL de EDTA 0,5M pH 8,0 e q.s.p. 100 mL de água destilada) e mantidos a -20°C até o momento do uso. A integridade dos ácidos nucleicos foi visualizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

4.5 Tratamento dos ácidos nucleicos com RNase A e quantificação do DNA genômico

Aos ácidos nucleicos obtidos na etapa anterior, foram adicionados 70 µL de água ultra pura e 1 µL de RNase A (20 mg/mL), seguido por incubação a 37°C por 30 minutos. A inativação da enzima foi obtida com incubação a 65 °C por 5 minutos. Logo após a digestão, o DNA resultante foi precipitado com a adição de 1/10 volume de NaCl 3M e 2,5 volumes de álcool absoluto e mantido a -20°C por 30 minutos, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 100 µL de álcool 70% seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos. O *pellet* seco foi ressuspendido em 50 µL de TE e armazenado a -20 °C.

Os DNAs livres de RNAs foram quantificados com auxílio de espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) (DESJARDINS e CONKLIN, 2010), observando as faixas de valores de razões entre 1,8 e 2,2 obtida entre as absorbâncias $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

4.6 Análise da variabilidade genética de *Aspergillus* secção *Flavi* através de AFLP

A análise da variabilidade genética dos 86 isolados identificados como *Aspergillus* secção *Flavi*, foi realizada por meio da técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) a partir do protocolo de Vos et al. (1995), com modificações. Nesta etapa foi feito uso da combinação de *primers*: adaptador da enzima *EcoRI* + AGC / adaptador da enzima *MseI* + CA, e adaptador da enzima *EcoRI* + AGC / adaptador da enzima *MseI* + CAT.

Inicialmente foi realizada uma dupla digestão, com volume final de 20 µL, contendo 500 ng de DNA genômico, 2,0 µL do tampão da enzima 10x (NEBiolabs®), 0,2 µL de BSA (1,0 mg/mL) (NEBiolabs®), 0,5 µL da enzima *MseI* a 10 U/µL (NEBiolabs®), 0,25 µL da enzima *EcoRI* a 20 U/µL (NEBiolabs®) e q.s.p. de água ultra pura. Os microtubos foram incubados por 12 horas a 37°C e, em seguida, submetidos à inativação das enzimas por 20 minutos a 65°C.

Na etapa seguinte os adaptadores foram ligados a partir de reações com volume final de 20 µL, acrescentando-se, 2,0 µL do tampão ligase10x (NEBiolabs®), 1 µL de adaptador *EcoRI* a 5 µM, 1 µL de adaptador *MseI* a 50 µM, 0,17 µL da

enzima T4 DNA Ligase a 400 U/ μ L (NEBiolabs®) e água ultra pura q.s.p. As amostras foram submetidas ao termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), a 37°C por 3 horas, 17°C por 30 minutos e por fim, 70°C por 10 minutos para inativação das enzimas. O próximo procedimento referente à pré-amplificação dos fragmentos, foi realizado com combinações de *primers* complementares às extremidades dos adaptadores *EcoRI* e *MseI*. As reações foram conduzidas com o produto da etapa anterior (ligação) diluído 2x.

As reações foram feitas com volume final 10 μ L, contendo 3,5 μ L de *GoTaq® Green Master Mix 2X* (Promega®), 0,58 μ L de uma solução contendo ambos os *primers* para a pré-amplificação a 4,8 μ M, água ultra pura q.s.p. e 3 μ L do DNA digerido, ligado ao adaptador e diluído 2x. A reação de pré – amplificação foi submetida ao termociclador PTC-100 (MJ Research), previamente programado para um ciclo inicial de desnaturação a 72°C por 2 minutos, 20 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 segundo, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, decrescendo 1°C a cada ciclo, com um ciclo final de extensão a 60°C por 30 minutos. O produto da pré-amplificação foi visualizado em eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a última etapa, a amplificação seletiva, o produto da pré-amplificação foi inicialmente diluído 8x para posterior preparo das reações. As reações seletivas foram preparadas com volume final de 10 μ L, contendo 3,5 μ L de *GoTaq® Green Master Mix 2X* (Promega®), 0,54 μ L do *primer* seletivo *EcoRI* 1 μ M, 0,54 μ L do *primer* seletivo *MseI* 5 μ M, água ultra pura q.s.p. e 2,5 μ L do DNA pré-amplificado e diluído 8x. As reações foram amplificadas em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), previamente programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 65°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, 8 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 segundo, anelamento decrescendo de 64°C a 57°C decaindo 1°C a cada ciclo de 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, 23 ciclos constituídos de 94°C por 1 segundo, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, com um ciclo final de extensão a 60°C durante 30 minutos. Por fim, os fragmentos amplificados foram visualizados em sequenciador automático ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), onde cada amostra foi diluída 10x diretamente com 8,8 μ L de formamida HiDi 3500 DX Series (Applied Biosystems) seguido da adição de 0,2 μ L de soluções de padrões internos Gene Scan-500 “Rox” (Applied Biosystems). A

análise do comprimento dos fragmentos obtidos contou inicialmente com auxílio do programa ABI Prism Gene Scan Analysis Software (Applied Biosystems), seguido por análise no programa Gene Mapper Software 4.1 (Applied Biosystems), onde foram selecionados fragmentos entre 50-500 pb.

4.7 Análise dos dados de AFLP

Aos fragmentos de AFLP gerados foram atribuídos parâmetros binários de (1) quanto à presença dos fragmentos e (0) quanto à ausência, para cada isolado analisado. Com estes dados foi construída uma matriz de similaridade com auxílio dos programas ABI Prism Geno Typer Software 2.5 (Applied Biosystems) e Gene Mapper 4.1 (Applied Biosystems).

A análise dos agrupamentos foi realizada através do programa computacional NTSYS-PC Versão 2.1 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 2000), a partir da matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Esses dados foram utilizados pelo programa para a construção de um dendrograma pelo o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Mean*). Concomitantemente à construção do dendrograma foi feita a análise de *bootstrap* com 1.000 repetições utilizando o programa WINBOOT (International Rice Research Institute, Manila, Philippines) a fim de determinar limites de confiança nos agrupamentos gerados.

4.8 Amplificação das regiões ITS, β -tubulina e calmodulina

O DNA de 96 isolados identificados morfologicamente como sendo do gênero *Aspergillus* foi submetido à reação de amplificação de parte do gene que codifica para β -tubulina. Posteriormente, foi realizada a amplificação parcial do gene da calmodulina e também dos espaços internos transcritos (ITS) para 7 isolados identificados inicialmente como *A. parasiticus* pela amplificação de β -tubulina. Os *primers* utilizados separadamente foram: ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCCTCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE et al., 1990), que amplificam os espaços internos transcritos 1 e 2; Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'), que amplificam parte do gene que codifica para β -tubulina (GLASS e DONALDSON,

1995) e cmd5 (5' CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3') e cmd6 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') para amplificação parcial do gene da calmodulina (HONG et al., 2006).

As reações foram preparadas com volume final de 25 μ L, sendo compostas por: 2,5 μ L de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl 10x concentrado), 2 μ L de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1 μ L de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA – 10 pmol/ μ L), 1 μ L de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA – 50 mM), 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA – 5 U/ μ L), 2 μ L da amostra de DNA (5 ng/ μ L) e q.s.p 25 μ L de água ultra pura. Reações controle contendo água ultra pura ao invés de DNA genômico foram confeccionadas com todos os *primers* citados. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) programado com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 34 ciclos composto por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C (para os *primers* ITS1 e ITS4) e 60°C (para os *primers* Bt2a/Bt2b e cmd5/cmd6) por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Após o término da reação de amplificação, os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v).

4.9 Purificação dos produtos amplificados: ITS, β -tubulina e calmodulina

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin (PROMEGA, USA), sendo posteriormente utilizados para as reações de sequenciamento. O primeiro passo da purificação consistiu na adição de igual volume da solução Membrane Binding ao produto amplificado. A mistura foi transferida para minicoluna do kit e incubada a 25°C por 1 minuto. Procedeu-se à centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 1 minuto, seguido da adição de 700 μ L da solução Membrane Wash, e posterior centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto, repetindo-se esta etapa com 500 μ L da mesma solução. Posteriormente, o produto purificado foi recuperado com 50 μ L de água livre de nucleasse.

4.10 Sequenciamento dos produtos amplificados e purificados correspondente às regiões ITS, β -tubulina e calmodulina

A etapa de sequenciamento foi realizada utilizando o princípio de Sanger et al. (1977). Para as reações de sequenciamento foram utilizados os mesmos *primers* já descritos para a obtenção dos fragmentos específicos das regiões ITS, β -tubulina e calmodulina.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10 μ L, sendo composta por: 1 μ L de tampão, 1 μ L de *primer forward* ou *reverse* (10 pmol/ μ L), 2 μ L de DNA (20 ng/ μ L), 2 μ L do Kit Big Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e q.s.p. de água ultra pura. Em seguida, a reação foi inserida em termociclador VERITI® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), previamente programado para um ciclo inicial de 95°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto e 30 segundos seguido de extensão final de 60 °C por 1 minuto e 30 segundos.

4.11 Purificação da reação de sequenciamento

Ao produto amplificado no item anterior, foi adicionado acetato de amônio 7,5 M na quantidade correspondente a 1/10 do volume da reação, juntamente com 27,5 μ L de etanol absoluto. A mistura foi mantida a -20°C por 40 minutos e em seguida, centrifugou-se a 4000 rpm, por 45 minutos, a 20°C. Ao *pellet* resultante foi adicionado 130 μ L de etanol 70% seguido de centrifugação a 4000 rpm, por 15 minutos, a 20°C. Subsequentemente, foi acrescentado 0,2 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 80 μ L de isopropanol 80%, mantendo a placa por 10 minutos a 25°C, seguido de centrifugação a 4.000 rpm, 20°C por 40 minutos. Logo após, adicionou-se 80 μ L de álcool 70% ao *pellet* seguido de nova etapa de centrifugação a 4000 rpm, por 15 minutos a 20°C. Após a secagem do *pellet* o material foi ressuspendido em 10 μ L de formamida HiDi 3500 DX Series (Applied Biosystems, USA), e a placa injetada no sequenciador ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.12 Análises das sequências de nucleotídeos obtidas

A qualidade das sequências foi examinada através do programa BioEdit pela análise dos eletroferogramas. Em seguida, as sequências foram submetidas à ferramenta “BLAST Search” do NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) (ALTSCHUL et al., 1990). As sequências processadas foram alinhadas por meio do programa BioEdit com as sequências das espécies tipo disponibilizadas no banco de dados do NCBI. As árvores filogenéticas geradas pelo método Neighbor-Joining (NJ), juntamente com as análises de *bootstrap* com 1.000 repetições, foram conduzidas pelo programa Mega 5.1 (TAMURA et al., 2011) para cada gene separadamente.

