



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSUÉ JOSÉ DA SILVA

**INCIDÊNCIA DE FUMONISINAS E *Fusarium* spp. EM GRÃOS
DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS SOB
DISTINTAS CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Londrina
2015



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Josué José da Silva

**INCIDÊNCIA DE FUMONISINAS E *Fusarium* spp. EM GRÃOS
DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS SOB
DISTINTAS CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA**

Londrina
2015

JOSUÉ JOSÉ DA SILVA

INCIDÊNCIA DE FUMONISINAS E *Fusarium* spp. EM GRÃOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS SOB DISTINTAS CONDIÇÕES DE FERTILIZAÇÃO NITROGENADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* 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^a Dr^a. Daniele Sartori

Londrina
2015

JOSUÉ JOSÉ DA SILVA

**INCIDÊNCIA DE FUMONISINAS E *Fusarium* spp. EM GRÃOS DE
DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS SOB DISTINTAS
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

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

Dr^a. Carla de Freitas Munhoz
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz –
Esalq/USP

Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de Fevereiro de 2015.

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586i Silva, Josué José da.

Incidência de fumonisinas e *Fusarium* spp. em grãos de diferentes genótipos de milho cultivados sob distintas condições de fertilização nitrogenada / Josué José da Silva. – Londrina, 2015.
108 f. : il.

Orientador: Maria Helena Pelegrinelli 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. *Fusarium verticillioides* – Teses. 2. Fungos toxigênicos – Genética – Teses. 3. Milho – Genética – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. I. Fungaro, Maria Helena Pelegrinelli 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

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular por me abrirem as portas e oferecer uma imensidão de conhecimento muito valioso para minha evolução profissional.

A minha orientadora, professora Dra. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro pelo oportuno apoio, por sua excepcional proatividade, paciência, pelo exemplo de caráter profissional e pessoal e por sua amizade.

Meu agradecimento especial à Dra. Daniele Sartori, por suas orientações acadêmicas, tutoria científica e por sua amizade.

A meus pais e familiares por seu amor e entender que as minhas decisões são necessidades de crescimento profissional.

Ao Professor Dr. Josué Maldonado Ferreira pelo apoio no trabalho em campo, contribuições e auxílio nas análises estatísticas.

Aos agricultores do município de Florestópolis pelo fornecimento dos grãos utilizados neste trabalho.

Aos professores e funcionários dos Laboratórios de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Lab. Melhoramento Genético e Lab. de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas da UEL.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular de Fungos, Fernanda Pelisson Massi, Helena Paula Viaro, Karla Murata Vieira, Larissa de Souza Ferranti e Rafael Elias Penha, pelos conhecimentos passados, pelo auxílio no trabalho, pelo convívio e amizade.

As doutoras Carla de Freitas Munhoz, Maria Lúcia Carneiro Vieira, Sílvia Helena Sofia e ao doutor Fernando Gomes Barcellos, pela participação na banca examinadora, por seus comentários e sugestões.

A Dra. Ana Lúcia Dias e a todos os membros da coordenação do programa de Pós-graduação por seu empenho na missão de educar.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A Deus por tudo.

SILVA, Josué José. **Incidência de fumonisinas e *Fusarium* spp. em grãos de diferentes genótipos de milho cultivados sob distintas condições de fertilização nitrogenada.** 2015. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