4.13 Determinação de Aflatoxinas

A extração de aflatoxinas juntamente com a pré-limpeza do extrato foi realizada utilizando colunas de imunoafinidade (CIA) Aflatest® (Vicom) de acordo com as recomendações do fabricante. A uma alíquota de 20 g de milho, foi adicionada de 2 g de NaCl e 40 mL da mistura metanol: H₂O (80:20). Os componentes foram homogeneizados a 150 rpm por 10 min., sendo, posteriormente, filtrados em papel filtro Whatman n° 1. A 10 mL do filtrado foram adicionados 40 mL de água ultra pura e a solução foi filtrada em microfibra de vidro. Em seguida, 10 mL do filtrado foram submetidos à limpeza em CIA e as aflatoxinas foram eluídas com 1,0 mL de metanol, seguido da secagem a 45°C sob fluxo de N₂. A determinação de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) foi realizada por CLAE segundo Miyamoto, Hamada e Kawamura (2008).

As amostras foram submetidas à derivatização, pela adição de 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA), agitadas por 30 segundos, sonicadas por 5 min. e incubadas por 15 min. a temperatura ambiente, na ausência de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 900 µL de acetonitrila: água (1:9, v/v), seguido de agitação por 15 segundos, sendo uma alíquota de 20 µL injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência. O sistema cromatográfico foi isocrático de fase reversa utilizando como fase móvel acetonitrila:água (25:75, v/v) a um fluxo de 1,2 mL/min., em cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japan) SCL-10AVP equipado com bomba LC-10AT, injetor Rheodyne modelo 7725i, detector de fluorescência RF-10A XL e

coluna Luna C-18 Phenomenex (Scharlau, Barcelona, Spain). A determinação de aflatoxinas foi realizada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 450 nm, respectivamente.

4.14 Rede bipartida

Utilizando o pacote Bipartite 2.0 (Dormann et al., 2008), para o programa R 2.15 (R Core Team, 2013), foi construída uma rede bipartida, a qual indica a proporção entre as diferentes espécies de *Aspergillus* da secção *Flavi* nos diferentes tratamentos analisados em Florestópolis, como também a proporção entre as espécies amostradas e a incidência de aflatoxinas B e G.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados sob a forma de artigo científico “Incidência de *Aspergillus* secção *Flavi* e aflatoxinas em grãos de diferentes genótipos de milho cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada”, a ser enviado para publicação em um periódico científico a ser definido.

5.1 Artigo Científico

Incidência de *Aspergillus* secção *Flavi* e aflatoxinas em grãos de diferentes genótipos de milho cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais suscetíveis à contaminação por micotoxinas, especialmente fumonisinas e aflatoxinas. Neste trabalho foram investigadas a incidência de *Aspergillus* da secção *Flavi* e a contaminação por aflatoxinas em grãos provenientes de quatro diferentes genótipos de milho, cultivadas em dois locais (Florestópolis-PR e Londrina-PR), em quatro condições de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal, fixadoras de nitrogênio. Das amostras de milho provenientes de ambas as localidades analisadas três principais gêneros fúngicos foram identificados: *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Os grãos de milho colhidos em Florestópolis estiveram mais infectados com *Aspergillus* do que os grãos colhidos em Londrina. Cerca de 90% dos *Aspergillus* isolados foram identificados como espécies pertencentes à secção *Flavi*. Dentre as espécies pertencentes à secção *Flavi* detectou-se o predomínio de *A. flavus* (87%), seguido de *A. novoparasiticus* (5%), *A. parasiticus* (4%), *A. pseudocaelatus* (2%), *A. arachidicola* (1%) e de *A. tamaritii* (1%), com exceção da espécie *A. tamaritii*, todas potenciais produtoras de aflatoxinas. As condições de fertilização nitrogenada não interferiram na incidência de *Aspergillus* spp. Os valores médios de aflatoxinas (B1, B2 G1 e G2) nos grãos recém-colhidos variaram entre os diferentes tratamentos, desde não detectado até 1.006 µg/kg, mas não houve correlação entre as diferentes condições de fertilização nitrogenada.

Palavras-chaves: *Aspergillus* secção *Flavi*, aflatoxinas, milho, AFLP, identificação molecular.

INTRODUÇÃO

O Brasil se encontra entre os três principais produtores mundiais de grãos de milho. No ano de 2013 o país produziu cerca de 80 milhões de toneladas, considerando as suas duas safras anuais (verão e safrinha). Dentre os fatores que podem interferir na comercialização e exportação dos grãos de milho está a contaminação por micotoxinas que são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies fúngicas que causam agravos à saúde humana e animal (Bryden 2012). Embora nos últimos anos, a cultura do milho no Brasil tenha sido uma das que mais sofreu desenvolvimentos tecnológicos e a que obteve maiores avanços de produtividade, o controle da contaminação dos grãos por micotoxinas ainda se constitui em um desafio a ser vencido. De fato, a contaminação dos grãos de milho e seus derivados, especialmente rações, por micotoxinas têm sido relatada no mundo todo. No Brasil o clima predominantemente tropical favorece o plantio e a produção agrícola, mas essas mesmas condições, alta umidade e temperatura, também favorecem de forma substancial o desenvolvimento de fungos e a contaminação de grãos por micotoxinas (Salay e Mecadante 2002; Simas et al. 2007; Binder et al. 2007).

Dentre os fungos produtores de micotoxinas no milho, os pertencentes ao gênero *Aspergillus*, em especial à secção *Flavi*, que abarcam as principais espécies produtoras de aflatoxinas (Varga et al. 2011), têm sido considerados como de grande relevância. Vários estudos têm buscado avaliar os níveis de contaminação do milho com aflatoxinas, bem como, sua relação com diferentes espécies do gênero *Aspergillus* secção *Flavi* (Ramos et al. 2008; Perrone et al. 2014a; Pleadin et al. 2014). A taxonomia dessa secção é muito complexa e tem sofrido constantes mudanças. A última revisão sobre essa secção foi feita por Varga e colaboradores (2011), que a subdividiram em sete clados, sendo eles: *A. flavus*, *A. tamarii*, *A. nomius*, *A. togoensis*, *A. leporis*, *A. avenaceus* e *Petromyces alliaceus*; tendo sido consideradas no total, 21 espécies. No entanto, nos últimos três anos cinco novas espécies foram descritas para essa secção: *A. novoparasiticus* (Gonçalves et al. 2012); *A. bertholletius* (Taniwaki et al. 2012); *A. mottae*, *A. sergii* e *A. transmontanensis* (Soares et al. 2012).

A descrição de novas espécies nos mais diversos grupos de *Aspergillus* é, em grande parte, decorrente da incorporação de métodos moleculares que passaram a

permitir melhor discriminação de grupos taxonômicos. Embora os métodos moleculares estejam cada vez mais disponíveis nos laboratórios de pesquisa, são poucos os estudos que têm utilizado a identificação molecular, em associação com dados morfológicos, de *Aspergillus* isolados de grãos de milho cultivados no Brasil (Rocha et al. 2012).

Considerando a importância e a crescente preocupação com a ocorrência de micotoxinas em milho, medidas preventivas que procurem minimizar a infecção por patógenos são de suma importância. O desenvolvimento de cultivares de milho geneticamente modificadas tem minimizado os efeitos causados por insetos praga, aumentando indiretamente, a resistência à infecção fúngica, uma vez que danos aos grãos favorecem o estabelecimento desses patógenos e conseqüentemente a contaminação por aflatoxinas e fumonisinas (Wu 2006; Folcher et al. 2010).

Dentre as práticas agrícolas, a rotação de culturas tem se mostrado eficaz na redução de fungos micotoxigênicos que acometem a cultura do milho (Berzsenyi et al. 2000; Munkvold 2003; Abbas et al. 2004; Jaime-Garcia e Cotty 2010). O regime de fertilização também é uma prática cultural que pode afetar a contaminação dos grãos com micotoxinas. Vários autores demonstraram que a quantidade e a forma com que o nitrogênio é aplicado podem influenciar na incidência e quantidade de micotoxinas (Tubajika et al. 1999; Blandino et al. 2008; Abbas et al. 2009). Atualmente, alguns agricultores brasileiros, seja pelo alto custo do nitrogênio mineral ou pela conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente, têm se interessado pelo uso de inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal, fixadoras de nitrogênio. No entanto, até o presente, nenhum trabalho investigou o efeito do uso destes inoculantes, sob a microbiota e presença de micotoxinas em grãos de milho.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo identificar, por meio de análises morfológicas e moleculares, espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de grãos de milho de quatro genótipos sob diferentes condições de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de inoculantes à base de *Azospirillum brasilense* (AbV5) e *Methylobacterium komagatae* (ZM).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico e Condições de Cultivo

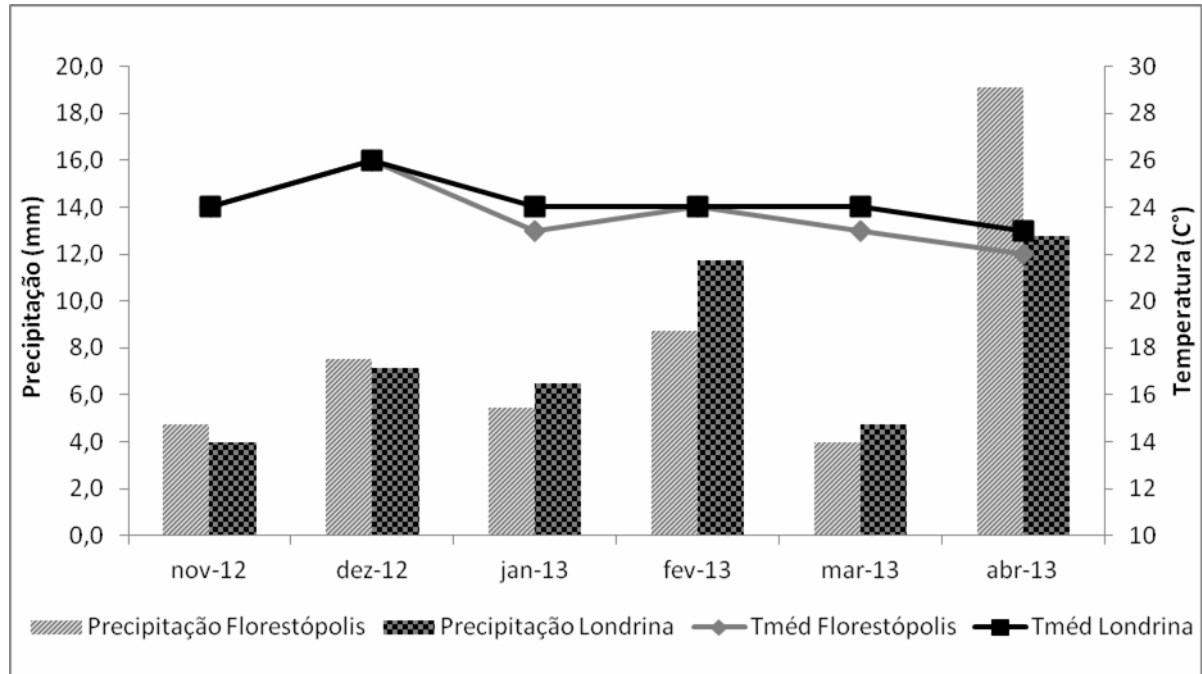
O experimento foi realizado no verão de 2012 em Londrina ("Lat. 23° 18' 36" S Long. 51° 09' 46" O) e Florestópolis (Lat. 22° 51' 48" S Long. 51° 23' 14" O), ambos localizados no estado do Paraná, região de grande importância para a produção de milho no Brasil. Em cada local foi realizado um experimento delineado de maneira multifatorial 4x4. Foram avaliados um híbrido comercial (P30F53HX), duas populações sintéticas (ST0509 e ST1309), e uma variedade crioula (Caiano).

Os genótipos foram avaliados em quatro condições de tratamento nitrogenado: a) adubação completa (adubação de plantio + adubação de cobertura, sem inoculantes); b) apenas adubação de plantio, sem inoculantes; c) adubação de plantio + inoculante comercial Ab-V5 registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que contém bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*; d) adubação de plantio + inoculante ZM que contém uma bactéria promotora do crescimento vegetal (BPCV) isolada de girassol da espécie *Methylobacterium komagatae*. A adubação mineral de plantio foi feita com 350 kg/ha de formulação 4-14-8 NPK (14 kg de nitrogênio + 49 kg de fósforo + 28 kg de potássio).

A adubação mineral de cobertura foi feita com 100 kg/ha de nitrogênio. Em Londrina, a cultura anteriormente cultivada no local de plantio foi o trigo, em Florestópolis o plantio anterior foi realizado com a cultura do milho. Os registros climatológicos para as duas áreas de plantio se apresentam na Figura 1.

Foi utilizado o delineamento em blocos completamente casualizados, empregando parcelas de 6 fileiras de 4 m de comprimento, sendo apenas as quatro fileiras centrais utilizadas para a coleta de dados. As espigas foram coletadas manualmente, debulhadas com a ajuda de um debulhador industrial e cerca de 800g foram separados para posteriores análises, em sacos de papel previamente identificados.

Figura 1. Gráfico climatográfico referente às temperaturas médias e índices de pluviosidade registrados para Londrina e Florestópolis, no período de 02 de novembro 2012 (plantio) a 06 de abril de 2013 (colheita). Dados concedidos pelo Instituto Agrônômico do Paraná (2014).



Inoculação dos grãos com bactérias fixadoras de nitrogênio

As estirpes bacterianas foram cultivadas em 250 mL de meio M15 líquido (composição em processo de patente) por 48h sob agitação em incubadora orbital (160 rpm a 28°C). Após este período, os cultivos foram interrompidos e a concentração de células foi determinada por leitura em câmara de Neubauer. Após a normalização da suspensão de células para $2,5 \times 10^9$ células por mL, foi feito o preparo do veículo inoculante líquido (composição em processo de patente). A concentração final de células nas formulações inoculantes foi de 10^9 células mL⁻¹. Um volume de 20 mL dos inoculantes foi misturado com 1 kg de sementes de milho, 12 horas antes do plantio.

Análise estatística e Rede bipartida

A partir dos dados obtidos referentes ao: número de grãos infectados, total de colônias fúngicas, número de colônias de *Aspergillus* spp., atividade de água nos grãos de milho e número de espigas danificadas, foi realizada a análise de variância ANAVA, para ambos os locais amostrados, Londrina e Florestópolis. Para comparação entre as médias obtidas das duas localidades, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de significância. Utilizando o pacote Bipartite 2.0 (Dormann et al. 2008) para o programa R 2.15 (R Core Team 2013), foi construída uma rede bipartida, que indicou a proporção entre as diferentes espécies de *Aspergillus* da secção *Flavi* nos diferentes tratamentos analisados em Florestópolis, como também a proporção entre as espécies amostradas e a incidência de aflatoxinas B e G.

Incidência de *Aspergillus* em grãos de milho

Os grãos de milho foram submetidos à lavagem com hipoclorito a 0,4% por 2 minutos e plaqueados em meio de cultura DG18 (Hocking e Pitt 1980). Um total de 3840 grãos foi analisado, sendo 120 grãos provenientes de cada um dos 16 tratamentos (30 grãos para cada uma das quatro repetições realizadas), cultivados em dois locais. As placas foram incubadas por 7 dias a 25°C. A análise morfológica foi feita por meio de observações macro e microscópicas. A porcentagem de grãos infectados foi determinada conforme Pitt e Hocking (2009).

Extração de DNA genômico

Conídeos de colônias obtidas por esgotamento foram inoculadas em meio completo líquido (Pontecorvo et al. 1953) e incubadas por 4 dias em estufa com temperatura controlada a 25°C. Após o crescimento do micélio, o material foi macerado com nitrogênio líquido até obtenção de um fino pó, sendo utilizado para a extração dos ácidos nucleicos seguindo o protocolo descrito por Azevedo et al. (2000). O DNA obtido foi, posteriormente, tratado com ribonuclease A (20 mg/mL) e sua quantificação, foi feita em espectrofotômetro NanoDrop® (Desjardins e Conklin 2010).

Sequenciamento parcial dos genes *tubA* e *cmd* e regiões ITS

O DNA dos 96 isolados identificados morfologicamente como sendo do gênero *Aspergillus*, foram submetidos à amplificação de uma porção do gene que codifica para β -tubulina (*tubA*), fazendo uso dos *primers* Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'), descritos por Glass e Donaldson (1995).

Além disso, o DNA de 7 isolados, cuja posição taxonômica não foi resolvida com a análise de sequências do gene *tubA* foi submetido à amplificação e sequenciamento de uma porção do gene que codifica para calmodulina e região ITS1-5,8S-ITS2. Os *primers* cmd5 (5' CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC 3') e cmd6 (5' CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG 3') foram utilizados para amplificação do gene calmodulina (Hong et al. 2006). Para a amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 foram utilizados os *primers* ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White 1990). As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 25 μ L e submetidas ao termociclador VERITI® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), previamente programado para um ciclo inicial de 95 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto e 30 segundos seguido de extensão final de 60 °C por 1 minuto e 30 segundos. Após a amplificação, foi realizada a purificação da reação de sequenciamento com acetato de amônio 7,5 M, etanol absoluto, etanol 70% e isopropanol 80%. Após a secagem do pellet o material foi ressuspendido em 10 μ L de formamida, e em seguida a placa foi submetida ao sequenciador ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). A qualidade das sequências foi examinada através do software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) pela análise dos eletroferogramas. Este software também foi utilizado para a pontuação dos SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) entre os isolados que foram submetidos ao sequenciamento da região ITS. As árvores filogenéticas foram geradas pelo método Neighbor-Joining (NJ), e as análises de *bootstrap* com 1.000 repetições, foram conduzidas pelo programa Mega 5.1 (Tamura et al. 2011) para cada gene separadamente.

Análise da variabilidade genética de *Aspergillus* secção *Flavi* através de AFLP

A análise da variabilidade genética dos isolados identificados como *Aspergillus* secção *Flavi*, foi realizada por meio da técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) utilizando-se a combinação de *primers*: adaptador da enzima EcoRI + AGC / adaptador da enzima MseI + CA e adaptador da enzima EcoRI + AGC / adaptador da enzima MseI + CAT.

Um total 500 ng de DNA foi hidrolisado com enzimas de restrição, submetido à ligação com adaptadores e pré-amplificado de acordo com Vos et al. (1995) com modificações. As amplificações foram realizadas num volume final de 10 µL contendo 3 µL de produto pré-amplificado (diluído 1:8), 0,5 µL de *primer* seletivo de MseI 5 µM e 0,5 µL EcoRI 1µM (marcado com fluoróforo); 3,5 µL *GoTaq Green Master Mix*® (Promega, Madison, USA). A amplificação foi feita no termociclador *GeneAmp PCR System 9700*® (Applied Biosystems, China) sob a programação: ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C; 30 segundos a 65 °C e 2 minutos a 72 °C; 8 ciclos de 1 segundo a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e 2 minutos a 72 °C, decrescendo 1 °C a cada ciclo; 23 ciclos de 1 segundo a 94 °C, 30 segundos a 56 °C e 2 minutos a 72 °C, e por fim, 30 minutos a 60 °C. Após este processo 1 µL de cada amostra foi desnaturado a 95 °C por 3 minutos, imediatamente resfriado em um banho de gelo por alguns minutos e submetidos à eletroforese capilar pelo sistema automatizado 3500 XL® (Applied Biosystems, Austin, USA). Para determinação dos comprimentos dos fragmentos amplificados foi utilizado uma solução padrão *GeneScan-500* “Rox” (Applied Biosystems), sendo selecionados para a análise os fragmentos com comprimentos entre 50-500 pb. O resultado da eletroforese dos fragmentos foram combinados em uma matriz binária pelo software *GeneMapper*® v.4.1 (Applied Biosystems, Austin, USA). Uma matriz de similaridade foi construída utilizando-se do coeficiente de Jaccard. A construção do dendrograma foi feita pelo método UPGMA através do programa computacional NTSYS-PC Versão 2.1 (Rohlf 2000) A análise de *bootstrap* com 1.000 repetições foi realizada utilizando o programa WINBOOT (International Rice Research Institute, Manila, Philippines) para determinar os limites de confiança observado nos agrupamentos gerados no dendrograma.

Determinação dos níveis de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2

A determinação de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) foi realizada por CLAE segundo o método de Miyamoto e colaboradores (2008). As amostras foram submetidas à derivatização, pela adição de 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA), agitadas por 30 segundos, sonicadas por 5 minutos e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 900 µL de acetonitrila:água (1:9, v/v) seguido de agitação por 15 segundos, sendo uma alíquota de 20 µL injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência. O sistema cromatográfico foi isocrático de fase reversa utilizando como fase móvel acetonitrila:água (25:75, v/v) a um fluxo de 1,2 mL min⁻¹, e cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japan) SCL-10AVP equipado com bomba LC-10AT, injetor Rheodyne modelo 7725i, detector de fluorescência RF-10A XL e coluna *Luna C-18 Phenomenex* (Scharlau, Barcelona, Spain). A determinação de aflatoxinas foi realizada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 450 nm, respectivamente.

RESULTADOS

Ocorrência de *Aspergillus* spp. nos locais amostrados

Das amostras de milho provenientes de ambas as localidades analisadas (Florestópolis-PR e Londrina-PR), três principais gêneros fúngicos foram identificados: *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Em ambas as localidades, os isolados do gênero *Aspergillus* foram menos frequentes que os pertencentes ao gênero *Fusarium*. A incidência de fungos do gênero *Aspergillus* foi maior em Florestópolis do que em Londrina. (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de infecção fúngica em ambos os locais de plantio (Londrina-PR e Florestópolis-PR).

Locais	% de Grãos Infectados	% <i>Fusarium</i>	% <i>Penicillium</i>	% <i>Aspergillus</i>	% outros	% Espigas Danificadas
Londrina	77,6	95,4a	0,4a	0,6a	3,6	24,5a
Florestópolis	75,7	74,5b	16,7b	4,7b	4,1	40,0b

* valores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente por meio do teste de Tukey a 5% de significância.