Fusarium verticillioides (teleomorfo *Gibberella moniliformis*) é mundialmente reconhecido como o principal patógeno do milho. Este fungo é responsável pela podridão da espiga e colmo levando a grandes perdas de produtividade. Além disso, *Fusarium verticillioides* é uma espécie conhecida por produzir fumonisinas, uma das mais importantes classes de toxinas que contaminam alimentos, preponderantemente aqueles à base de milho. Neste estudo, foram avaliados grãos de milho recém-colhidos de 16 tratamentos que diferiam quanto às práticas de fertilização, incluindo o uso de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), e quanto aos genótipos. As análises tinham em vista investigar a presença de fumonisinas nos diferentes tratamentos, buscar associação com a incidência de *Fusarium* spp., e com a diversidade genética do conjunto de *F. verticillioides* isolados. Os níveis de fumonisinas totais (FB₁+FB₂) foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Verificou-se que 100% das amostras estavam contaminadas com fumonisinas, com valores variando de 0,4 a 9,1 µg/g. A incidência de fungos foi avaliada em 3840 grãos provenientes de diferentes genótipos e condições de fertilização. Cerca de 70% dos grãos estavam infectados com *Fusarium* spp.. Para identificação das espécies de *Fusarium* foi utilizado o sequenciamento de parte do gene *TEF-1α*. Através desta metodologia foram identificadas quatro espécies de *Fusarium*, mas *Fusarium verticillioides* foi à espécie de maior incidência. Para análise da estrutura genética da população obtida foi utilizada a técnica de Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Um total de 709 marcadores revelou alta diversidade genética intra-específica para *F. verticillioides* e diferença na estruturação genética entre as populações provenientes de diferentes genótipos de milho e locais de cultivo.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*. *Fusarium* spp.. Fumonisin. Milho. AFLP.

SILVA, Josué José. **Incidence of fumonisins and *Fusarium* spp. in grains harvested from four maize genotypes grown under distinct nitrogen fertilizer conditions.** 2015. Master Thesis (Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides (teleomorph *Gibberella moniliformis*) is recognized as the most damaging corn pathogen worldwide. The fungus causes the ear rot and stalk rot leading to pronounced devastating losses in productivity. On the other hand, *F. verticillioides* is known as a fumonisin producer, one of the most important classes of toxins that contaminate food essentially corn-based food. In the present study, we evaluated maize grains harvested from 16 treatments regarding practices for nitrogen fertilizer including the use of plant growth promoting bacteria (PGPB), as well as four maize genotypes which were grown in two localities. Our aim was to (i) investigate the occurrence of fumonisin in grains from all the treatments, (ii) search for possible association between the occurrence of fumonisin, the incidence of *Fusarium* spp. and the genetic diversity of *F. verticillioides* isolates on the basis of AFLP profiling. The levels of total fumonisin (FB1+FB2) were quantified by high performance liquid chromatograph (HPLC). We found that 100% of the grain samples were contaminated with fumonisin, ranging from 0.4 up to 9.1 µg per g. In total 3,840 grains was evaluated and ~70% of them were infected with *Fusarium* spp., which species identification was performing by sequencing part of the *TEF-1α* gene. Four species were identified, being *F. verticillioides* the most prevalent. A total of 709 AFLP markers were scored, and a high intraspecific genetic variation was observed in *F. verticillioides* that was preferentially associated with the maize genotypes and growing localities.

Keyword: *Fusarium verticillioides*. *Fusarium* spp.. Fumonisin. Corn. AFLP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Estrutura química dos dois principais análogos de fumonisinas (FB₁ e FB₂) 23
- Figura 2** - Mecanismo de ação das fumonisinas no metabolismo de esfingolípideos24
- Figura 3** - Representação esquemática de genes do cluster *FUM* em *F. verticillioides*. A seta indica o sentido da transcrição.....26
- Figura 4** - Patossistema de *F. verticillioides* no milho.....29
- Figura 5** - Delineamento experimental.....40
- Artigo científico**
- Figura 1.** Gráfico da contaminação por fumonisinas totais (FB₁+FB₂) nos 16 tratamentos, em Londrina e Florestópolis 64
- Figura 2.** Aspectos morfológicos de *Fusarium* spp.. (A) Isolamento fúngico em meio DG18 (B) Crescimento fúngico em meio DCPA após 7 dias a 25°C, (C) Células conidiogênicas em forma de fialídes (40x), (D) Macro e microconídios (100x)..... 67
- Figura 3.** Árvore UPGMA baseada em dados de AFLP. Nós suportados por valores de bootstrap > 70% são indicados por valores numéricos. Isolados em Londrina (1-20=HC; 21-39=CA; 40-58=V1; 59-77=V2) e Florestópolis (78-97=HC; 98-117=CA; 118-137=V1; 138-157=V2)..... 70
- Figura 4.** Árvore filogenética inferida pelo algoritmo de *Neighbor-joining* (NJ) utilizando o programa MEGA 6.0, baseada em dados de sequência do gene *TEF1α* de cepas tipo de *Fusarium* spp. e isolados de milho do presente estudo. Nós suportados por valores de bootstrap > 70% são indicados por valores numéricos. *Aspergillus oryzae* é o *outgroup* 71
- Figura 5.** Resultado do teste de atribuição. Grupos de 1 a 4 (*Cluster A*) representam os isolados de Londrina e os grupos de 5 a 8 (*Cluster B*) os isolados de Florestópolis. CA (Caiano), HC