Os grãos provenientes de diferentes tipos de fertilização, incluindo o uso de inoculantes à base de *Azospirillum brasilense* (AbV5) e *Methylobacterium komagatae* (ZM) não diferiram quanto ao percentual de infecção fúngica e número de colônias de *Aspergillus* (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual de grãos infectados, número de colônias de fungos, número de colônias de *Aspergillus* e percentual de espigas danificadas de milho cultivado em Londrina e Florestópolis (PR), analisados de acordo com as diferentes condições de fertilização nitrogenada. Legenda: AC (Adubação completa); AP (Adubação de plantio); IA (Adubação de plantio + Inoculante Ab-V5); IM (Adubação de plantio + Inoculante ZM).

Local	Fertilização/ Inóculo	% de grãos infectados com fungos	Nº de colônias fúngicas em 480 grãos	Nº de colônias de <i>Aspergillus</i> em 480 grãos	% espigas danificadas
Florestópolis	AC	79,2	492	21	44
	AP	74,3	414	21	37
	IA	78,1	480	30	40
	IM	72,1	463	15	39
Londrina	AC	79,8	451	0	28a
	AP	76,0	429	5	23ab
	IA	77,9	444	1	22b
	IM	76,4	410	3	25ab

* valores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente por meio do teste de Tukey a 5% de significância.

Foram obtidos e identificados 96 isolados de *Aspergillus*, das quais 87 foram provenientes de Florestópolis, sendo 84 pertencentes à secção *Flavi*. Apenas nove isolados de *Aspergillus* foram obtidos dos grãos provenientes do milho cultivado em Londrina, e apenas dois foram identificados como membros da secção *Flavi*. Apesar de terem sido encontrados em baixas proporções, isolados da secção *Cremeri* foram identificados nas duas localidades. Em contrapartida, fungos da secção *Nigri* só foram encontrados em Londrina, enquanto um representante da secção *Terrei* foi encontrado em Florestópolis (Tabela 3).

Tabela 3 – Isolados do gênero *Aspergillus* obtidos nas regiões de Florestópolis-PR e Londrina-PR de grãos de milho cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada, identificados por métodos morfológicos e moleculares.

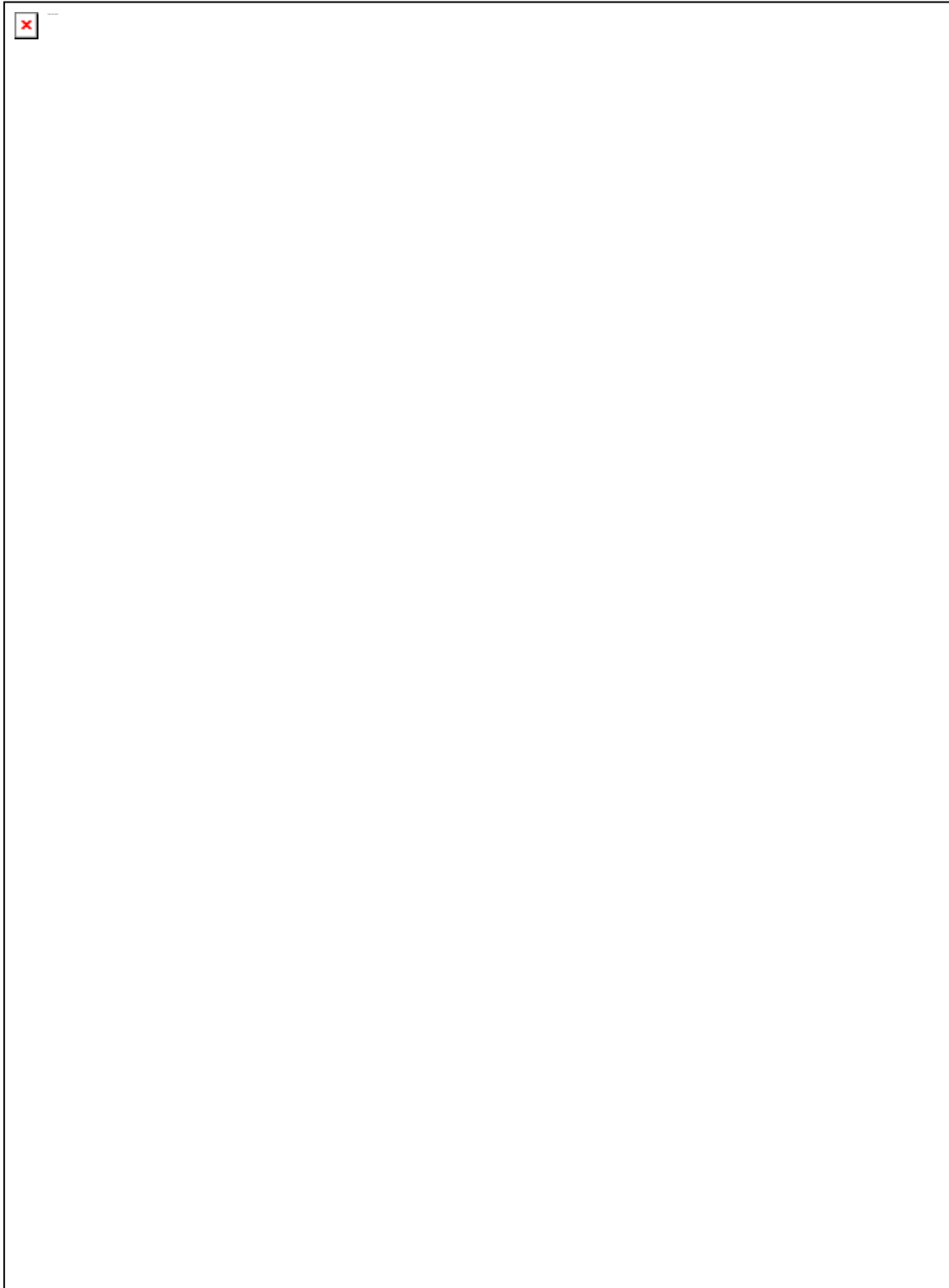
Espécies	Secção	Isolados Florestópolis	Isolados Londrina
<i>A. flavus</i>	<i>Flavi</i>	74	1
<i>A. novoparasiticus</i>	<i>Flavi</i>	4	0
<i>A. parasiticus</i>	<i>Flavi</i>	2	1
<i>A. pseudocaelatus</i>	<i>Flavi</i>	2	0
<i>A. arachidicola</i>	<i>Flavi</i>	1	0
<i>A. tamarii</i>	<i>Flavi</i>	1	0
<i>A. wentii</i>	<i>Cremei</i>	1	1
<i>A. dimorphicus</i>	<i>Cremei</i>	1	4
<i>A. terreus</i>	<i>Terrei</i>	1	0
<i>A. niger</i>	<i>Nigri</i>	0	1
<i>A. luchensis</i>	<i>Nigri</i>	0	1
Total (n=96)		87	9

A partir da técnica de AFLP foram obtidos 341 locos entre os isolados de *Aspergillus* secção *Flavi* (n=86). A análise de agrupamento utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard revelou a formação de seis grupos de AFLP (G I, G II, G III, G IV, G V e GVI), com a maior parte dos isolados fazendo parte do G I (Figura 2).

A identificação taxonômica dos grupos foi realizada a partir da análise de dados de sequência de nucleotídeos de uma porção do gene que codifica para β -tubulina (Figura 3). A comparação das sequências de β -tubulina obtidas com aquelas de linhagens tipos ou de referência das espécies de *Aspergillus* secção *Flavi* mostrou que todos os isolados do grupo I de AFLP pertenciam à espécie *A. flavus*, 86% do total de isolados correspondentes à secção *Flavi*. O grupo III foi composto de um isolado de *A. arachidicola*. O grupo V foi constituído de dois isolados de *A. pseudocaelatus*. O grupo VI foi representado por um isolado de *A. tamarii*. Os grupos II e IV de AFLP foram formados por 4 e 3 isolados, respectivamente, que foram identificados por suas sequências de β -tubulina como pertencentes à espécie *A. parasiticus*.

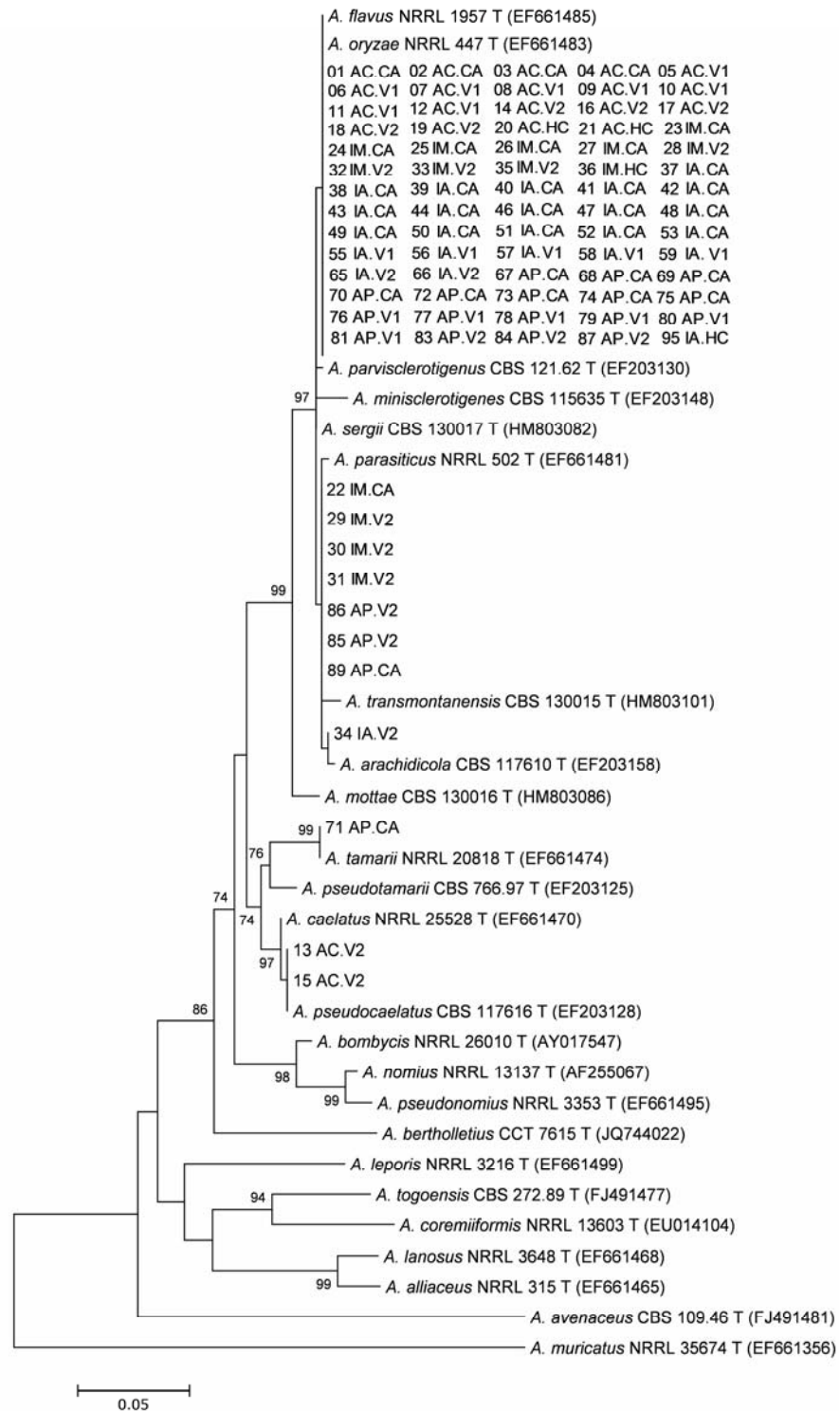
Os sete isolados pertencentes aos grupos de AFLP, G II e G IV, foram adicionalmente sequenciados para a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr e para uma porção do gene da calmodulina. Com base nas sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr foi possível discriminar os isolados em duas espécies: *A. parasiticus* (G IV) e *A. novoparasiticus* (G II), essa última, recentemente descrita por Gonçalves et al. (2012) a qual não possui sequências publicadas para β -tubulina e calmodulina.

Figura 2. Dendrograma gerado pelo o método UPGMA baseado em uma matriz de similaridade obtida com o coeficiente de Jaccard, dos perfis gerados pela técnica de AFLP dos 86 isolados pertencentes à secção *Flavi*. Os valores de *bootstrap* > 70 % foram indicados por valores numéricos.



Legenda: AC (adubação completa); AP (adubação de plantio); IA (adubação de plantio + inoculante Ab-V5); IM (adubação de plantio + inoculante ZM). CA (milho crioulo – Caiano); V1 (variedade ST0509); V2 (variedade ST1309); HC (híbrido comercial – P30F53HX).

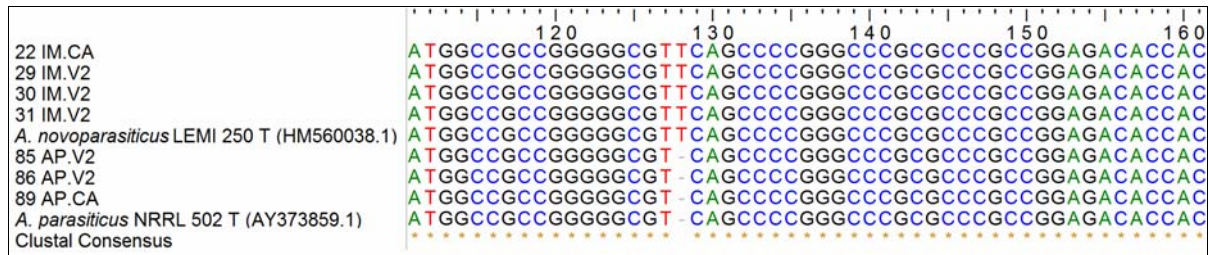
Figura 3. Árvore de Neighbor-Joining (NJ) baseada nas sequências de β -tubulina dos isolados de *Aspergillus* seção *Flavi*. As sequências das linhagens tipo ou referência foram obtidas no GenBank (acesso em 17-10-2014). Os valores de *bootstrap* > 70 % foram indicados por valores numéricos.



Legenda: AC (adubação completa); AP (adubação de plantio); IA (adubação de plantio + inoculante Ab-V5); IM (adubação de plantio + inoculante ZM). CA (milho crioulo – Caiano); V1 (variedade ST0509); V2 (variedade ST1309); HC (híbrido comercial – P30F53HX).

A Figura 4 ilustra uma porção do alinhamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr com um SNP entre os isolados de *A. parasiticus* e *A. novoparasiticus*.

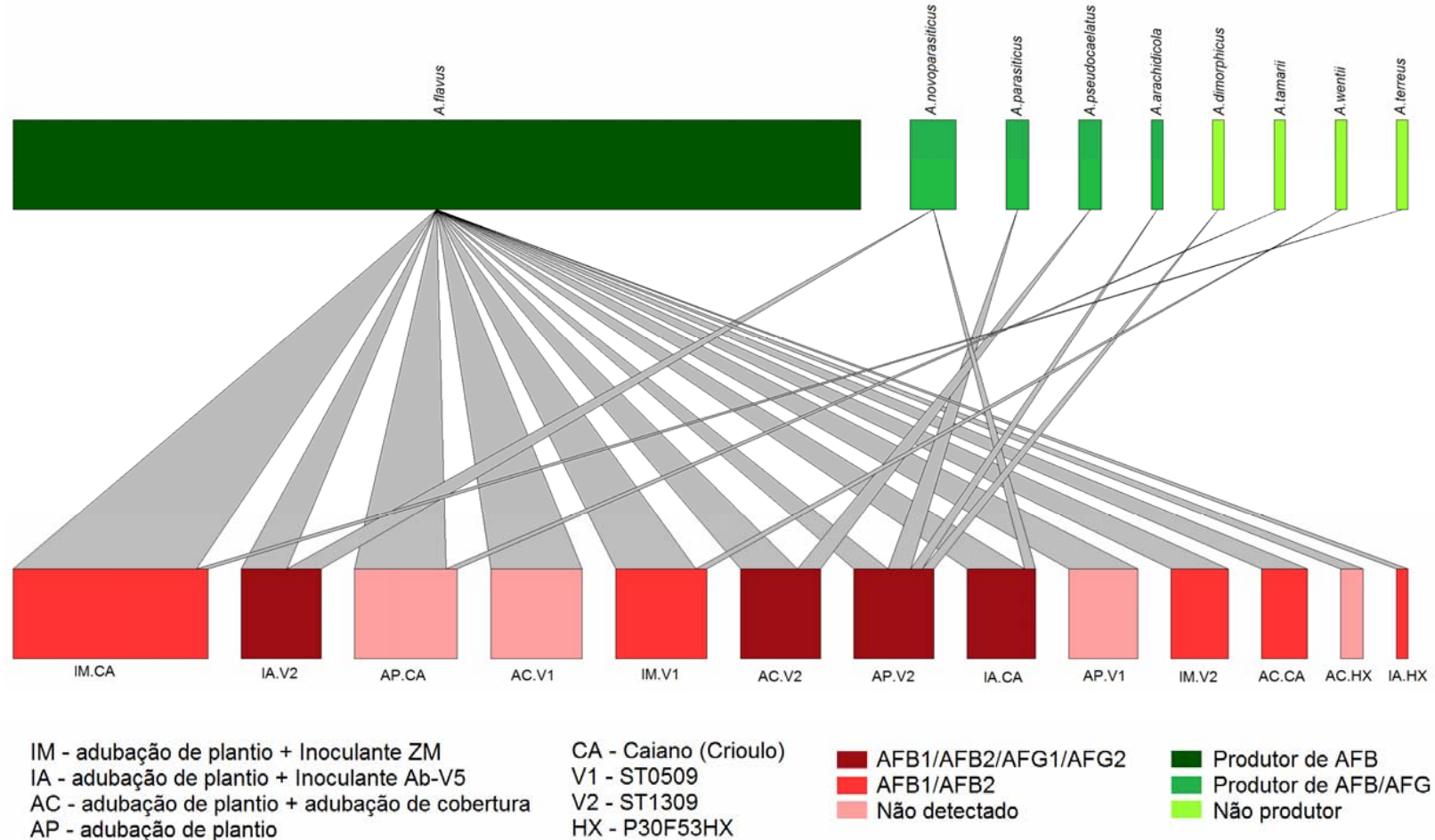
Figura 4 – Representação do alinhamento de *A. novoparasiticus* e *A. parasiticus* utilizando-se o programa BioEdit.



Legenda: AP (adubação de plantio); IM (adubação de plantio + inoculante ZM). CA (milho crioulo – Caiano); V2 (variedade ST1309).

Em relação à contaminação por aflatoxinas, como representado na Figura 5, a presença de *A. flavus* não implicou necessariamente na presença de aflatoxinas, uma vez que esta espécie também pode ser isolada de alguns tratamentos onde não as aflatoxinas não foram detectadas (AP.CA, AC.V1, AP.V1, AC.HX). Porém, para todos os tratamentos em que ambos os tipos de aflatoxinas (B e G) foram detectados, isolados fúngicos de espécies descritas como produtoras de AFB e AFG estiveram presentes. Nas amostras contaminadas com AFB e AFG (IM.V2, AC.V2, AP.V2 e IM.CA) foram identificadas pelo menos uma das espécies produtoras de ambos os tipos de toxinas, tais como *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*, *A. pseudocaelatus* e *A. arachidicola*.

Figura 5. Rede bipartida indicando a proporção entre as diferentes espécies de *Aspergillus* spp. (colunas de cima), nos diferentes tratamentos analisados em Florestópolis (colunas de baixo). O tamanho das barras indica quantitativamente o número de isolados de *Aspergillus* e a largura das linhas indica a quantidade proporcional de cada espécie de *Aspergillus* em cada tratamento. As cores das colunas de cima representam o potencial produtor de cada espécie fúngica isolada, sendo: verde escuro (potencial produtor de AFB), verde intermediário (produtor de AFB+AFG), verde claro (não produtor). As cores nas colunas de baixo representam os tipos de aflatoxinas encontradas nos diferentes tratamentos, sendo que o gradiente de cores representa: vinho (AFB+AFG), rosa intermediário (AFB), rosa claro (não detectado).



Contaminação dos grãos de milho com aflatoxinas

Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) não foram detectadas nas amostras de grãos de milho provenientes de Londrina. Nas amostras provenientes de Florestópolis, os resultados variaram desde não detectado (ND) até aproximadamente 1.000 µg/kg. Na Tabela 4 apresentam-se os valores médios de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 das amostras obtidas em Florestópolis e as espécies potencialmente aflatoxigênicas presentes nas respectivas amostras.

Tabela 4 – Relação entre as potenciais espécies aflatoxigênicas e os níveis de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) encontrados para os tratamentos de Florestópolis-PR.

Tratamentos	Potenciais aflatoxigênicas	AFB ₁ (µg/kg)	AFB ₂ (µg/kg)	AFG ₁ (µg/kg)	AFG ₂ (µg/kg)	Total
IM - V2	<i>A. flavus</i> (04) <i>A. novoparasiticus</i> (03) <i>A. arachidicola</i> (01)	87.509	107.981	563.034	5.602	764.126
AC - V2	<i>A. flavus</i> (05) <i>A. pseudocaelatus</i> (02)	209.833	22.709	385.787	37.127	655.456
AP - V2	<i>A. flavus</i> (03) <i>A. parasiticus</i> (02)	509.364	39.533	197.272	20.596	766.765
IA - V2	<i>A. flavus</i> (05)	863.753	15.975	ND	ND	879.728
IM - CA	<i>A. flavus</i> (05) <i>A. novoparasiticus</i> (01)	97.408	92.495	78.357	66.175	334.435
AC - CA	<i>A. flavus</i> (04)	486.886	7.137	ND	ND	494.023
AP - CA	<i>A. flavus</i> (08)	ND	ND	ND	ND	0
IA - CA	<i>A. flavus</i> (15)	934.568	71.694	ND	ND	1.006.262
IM - HC	<i>A. flavus</i> (01)	412.186	42.688	ND	ND	454.874
AC - HC	<i>A. flavus</i> (02)	ND	ND	ND	ND	0
AP - HC	-	ND	ND	ND	ND	0
IA - HC	-	ND	ND	ND	ND	0
IM - V1	-	ND	ND	ND	ND	0
AC - V1	<i>A. flavus</i> (08)	ND	ND	ND	ND	0
AP - V1	<i>A. flavus</i> (06)	ND	ND	ND	ND	0
IA - V1	<i>A. flavus</i> (08)	134.161	25.549	ND	ND	159.710

Legenda: AC (adubação completa); AP (adubação de plantio); IA (adubação de plantio + inoculante Ab-V5); IM (adubação de plantio + inoculante ZM). CA (milho Caiano); V1 (variedade ST0509); V2 (variedade ST1309); HC (híbrido comercial); ND (não detectável).