(Híbrido comercial), V1 (ST 509), V2 (ST 1309). Cada cor representa um *cluster* genotípico atribuído probabilisticamente pelo software Structure 2.3.4 74

Figura 6. Análise de coordenadas principais (PcoA) em isolados de *F. verticillioides*. Isolados identificados por uma cruz= oriundos de Florestópolis, isolados identificados com triângulo=oriundos de Londrina 75

Figura 7. PCR Multiplex utilizando *primers* específicos para os genes *FUM1* (635 bp) e *FUM8* (1152 bp). (M) DNA Ladder 1 kb plus, (A) Isolados potencialmente produtores de fumonisinas 1-24 *F. verticillioides*. (B) Isolados não produtores, 25-27 *F. verticillioides*, 28-30 *Fusarium* spp 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Micotoxinas de maior importância em alimentos.....21

Artigo científico

Tabela 1. Incidência de *Fusarium* spp. e ocorrência de fumonisinas FB₁, FB₂ e totais em grãos de milho 66

Tabela 2. Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{st} em isolados de *F. verticillioides* segundo sua origem geográfica. 72

Tabela 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) e F_{st} em isolados de *F. verticillioides* segundo o genótipo do milho..... 72

LISTA DE ABREVIações E UNIDADES

ABIMILHO	Associação Brasileira das Indústrias do Milho
AC	Adubação completa
AF	Aflatoxinas
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Análise de Variância Molecular
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Adubação de plantio
a_w	Atividade de água
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPCP	Bactéria Promotora do Crescimento de Plantas
CA	Caiano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTNBio	Conselho Técnico Nacional de Biossegurança
DCPA	Ágar Dicloran Cloranfenicol Peptona
DG18	Ágar Dicloran Glicerol 18% com Cloranfenicol
DTN	Danos ao túbulo neural
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EFSA	European Food Safety Authority
EMBRAPA	Empesa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
FB ₁	Fumonisina B1
FB ₂	Fumonisina B2
FDA	Food and Drug Administration
F _{ST}	Índice de fixação de Wright
h	Horas
HC	Híbrido comercial
IARC	International Agency for Research on Cancer

IBV	Inoculante <i>Azospirillum brasilense</i>
IZM	Inoculante <i>Methylobacterium komagatae</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol L ⁻¹	Milimol por litro
mol L ⁻¹	Mol por litro
N	Nitrogênio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramas
NJ	Neighbor-Joining
nm	Nanômetros
OT	Ocratoxinas
pb	Pares de base
PcoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
r.p.m.	Rotações por minuto
TCT	Tricotecenos
<i>TEF-1α</i>	Fator de alongamento da tradução
UEL	Universidade Estadual de Londrina
USA	United States of America
UV	Luz ultravioleta
v	Versão
v	Volume
V1	Variedade ST509
V2	Variedade ST1309
ZEN	Zearalenona
µg	Micrograma

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
$\mu\text{mol L}^{-1}$	Micromol por litro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	O MILHO	17
2.2	MICOTOXINAS	19
2.3	FUMONISINAS	20
2.4	LEGISLAÇÃO	26
2.5	<i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	27
2.6	FATORES QUE INFLUENCIAM A INFECÇÃO FÚNGICA E A PRODUÇÃO DE FUMONISINAS	31
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	INFRAESTRUTURA	39
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAL VEGETAL	39
4.3	INOCULANTES E ADUBAÇÃO QUÍMICA	41
4.4	DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS	42
4.4.1	Extração e purificação de fumonisinas	42
4.4.2	Quantificação de fumonisinas por cromatografia líquida de alta eficiência	42
4.5	ANÁLISES MICOLÓGICAS E EXTRAÇÃO DE DNA	43
4.5.1	Avaliação da incidência fúngica em grãos de milho	43
4.5.2	Purificação dos isolados de <i>Fusarium</i> spp.	43
4.5.3	Extração de DNA genômico de <i>Fusarium</i> spp.	44
4.6	ANÁLISE DE AFLP "AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM" EM <i>FUSARIUM</i> SPP.	44

4.6.1	Restrição do DNA genômico	44
4.6.2	Ligação de adaptadores	45
4.6.3	Pré-amplificação	45
4.6.4	Amplificação seletiva	45
4.6.5	Análises estatísticas dos dados de AFLP	46
4.7	REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE PCR	47
4.7.1	Amplificação de fragmento do gene <i>TEF-1α</i>	47
4.7.2	Reação de sequenciamento parcial do gene <i>TEF-1α</i> de <i>Fusarium</i> spp.....	48
4.7.3	Alinhamento e análises filogenéticas.....	49
4.7.4	Investigação do potencial toxigênico dos isolados	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de grãos de milho (USDA, 2014). A boa posição brasileira no ranking mundial se deve, em parte, à adoção da tecnologia de produção de híbridos associada à transgenia que ocorreu a partir de safra de 2007/2008. Atualmente, cerca de 460 cultivares de milho estão disponíveis no mercado brasileiro, sendo que 250 são cultivares transgênicas, especialmente resistentes a insetos da ordem lepidóptera (CRUZ, FILHO e QUEIROZ, 2014). A produção da safra 2013/2014 ultrapassou a 80 milhões de toneladas de grãos, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China (RANUM, PENA-ROSAS e GARCIA-CASAL, 2014). Apesar deste cenário favorável à produção, a contaminação de grãos com micotoxinas tem sido uma importante preocupação dos envolvidos no agronegócio do milho. Ademais, esta preocupação também deveria assolar a agricultura familiar brasileira que tem o milho como um dos principais cultivos para a subsistência ou venda local. Em geral, estes agricultores cultivam variedades convencionais ou crioulas e evitam o uso de insumos agrícolas externos à propriedade.

Dentre as micotoxinas, a classe das fumonisinas é indubitavelmente a mais relevante para a cultura do milho. Até o momento, já foram caracterizados 28 análogos de fumonisinas, sendo que as fumonisinas B1 (FB₁) e B2 (FB₂) são as mais tóxicas e podem ocorrer em grandes quantidades no milho (ALIZADEH et al., 2012; BRYLA et al., 2013). A ocorrência de FB₁ e FB₂ em milho e produtos à base de milho produzidos no Brasil tem sido reportada por vários autores (ALMEIDA et al., 2000; CAMARGOS et al., 2000; HIROOKA et al., 1996; LANZA et al., 2014; ONO et al., 2008; QUEIROZ et al., 2012; SCUSSEL et al., 2013; VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003; VARGAS et al., 2001; dentre outros). Devido aos diversos agravos que as fumonisinas podem causar à saúde animal e humana (BERMUDEZ et al., 1995; CASTEEL et al., 1994; MARASAS et al., 1988; MILLER, 2001; WANG et al., 1991), o Brasil, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceu limites máximos tolerados (LMT) de fumonisinas em grãos de milho. Segundo a legislação (ANVISA, 2011), a partir de janeiro de 2017, o limite máximo tolerável para fumonisinas (FB₁ + FB₂) em grãos de milho será de 5 µg/g.