DISCUSSÃO

A preponderância de *A. flavus* tem sido documentada em diversos trabalhos que avaliaram a ocorrência de *Aspergillus* secção *Flavi* em grãos de milho (Gao et al. 2007; Rocha et al. 2012; Perrone et al. 2014a). Um fator que pode ter contribuído para o predomínio dessa espécie frente às outras da secção *Flavi*, relaciona-se à grande frequência com que este fungo ocorre no solo. Além disto, a infecção pode ser intensificada por danos mecânicos aos grãos e por intempéries climáticas, como períodos intensos de chuva (Horn e Dorner 1999; Horn 2003; Jaime-Garcia e Cotty 2004; Cotty e Jaime-Garcia 2007).

Em um estudo realizado por Horn e colaboradores (1995), tanto *A. flavus* quanto *A. parasiticus*, que são fungos preocupantes em relação à capacidade produtora de aflatoxinas, foram encontrados em quantidades semelhantes no solo. Contudo, a contaminação das espigas de milho por eles avaliadas ocorreu apenas por *A. flavus*. Deste modo, segundo os autores, *A. flavus* pode ser considerada uma espécie mais agressiva sobre a cultura do milho, enquanto *A. parasiticus* coloniza mais eficientemente detritos orgânicos, apresentando assim, menor dependência sobre a infecção de culturas do que *A. flavus* para manutenção de suas populações no solo.

Tanto *A. flavus* quanto *A. parasiticus* são representantes da secção *Flavi*, a qual tem sido documentada como uma das secções de maior recorrência na contaminação de diferentes substratos, incluindo o milho (Varga et al. 2011; Calderari et al. 2013; Pleadin et al. 2014; Perrone et al. 2014b). No entanto, outra secção que tem se destacado pelo potencial de seus fungos produzirem metabólitos secundários nocivos, tais como as fumonisinas e ocratoxinas, é a secção *Nigri*. Apesar de recentes estudos indicarem a presença de fungos desta secção em culturas de milho (Soares et al., 2013; Logrieco et al. 2014; Susca et al. 2014), no presente estudo tal secção se mostrou pouco frequente, sendo encontrados apenas dois isolados em Londrina e nenhum em Florestópolis (Tabela 3).

Levando em consideração a importância que o solo desempenha na contaminação fúngica, podendo servir como um reservatório de inóculos de espécies toxigênicas (Horn 2003), em comparação à Londrina, a maior contaminação por espécies do gênero *Aspergillus* em Florestópolis, pode estar ligada, entre outros fatores, aos cultivos anteriormente realizados nos locais em que o experimento foi

delineado. Jaime-Garcia e Cotty (2010), ao analisarem os efeitos da rotação de culturas na estrutura populacional de *A. flavus*, observaram que os solos que haviam sido previamente cultivados com milho, possuíam quantidades significativamente maiores de *A. flavus*, em relação aos que haviam sido cultivados com outras culturas como sorgo e algodão.

Desta forma, diante dos resultados obtidos, a falta da rotação de culturas pode ter influenciado no incremento da contaminação por *Aspergillus* em Florestópolis, uma vez, que a cultura anterior ao experimento, também foi o milho. Por outro lado, em Londrina, anteriormente ao milho cultivou-se trigo. Abbas et al. (2004), obtiveram resultados significativos na diminuição das populações de *A. flavus* no solo, a partir da rotação de culturas, sendo os menores índices de contaminação encontrados após o cultivo de algodão e de trigo. Os autores observaram ainda, que o milho exerceu grande influência sobre a população de espécies aflatoxigênicas, sendo a cultura que mais contribuiu com o aumento de inóculos no solo.

A precipitação acentuada ao final do experimento (Figura 1), principalmente, para a região de Florestópolis, associada ao fato de que o número de espigas danificadas foi significativamente maior para este local (Tabela 1), também pode ter agravado a contaminação por espécies do gênero *Aspergillus*. Períodos de chuvas pouco antes ou durante a colheita tendem a aumentar a contaminação fúngica, sendo a contaminação por *Aspergillus*, favorecida por injúrias aos grãos, o que pode contribuir também, para maiores níveis de aflatoxinas (Jaime-Garcia e Cotty 2003; Lewis et al. 2005; Klich 2007).

Sendo assim, práticas que busquem reduzir a presença de fungos e outros patógenos no campo, são de suma importância. Uma dessas práticas está relacionada à utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Já se sabe que as BPCV podem estimular a produtividade das plantas por meio de vários mecanismos. Entre esses mecanismos pode-se destacar a indução de resistência sistêmica a patógenos, bem como o incremento na fixação de nitrogênio, a produção de hormônios, a solubilização de fosfatos e oxidação de enxofre, a produção extracelular de antibióticos e enzimas líticas e o aumento na permeabilidade das raízes.

No entanto, pesquisas sobre o efeito antagônico das BPCV sobre microrganismos produtores de micotoxinas em milho tais como *Fusarium* e

Aspergillus ainda são escassas (Poorniammal et al. 2009; Assumpção et al. 2009; Sundaramoorthy e Balabaska 2013; Abdulkareem et al. 2014).

Alguns autores (Poorniammal et al. 2009; Assumpção et al. 2009) mostraram, através de experimentos *in vitro*, que isolados de *Methylobacterium sp* são capazes de reduzir significativamente o crescimento micelial de espécies de *Fusarium*. Por outro lado, apesar de *Azospirillum* não ser conhecido como um agente de controle biológico típico, algumas linhagens deste gênero têm sido reportadas como capazes de causar a supressão de patógenos do solo (Tortora et al. 2011). No presente estudo, ao contrário do esperado, o uso desses inoculantes bacterianos não diminuiu a incidência de fungos nos grãos de milho (Tabela 2). Segundo a análise de variância, não houve diferença significativa entre os diferentes tipos de fertilização analisados.

Para os diferentes genótipos de milho, a incidência fúngica foi próxima entre a cultivar crioula e as variedades sintéticas. Destacou-se, porém, a baixa contaminação por *Aspergillus* no híbrido transgênico, que apresentou menos de 1% da contaminação total por *Aspergillus*. Quanto ao híbrido transgênico, a tecnologia Bt tem sido apontada como eficiente na diminuição de contaminantes fúngicos e, conseqüentemente, dos níveis de micotoxinas (Wu 2006; Folcher et al. 2010). Dessa forma, a menor infecção para o gênero *Aspergillus*, pode ter ocorrido por conta da resistência do milho transgênico aos danos causados por alguns insetos que atuam como vetores de esporos e provocam lesões que facilitam a contaminação fúngica (Dowd 2001).

Apesar de nas amostras provenientes de Londrina não terem sido detectados níveis significativos de aflatoxina, em Florestópolis os níveis máximos encontrados chegaram até 50 vezes o limite determinado pela legislação brasileira, que para o milho é de no máximo 20 µg/kg (Brasil 2011).

Nos tratamentos em que foram detectados ambos os tipos de aflatoxinas, B e G, foram isolados fungos produtores de AFB e AFG (Figura 5). Com exceção de *A. parasiticus*, dentre as espécies isoladas descritas como produtoras de AFB e AFG, *A. novoparasiticus* (Gonçalves et al. 2012), *A. arachidicola* (Pildain et al. 2008) e *A. pseudocaelatus* (Varga et al. 2011), foram relatadas pela primeira vez como contaminantes do milho.

Desta forma, com o intuito de se avaliar a variabilidade genética dos isolados previamente identificados molecularmente como *Aspergillus* seção *Flavi*, dentre os

perfis gerados, a partir da técnica de AFLP, pode-se observar uma ampla variabilidade genética intraespecífica em *A. flavus*, independentemente dos tratamentos onde foram isolados.

Resultados similares foram encontrados a partir da caracterização de *A. flavus* isolados de amendoins por Reis e colaboradores (2012), que ao utilizarem uma combinação de *primer*/enzima, obtiveram 78 fragmentos, sendo apenas 13% não polimórficos, com a similaridade variando de 37% a 100% entre os isolados avaliados. Rocha e colaboradores (2012) também observaram alta variabilidade intraespecífica entre os isolados de *A. flavus* através da técnica do AFLP.

Assim, a partir do uso da técnica do AFLP, foi possível se obter relações entre a variabilidade intraespecífica e interespecífica de *Aspergillus* secção *Flavi*, indicando a importância de uma abordagem polifásica para a busca de perfis genéticos e a separação entre diferentes espécies pertencentes à essa secção.

REFERÊNCIAS

- Abbas, H., Wilkinson, J., Zablutowicz, R., Accinelli, C., Abel, C., Bruns, H. e Weaver, M. (2009) Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews* **28**, 142-153.
- Abbas, H., Zablutowicz, R. e Locke, M. (2004) Spatial variability of *Aspergillus flavus* soil populations under different crops and corn grain colonization and aflatoxins. *Canadian Journal of Botany* **82**, 1768-1775.
- Abdulkareem, M., Aboud, H.M., Saood, H.M. e Shibly, M.K. (2014) Antagonistic activity of some plant growth rhizobacteria to *Fusarium graminearum*. *International Journal of Phytopathology* **3**, 49-54.
- Assumpção, C. L., Lacava, P.T., Dias, A.C.F., de Azevedo, J.L. e Menten, J.O.M. (2009) Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **44**, 503-510.
- Azevedo, A.C.S., Furlaneto, M.C., Sosa-Gómez, D.R. e Fungaro, M.H.P. (2000) Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates. *Scientia Agricola* **57**, 729-732.
- Berzsenyi, Z., Gyórfy, B. e Lap, D. (2000) Effect of crop rotation and fertilisation on maize and wheat yields and yield stability in a long-term experiment. *European Journal of Agronomy* **13**, 225-244.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J. e Richard, J. (2007) Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* **137**, 265-282.
- Blandino, M., Reyneri, A. e Vanara, F. (2008) Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. *Crop protection* **27**, 222-230.
- BRASIL. (2011) Resolução RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. *Ministério da Saúde. Diário Oficial da União*. Brasília/DF: Secção 1.
- Bryden, W.L. (2012) Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* **173**, 134-58.
- Calderari, T.O., Iamanaka, B.T., Frisvad, J.C., Pitt, J.I., Sartori, D., Pereira, J.L., Fungaro, M.H. e Taniwaki, M.H. (2013) The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. *International Journal of Food Microbiology* **160**, 267-272.
- Cotty, P.J. e Jaime-Garcia, R. (2007) Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 109-115.

Desjardins, P. e Conklin, D. (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, **45**, 1- 4.

Dormann, C.F., Gruber, B. e Fründ, J. (2008) Introducing the bipartite package: analysing ecological networks. *interaction* **1**, 8-11.

Dowd, P.F. (2001) Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. *Journal of Economic Entomology* **94**, 1067-1074.