Dentre as principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de fumonisinas destacam-se *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, ambas

frequentemente encontradas em milho. A necessidade de cumprir a referida deliberação da Anvisa tem estimulado as investigações a campo visando estabelecer estratégias para mitigar as consequências da fusariose na cultura do milho.

A infecção por *Fusarium* spp. e a ocorrência de fumonisinas em milho podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como: temperatura, disponibilidade de água, danos causados por insetos, virulência das cepas fúngicas, composição química do grão, inóculo inicial, interação planta-patógeno, interações e competições entre a microbiota, fatores genéticos intrínsecos a cada planta e práticas culturais (ARIAS et al., 2012; MARIN et al., 2013). Dentre as práticas culturais, a rotação de culturas tem se mostrado eficaz na redução de *Fusarium* spp. em milho e, conseqüentemente, na redução de fumonisinas (ABBAS et al., 2004; JAIME-GARCIA e COTTY, 2010). A fertilização nitrogenada, quantidade e forma de aplicação, é outro tipo de manejo que influencia na incidência e quantidade de micotoxinas (BLANDINO et al., 2008; ABBAS et al., 2009).

Com vistas a outros objetivos que não o controle de micotoxinas, o Brasil tem tentado aprimorar a tecnologia de inoculação de gramíneas, incluindo o milho, com Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP). Estas bactérias beneficiam o crescimento das plantas pela combinação de diversos mecanismos, incluindo a capacidade de fixação biológica de nitrogênio e de atuarem como agentes de controle biológico de patógenos (HUNGRIA, 2011). Pelo conhecimento que se tem até então, não existe informação sobre o efeito dos inoculantes contendo BPCP sobre a incidência de *Fusarium* spp. e fumonisinas em milho.

Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo analisar a presença de fumonisinas e incidência de *Fusarium* spp. em diferentes genótipos de milho, incluindo variedades convencionais, crioula e híbrido transgênico *Bt*, cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de BPCP. Além disso, também se constituiu objetivo deste trabalho analisar a diversidade genética dos isolados de *Fusarium verticillioides*. por meio de AFLP, sequências de nucleotídeos do gene *TEF-1 α* e PCR específica para os genes *FUM1* e *FUM8*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O MILHO

O milho (*Zea mays* L.), uma gramínea pertencente à família Poaceae, é uma das culturas mais antigas do mundo com achados arqueológicos datados de 7.000 a 10.000 anos atrás. A domesticação do milho foi feita pelas tribos indígenas da América Central, mais possivelmente no México, e sudoeste dos Estados Unidos (RANUM, PENAROSAS e GARCIA-CASAL, 2014). Com o descobrimento das Américas, o milho foi levado à Europa onde se iniciou seu cultivo comercial espalhando-se posteriormente por todo o mundo por meio da expansão do comércio marítimo (PLEADIN et al., 2012). É um cereal que possui alto valor alimentício, sendo rico em carboidratos, proteínas, lipídeos e fibras além de apresentar elevada versatilidade de processamentos (PHOKU et al., 2012).

No Brasil, o milho é produzido em larga escala, no ano de 2013 registrou-se um aumento de 10% na produção em relação ao ano anterior, alcançando mais de 81 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2014). Na última década o país tem experimentado um aumento crescente na produção que é decorrente de dois fatores principais: o aumento em área plantada, em cerca de 30%, e o aumento em produtividade, que é resultante do uso de sementes melhoradas e da adoção de práticas culturais mais adequadas (PEIXOTO, 2014).

O Brasil responde por 8 % da produção mundial de milho, garantindo ao país a posição de terceiro maior produtor do grão, sendo superado apenas por EUA e China (FAO, 2012).

No âmbito nacional a região sul é a responsável pela maior parte da produção, cerca de 30%, sendo o estado do Paraná o maior produtor nacional, tendo produzido cerca de 20 milhões de toneladas no ano de 2014.

A alta produção de milho é fomentada pela demanda interna movida principalmente pela alimentação animal que consome 53% da produção nacional na forma de rações e farelos. Apenas 2% é destinada à alimentação humana, 6% à indústria, e cerca de 30% à exportação, o restante compõem as perdas, produção de sementes e outros usos (ABIMILHO, 2014).

O processo de beneficiamento do grão pode ser feito por moagem úmida ou seca, sendo a moagem seca o processo mais utilizado no Brasil. Deste processo resultam produtos como: farinha de milho, fubá, quirera e óleo vegetal. A moagem seca envolve menor investimento industrial e não necessita de grandes escalas de produção, enquanto que a moagem úmida envolve maior complexidade tecnológica e maiores investimentos. A moagem úmida tem como principal subproduto o amido, popularmente denominado de maisena (MATTOSO et al., 2006).

A produtividade do milho é influenciada por diversos fatores, sendo os principais: condição geoquímica, clima, sazonalidade, adaptabilidade da planta, arranjo espacial, boas práticas culturais e incidência de pragas e patógenos. O milho é altamente vulnerável ao ataque de patógenos, os quais representam ameaça à qualidade desse cereal. Entre os patógenos mais importantes estão os fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (ALMEIDA et al., 2000; ORSI et al., 2000).

Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos, tais como: a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, aquecimento e perda da qualidade nutricional. Todos esses fatores levam a perda da qualidade e, por conseguinte perda do valor comercial (PASTER e BULLERMAN, 1988). Além dos danos fitopatológicos pode-se ter, ainda, problemas com contaminação por micotoxinas, isso porque algumas espécies de fungos que infectam o milho são dotadas da capacidade de produzir toxinas em seu metabolismo secundário (MARIN et al., 2013). A contaminação por micotoxinas pode ocorrer em qualquer período da cadeia produtiva, desde o plantio até o seu armazenamento, dificultando assim o seu controle (SOARES, CALADO e VENÂNCIO, 2013).

As micotoxinas mais encontradas em milho são produzidas principalmente por espécies do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*. As aflatoxinas (AF) e ocratoxinas (OT) são produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, enquanto que as toxinas da classe das fumonisinas (F), tricotecenos (TCT), zearalenonas (ZEN) e deoxinivalenol (DON) são produzidas por espécies do gênero *Fusarium*. Além disso, um grupo de micotoxinas conhecidas como micotoxinas emergentes que incluem beauvericina, enniatins, fusaproliferin e moniliformina também tem sido relatado como provenientes do

metabolismo secundário de algumas espécies de *Fusarium* (DALL'ASTA et al., 2012; PLACINTA, D'MELLO e MACDONALD, 1999; SHEPHARD et al., 2013).

2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por espécies de fungos que normalmente infectam produtos destinados à alimentação, principalmente cereais como milho, arroz e trigo. Quando ingeridas as micotoxinas trazem grave risco a saúde humana e animal, pois podem possuir atividade imunossupressora, hepatotóxica, cancerígena, nefrotóxica e neurotóxica. Devido a isso, muitos países têm adotado um controle rigoroso, normatizando e inspecionando os setores de produção e comércio dos alimentos mais susceptíveis (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014).

As micotoxinas de maior impacto na saúde pública são: as aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OT), fumonisinas (F), zearalenonas (ZEN), e tricotecenos (TCT). Essas toxinas geram prejuízo de milhares de dólares todos os anos por conta da sua presença em alimentos que são preteridos pelo comércio (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Dentre os grupos mais afetados pela contaminação de micotoxinas estão as populações rurais de países em desenvolvimento que dependem de alimentos produzidos localmente, sem a aplicação de estratégias de controle de qualidade e sem fiscalização adequada que previna o risco de contaminação (WU, GROOPMAN e PESTKA, 2014).

Uma única espécie fúngica pode produzir mais de um tipo de toxina concomitantemente, e pode haver ainda a co-contaminação em decorrência da produção de toxinas por diferentes espécies fúngicas. Na Tabela 1 pode se observar as principais espécies toxigênicas associadas à micotoxina que produz e aos alimentos em que são encontradas.