Folcher, L., Delos, M., Marengue, E., Jarry, M., Weissenberger, A., Eychenne, N. e Regnault-Roger, C. (2010) Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. *Agronomy for Sustainable Development* **30**, 711-719.

Gao, J., Liu, Z. e Yu, J. (2007) Identification of *Aspergillus* section *Flavi* in maize in northeastern China. *Mycopathologia* **164**, 91-95.

Glass, N.L. e Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1323-1330.

Gonçalves, S.S., Stchigel, A.M., Cano, J.F., Godoy-Martinez, P.C., Colombo, A.L. e Guarro, J. (2012) *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. *Medical Mycology* **50**, 152-160.

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids Symposium Series*. pp.95-98.

Hocking, A.D. e Pitt, J.I. (1980) Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl Environ Microbiol* **39**, 488-492.

Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D., Frisvad, J.C. e Samson, R.A. (2006) Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 477-486.

Horn, B.W., Greene, R. e Dorner, J. (1995) Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2472-2475.

Horn, B.W. e Dorner, J.W. (1999) Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied Environmental Microbiology* **65**, 1444-1449.

Horn, B.W. (2003) Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Toxin Reviews* **22**, 351-379.

Jaime-Garcia, R. e Cotty, P.J. (2003) Aflatoxin contamination of commercial cottonseed in south Texas. *Phytopathology* **93**, 1190-1200.

Jaime-Garcia, R. e Cotty, P.J. (2004) *Aspergillus flavus* in soils and corncoobs in south Texas: implications for management of aflatoxins in corn-cotton rotations. *Plant disease* **88**, 1366-1371.

Jaime-Garcia, R. and Cotty, P.J. (2010) Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 1842-1847.

Klich, M.A. (2007) *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol Plant Pathol* **8**, 713-722.

Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A.M. e Misore, A. (2005) Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives* **12**, 1763-1767.

Logrieco, A.F., Haidukowski, M., Susca, A., Mule, G., Munkvold, G.P. e Moretti, A. (2014) *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B(2) contamination in maize. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **31**, 149-155.

Miyamoto, K., Hamada, A. e Kawamura, O. (2008) Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF. 2 monoclonal antibody-HPLC method. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University* **60**, 75-81.

Munkvold, G.P. (2003) Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 99-116.

Perrone, G., Haidukowski, M., Stea, G., Epifani, F., Bandyopadhyay, R., Leslie, J.F. e Logrieco, A. (2014a) Population structure and Aflatoxin production by *Aspergillus* Sect. *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiology* **41**, 52-59.

Perrone, G., Gallo, A. e Logrieco, A.F. (2014b) Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Frontiers in Microbiology* **5**, 377.

Pitt, J.I. e Hocking, A.D. (2009) *Fungi and food spoilage*: Springer. Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 519 p.

Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. e Samson, R.A. (2008) Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 725-735.

Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B. e Cvetnić, Ž. (2014) Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* **40**, 286-291.

Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D. e Bufton, A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* **5**, 141-238.

Poorniammal, R., Sundaram, S. e Kumutha, K. (2009) In Vitro biocontrol activity of *Methylobacterium extorquens* against fungal pathogens. *International Journal of Plant Protection* **2**, 59-62.

R Development Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, URL <http://www.R-project.org/>.

Ramos, C.R., Brasil, E.M. e Geraldine, R.M. (2008) Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)* **38**, 95-102.

Reis, G.M., Rocha, L.d.O., Atayde, D.D., Batatinha, M.M. e Correa, B. (2012) Molecular characterization by amplified fragment length polymorphism and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* isolated from freshly harvested peanut in Brazil. *World Mycotoxin Journal* **5**, 187-194.

Rocha, L. O., Reis, G., Braghini, R., Kobashigawa, E., Araújo, J. e Corrêa, B. (2012) Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* **132**, 353-366.

Rohlf, F. J (2000) Ntsys-Pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. *Exeter Software, Setauket, NY*.

Salay, E. e Mercadante, A. Z. (2002) Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control* **13**, 87-92.

Simas, M., Botura, M.B., Correa, B., Sabino, M., Mallmann, C.A., Bitencourt, T.C. e Batatinha, M.J. (2007) Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Control* **18**, 404-408.

Soares, C., Calado, T. e Venancio, A. (2013) Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Revista Iberoamericana de Micología* **30**, 9-13.

Soares, C., Rodrigues, P., Peterson, S.W., Lima, N. e Venancio, A. (2012) Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. *Mycologia* **104**, 682-697.

Sundaramoorthy, S. e Balabaskar, P. (2013) Evaluation of Combined Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in Managing Tomato Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). *Plant Pathology Journal* **12**, 154-161.

Susca, A., Moretti, A., Stea, G., Villani, A., Haidukowski, M., Logrieco, A. e Munkvold, G. (2014) Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. *International Journal of Food and Microbiology* **188**, 75-82.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. e Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739.
- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Iamanaka, B.T., Sartori, D., Copetti, M.V., Balajee, A., Fungaro, M.H.P. e Frisvad, J.C. (2012) *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. *PloS One* **7**, e42480.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C. e Pedraza, R.O. (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* **193**, 275-286.
- Tubajika, K., Mascagni, H., Damann, K. e Russin, J. (1999) Nitrogen fertilizer influence on aflatoxin contamination of corn in Louisiana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 5257-5260.
- Varga, J., Frisvad, J.C. e Samson, R.A. (2011) Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology* **69**, 57-80.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. e et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- White, T. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR-Protocols: A guide to methods and applications*.
- Wu, F. (2006) Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research* **15**, 277-289.

6 CONCLUSÕES

Os experimentos realizados permitiram concluir que dentre os isolados de *Aspergillus* encontrados em grãos de milho, *Aspergillus flavus* é significativamente mais frequente que outras espécies do gênero. Esta observação confirma dados da literatura coletados em diferentes partes do mundo. Acrescenta-se à literatura, através dos resultados obtidos neste trabalho, que algumas espécies da secção *Flavi* recentemente descritas, *A. novoparasiticus*, *A. pseudocaelatus* e *A. arachidicola*, podem infectar grãos de milho no campo e contribuir para a produção de aflatoxinas B e G. A investigação pioneira sobre o efeito de diferentes tipos de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de inoculantes contendo bactérias promotoras de crescimento vegetal, permitiu concluir que não há interferência na incidência de *Aspergillus* spp. nos grãos dos diferentes genótipos de milho, bem como na contaminação por aflatoxinas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; ZABLOTOWICZ, R.; LOCKE, M. Spatial variability of *Aspergillus flavus* soil populations under different crops and corn grain colonization and aflatoxins. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 12, p. 1768-1775, 2004.
- ABBAS, H. et al. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. **Toxin Reviews**, v. 28, n. 2-3, p. 142-153, 2009.
- ABDEL-HADI, A. et al. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, n. 69, p. 757-67, 2012.
- ABDULKAREEM, M. et al. Antagonistic activity of some plant growth *Rhizobacteria* to *Fusarium Graminearum*. **International Journal of Phytopathology**, v. 3, n. 1, p. 49-54, 2014.
- ABIMILHO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MILHO. Estatísticas. 2014. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 15 dez. 2014.
- ALI, N. et al. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. **Food Additives & Contaminants**, v. 15, n. 4, p. 377-84, 1998.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.
- ALLCROFT, R., R. B. A. CARNAGHAN. Groundnut Toxicity – *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication. **The Veterinary Record**, v.74, n.31, p.863-864, 1962.
- AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 107-33, 2011.
- AMARAL, K. A. S. D. et al. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006.

ANDRADE, A. C. et al. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 1643-1651, 2003.

ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE MILHO CRIOULO. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

ARAUJO, A. E. S. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 932-939, 2010.

ASSIS, J. P. **Modelo estocástico para Estimação da Produtividade Potencial de Milho em Piracicaba-SP**. 2004. 192 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.

ASSUMPÇÃO, C. L. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

ATEHNKENG, J. et al. Evaluation of atoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents for aflatoxin in maize. **Food Additives and Contaminants: Part A**, v. 25, n. 10, p. 1264-1271, 2008.

AZEVEDO, A. C. S. et al. Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 729-732, 2000.

BARROS, G. G. et al. Molecular characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolates collected from peanut fields in Argentina using AFLPs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 900-9, 2007.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BENTO, L. F. et al. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho; Occurrence of fungi and aflatoxins in corn kernels. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.

BERZSENYI, Z.; GYÓRFFY, B.; LAP, D. Effect of crop rotation and fertilisation on maize and wheat yields and yield stability in a long-term experiment. **European Journal of Agronomy**, v. 13, n. 2–3, p. 225-244, 2000.

BHAT, R. V. et al. Aflatoxin B1 contamination in maize samples collected from different geographical regions of India--a multicentre study. **Food Additives & Contaminants**, v. 14, n. 2, p. 151-6, 1997.

BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3–4, p. 265-282, 2007.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, n. 2, p. 222-230, 2008.

BLOUNT, W. P. Turkey “x” Disease. **Turkey**, v. 9, p. 55-58, 1961.

BORÉM, A. A história da Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.34, p.10-12, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF: Secção 1, 2011.

BROWN, R. et al. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 89, n. 2, p. 113-117, 1999.

BROWN, R. L. et al. Breeding aflatoxin-resistant maize lines using recent advances in technologies—a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 8, p. 1382-1391, 2013.

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

BRYDEN, W.L. Mycotoxins and mycotoxicoses: significance, occurrence and mitigation in the food chain. In: BALLANTYNE, B.; MARRS, T.; SYVERSEN, T. (Org.). **General and Applied Toxicology**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2009. p. 3529–3553.

BRYDEN, W.L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v.173, n., p. 134-158, 2012.

BRZEZINSKI, C. R. et al. Nitrogênio e inoculação com *Azospirillum* na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de trigo. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 57, n. 3, p. 257-265, 2014.

CALDERARI, T. O. et al. The biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in brazil nuts: from rainforest to consumer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 267-72, 2013.

CAMPBELL, K.; WHITE, D. Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspergillus* ear rot, kernel infection, and aflatoxin production. **Plant Disease**, v. 79, n. 10, p. 1039-1045, 1995.

CARBONE, I. et al. Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 111, 2007.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V. et al. Avaliação de cultivares de milho crioulo em sistema de baixo nível tecnológico. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, p. 229-233, 2010.

CASTEGNARO, M.; WILD, C. P. IARC activities in mycotoxin research. **Natural Toxins**, v. 3, n. 4, p. 327-31, 1995.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. F.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006, 14p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 83).

CAVALLET, L. et al. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.

CHANG, P. K. et al. Increased expression of *Aspergillus parasiticus* aflR, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 2372-7, 1995.

CHEN, Z.-Y. et al. Identification of resistance-associated proteins in closely-related maize lines varying in aflatoxin accumulation. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 1, p. 53-68, 2012.

COSTA, R. V. et al. **Recomendação de Cultivares de Milho para a Resistência a Grãos Ardidos**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010, 8p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 154).

COTTY, P. J. e JAIME-GARCIA, R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 109-115, 2007.

COULOMBE JR, R. A. Biological Action of Mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 3, p. 880-891, 1993.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

CRUZ, J. C. et al. (Eds.). **Milho : o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 338 p.

CRUZ, J. C. et al. **Produção de milho orgânico na agricultura familiar**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006, 17p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 81).

DAVOLOS, D. et al. *Aspergillus affinis* sp. nov., a novel ochratoxin A-producing *Aspergillus* species (section *Circumdati*) isolated from decomposing leaves. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v.62, p.1007-15, 2012.

DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments**, n. 45, 2010.

DONNER, M. et al. Molecular characterization of atoxigenic strains for biological control of aflatoxins in Nigeria. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 27, n. 5, p. 576-90, 2010.

DORMANN, C. F.; GRUBER, B.; FRÜND, J. Introducing the bipartite package: analysing ecological networks. **Interaction**, v. 1, p. 8-11, 2008.

DOWD, P. F. Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. **Journal of economic entomology**, v. 94, n. 5, p. 1067-1074, 2001.

EHRlich, K. C.; MONTALBANO, B. G.; CARY, J. W. Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. **Gene**, v. 230, n. 2, p. 249-57, 1999.

EHRlich, K. C. et al. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6518-24, 2004.

ELLIS, W. O. et al. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 403-39, 1991.

ETZEL, R. Mycotoxins. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 4, p. 425-427, 2002.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 21-54.

FIORE, A. et al. Polymerase chain reaction-based assay for the early detection of aflatoxigenic fungi on maize kernels. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 2, n. 1, p. 22-27, 2010.

FOLCHER, L. et al. Lower mycotoxin levels in Bt maize grain. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, n. 4, p. 711-719, 2010.

FRANCHINI, J. C. et al. **Importância da rotação de culturas para a produção agrícola sustentável no Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 2011, 52p. (EMBRAPA. Documentos, 327).

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: EMBRAPA- CNPAT, 2007, 48p.(EMBRAPA. Documentos, 110).

FRISVAD, J. C.; SKOUBOE, P.; SAMSON, R. A. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B,

sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 442-453, 2005.

GAO, J.; LIU, Z.; YU, J. Identification of *Aspergillus* section *Flavi* in maize in northeastern China. **Mycopathologia**, v. 164, n. 2, p. 91-5, 2007.

GEISEN, R. Multiplex Polymerase Chain Reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 388-392, 1996.

GEORGIANNA, D. R. et al. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 213-26, 2010.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

GOES, K. C. G. P. et al. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 437-47, 2012.

GONÇALVES, S. S. et al. *Aspergillus novoparasiticus*: a new clinical species of the section *Flavi*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 152-60, 2012a.

GONÇALVES, J. S. et al. Molecular analysis of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1817-25, 2012b.

GUO, B. et al. Registration of maize inbred line GT603. **Journal of Plant Registrations**, v. 5, n. 2, p. 211-214, 2011.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, p.95-98, 1999.

HARTLEY, R.; NESBITT, B. F.; O'KELLY, J. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. **Nature**, v. 198, p. 1056-1058, 1963.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 488-92, 1980.

- HONG, S. B. et al. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 477-86, 2006.
- HORN, B.; GREENE, R.; DORNER, J. Effect of corn and peanut cultivation on soil populations of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in southwestern Georgia. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2472-2475, 1995.
- HORN, B. W. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. **Toxin Reviews**, v. 22, n. 2-3, p. 351-379, 2003.
- HORN, B. W.; DORNER, J. W. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1444-9, 1999.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, n.1-2, p. 413-425, 2010.
- IARC. INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, France, v. 100F, 559 p., 2012.
- ITO, Y. et al. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 2001.
- JAIME-GARCIA, R. e COTTY, P. J. Aflatoxin contamination of commercial cottonseed in south Texas. **Phytopathology**, v. 93, n. 9, p. 1190-1200, 2003.
- JAIME-GARCIA, R. e COTTY, P. J. *Aspergillus flavus* in soils and corncobs in south Texas: implications for management of aflatoxins in corn-cotton rotations. **Plant disease**, v. 88, n. 12, p. 1366-1371, 2004.
- JAIME-GARCIA, R. e COTTY, P. J. Spatial relationships of soil texture and crop rotation to *Aspergillus flavus* community structure in South Texas. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, p. 599-607, 2006.

JAIME-GARCIA, R. e COTTY, P. J. Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1842-1847, 2010.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 6, p. 713-22, 2007.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 283–300, 2003.

KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905, 2008.

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

LEWIS, L. et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. **Environmental Health Perspectives**, p. 1763-1767, 2005.

LOGRIECO, A. F. et al. *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B(2) contamination in maize. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**, v. 31, n. 1, p. 149-55, 2014.

LOPES, M. T. G. et al. Controle genético da resistência à mancha-de-Phaeosphaeria em milho. **Ciência Rural**, v.37, n.3, p.605-611, 2007.

MARCELINO, P. R. F. **Desenvolvimento de meio de cultivo e formulações inoculantes para *Azospirillum brasilense* AbV5**. : 2012. 120 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MASSI, F. P. et al. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 14-21, 2014.

MENKIR, A. et al. Registration of six tropical maize germplasm lines with resistance to aflatoxin contamination. **Journal of Plant Registrations**, v. 2, n. 3, p. 246-250, 2008.

MIYAMOTO, K.; HAMADA, A.; KAWAMURA, O. Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody HPLC method. **Kagawa Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku**, n. 113, p. 75-81, 2008.

MONTIEL, D. et al. Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *Flavi* complex using AFLP fingerprints. **Mycological Research**, v. 107, n. 12, p. 1427-34, 2003.

MUNKVOLD, G. P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 99-116, 2003.

MURAKAMI, H. Classification of the koji mold. **Journal of General and Applied Microbiology Tokyo**, v. 17, n. 4, p. 281-309, 1971.

NAKAMURA, H. et al. Evaluation of the aflatoxin biosynthetic genes for identification of the *Aspergillus* section *Flavi*. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 4, p. 367-9, 2011.

OLIVEIRA, T. R. et al. Avaliação da contaminação por aflatoxinas totais e zearalenona em variedades de milho crioulo (*Zea Mays* L.) através do método imunoenzimático Elisa. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 2, p. 179-185, 2010.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006, 6p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 75).

PECHANOVA, O. et al. Proteomic analysis of the maize rachis: potential roles of constitutive and induced proteins in resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin accumulation. **Proteomics**, v. 11, n. 1, p. 114-127, 2011.

PERRONE, G. et al. Population structure and Aflatoxin production by *Aspergillus* Sect. *Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. **Food Microbiology**, v. 41, p. 52-9, 2014a.

PERRONE, G.; GALLO, A.; LOGRIECO, A. F. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 377, 2014b.

PILDAIN, M. B. et al. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 725-735, 2008.

PINTO JUNIOR, A. S. et al. Qualidade de sementes de milho oriundas da inoculação combinada de três estirpes de *Azospirillum brasilense*. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29, 2012, Águas de Lindóia. Diversidade e inovações na era dos transgênicos. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônomo; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012.

PINTO, N. F. J. A.; OLIVEIRA, E.; FERNANDES, F. T. **Manejo das Principais Doenças do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2007, 15p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 92).

PITT, J.I., HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009, 519 p.

PLEADIN, J. et al. Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. **Food Control**, v. 40, p. 286-291, 2014.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.

POORNIAMMAL, R.; SUNDARAM, S.; KUMUTHA, K. In Vitro biocontrol activity of *Methylobacterium extorquens* against fungal pathogens. **International Journal of Plant Protection**, v. 2, n. 1, p. 59-62, 2009.

PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984-91, 2009.

PRELLE, A. et al. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices commercialized in Italy. **Food Control**, v. 39, p. 192-197, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2013. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RAMOS, C. R.; BRASIL, E. M.; GERALDINE, R. M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 38, n. 2, p. 95-102, 2008.

RANK, C. et al. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. **Fungal Biology**, v. 115, n. 4-5, p. 406-20, 2011.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, v. 37, p. 85-91, 2011.

REIS, G. M. et al. Molecular characterization by Amplified Fragment Length Polymorphism and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* isolated from freshly harvested peanut in Brazil. **World Mycotoxin Journal**, v. 5, n. 2, p. 187-194, 2012.

RIBEIRO, S. A. et al. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.

ROCHA, O. L. et al. Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, n. 3, p. 353-366, 2012.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 877-92, 2011.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. Exeter Software, New York, 2000.

ROZE, L. V.; HONG, S. Y.; LINZ, J. E. Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. **Food Science and Technology**, v. 4, p. 293-311, 2013.

SALAY, E. e MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v. 13, n. 2, p. 87-92, 2002.

SAMSON, R. A. e VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. S13-20, 2009.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>>

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-7, 1977.

SAKAGUCHI, K.; YAMADA, K. On the morphology and classification of *Aspergilli*. **Journal of Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 20, p.141-154, 1944.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 231-7, 2009.

SCHMIDT-HEYDT, M. et al. The production of aflatoxin B1 or G 1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 4, p. 241-6, 2010.

SEDMIKOVA, M. et al. Potential hazard of simultaneous occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A. **Veterinary Medicine**, v. 46, n. 6, p. 169-174, 2001.

SILVA, G.J.; GUIMARÃES, C.T.; PARENTONI, S.N.; RABEL, M.; LANA, U.G.P.; PAIVA, E. **Produção de haplóides androgenéticos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2009, 17p.(EMBRAPA. Circular Técnica, 81).

SIMAS, M. et al. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 404-408, 2007.

SOARES, C. et al. Three new species of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from almonds and maize in Portugal. **Mycologia**, v. 104, n. 3, p. 682-97, 2012.

SOARES, C.; CALADO, T.; VENANCIO, A. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 1, p. 9-13, Jan 3 2013. ISSN 1130-1406.

SUNDARAMOORTHY, S.; BALABASKAR, P. Evaluation of Combined Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in Managing Tomato Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Fol). **Plant Pathology Journal**, v. 12, n. 4, p. 154-161, 2013.

SUSCA, A. et al. Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 75-82, 2014.

SWĘDRZYŃSKA, D.; SAWICKA, A. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of maize (*Zea mays ssp. saccharata* L.) under different cultivation conditions. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 9, p. 505-509, 2000.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 141-58, 1998.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA, I.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *Aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 1, p. 140-150, 1993.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; COPETTI, M. V.; BALAJEE, A.; FUNGARO, M. H. P.; FRISVAD, J. C. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. 1-7, 2012.

TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275-286, 2011.

TUBAJIKA, K. et al. Nitrogen fertilizer influence on aflatoxin contamination of corn in Louisiana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5257-5260, 1999.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 3, p. 263-277, 2009.

VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Studies in Mycology**, v. 69, n. 5, p. 57-80, 2011.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WHITE, T. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR-Protocols: A guide to methods and applications**, 1990.

WINDHAM, G.; WILLIAMS, W. *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin accumulation in resistant and susceptible maize hybrids. **Plant Disease**, v. 82, p. 281-284, 1998.

WICKLOW, D. T. The mycology of stored grain: an ecological perspective. **Stored Grain Ecosystems**, p. 197-249, 1995.

WU, F. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. **Transgenic Research**, v. 15, n. 3, p. 277-89, Jun 2006.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K. C. Aflatoxin biosynthesis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, n. 4, p. 191-200, 2002.

YU, J. H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 437-58, 2005.