Existem diversos fatores que influenciam a presença de micotoxinas em alimentos: carga fúngica, competição e interação entre espécies, interações planta-patógeno, condições de armazenamento, condições ambientais e composição do substrato. Muitas vezes tais fatores são alheios ao controle humano, outras vezes é possível desenvolver estratégias que reduzam o risco da contaminação (CAO et al., 2013; WOLOSHUK e SHIM, 2013).

2.3 FUMONISINAS

As fumonisinas foram descritas originalmente como produtos do metabolismo secundário de *F. verticillioides* (GELDERBLOM et al., 1988).

As principais espécies produtoras de fumonisinas no milho são *F. verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) e *F. proliferatum*, que taxonomicamente fazem parte da seção *Liseola* onde se encontra a maioria das espécies produtoras de fumonisinas: *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. thapsinum*, *F. fujikuroi*, *F. subglutinans*, *F. globosum*, *F. andiyazi*, *F. begoniae*, *F. konzum* e *F. phyllophilum* (LESLIE et al., 2007). Além de *Fusarium* spp. algumas espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* também são produtoras dessa toxina (LOGRIECO et al., 2014), porém em menor quantidade.

Indubitavelmente as fumonisinas são as micotoxinas mais recorrentes na cultura do milho e seus derivados (GHAZVINI et al., 2011; BRYLA et al., 2013; MORETTI et al., 2013).

Em 1992, em um povoado da África do Sul, foi relatada pela primeira vez a associação da ingestão de alimentos contaminados com fumonisinas, e o aumento da taxa de câncer esofágico na população (RHEEDER et al., 1992).

Tabela 1- Micotoxinas de maior importância em alimentos

Micotoxinas	Fungos produtores	Alimentos onde são encontrados	Principais espécies afetadas	Referências
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	Milho, sementes de algodão, amendoim, nozes, arroz e sorgo	Humanos, suínos, aves, ruminantes e equinos	(VIEGAS et al., 2013; ASIKI et al., 2014)
Ocratoxina	<i>Aspergillus</i> seção <i>Circundati</i> , <i>Aspergillus</i> seção <i>Nigri</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Penicillium nordicum</i>	Milho, trigo, cevada, aveia, carne seca, vinho e café	Suínos, aves e Humanos	(WU, GROOPMAN e PESTKA, 2014)
Desoxinivalenol	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> e <i>F. cerealis</i>	Milho, trigo, cevada, aveia, centeio e soja	Suínos e aves	(PINTON e OSWALD, 2014)
Toxina T-2	<i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> e <i>F. langsethiae</i>	Trigo, aveia, cevada, centeio, figo, batata e grão processados	Aves	(OSSELAERE et al., 2013)
Zearalenona	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. verticillioides</i> e <i>F. incarnatum</i>	Milho, cevada, aveia, feno, centeio, trigo, arroz, sorgo, banana, girassol e nozes	Ruminantes, suínos e aves	(DÖLL e DÄNICKE, 2011)
Fumonisinás	<i>Fusarium</i> seção <i>Liseola</i> e <i>Aspergillus niger</i>	Milho e seus subprodutos, aspargo, bulbos de alho, trigo, arroz, café e feijões	Equinos, suínos, humanos e aves	(ALIZADEH et al., 2012; SCOTT, 2012)

Fonte: adaptado de Abdin, Ahmad e Javed (2010)

Desde então vários trabalhos têm corroborado com estes resultados (SOLFRIZZO et al., 2004; ALIZADEH et al., 2012).

Fumonisinás também possuem comprovada capacidade de ocasionar leucoencefalomalácia (LEME) e hepatotoxicidade em equinos, edema pulmonar e perda de peso em suínos, problemas cardíacos, hepatomegalia e imunodepressão em aves, câncer no fígado em humanos e mais recentemente tem sido apontada como possível

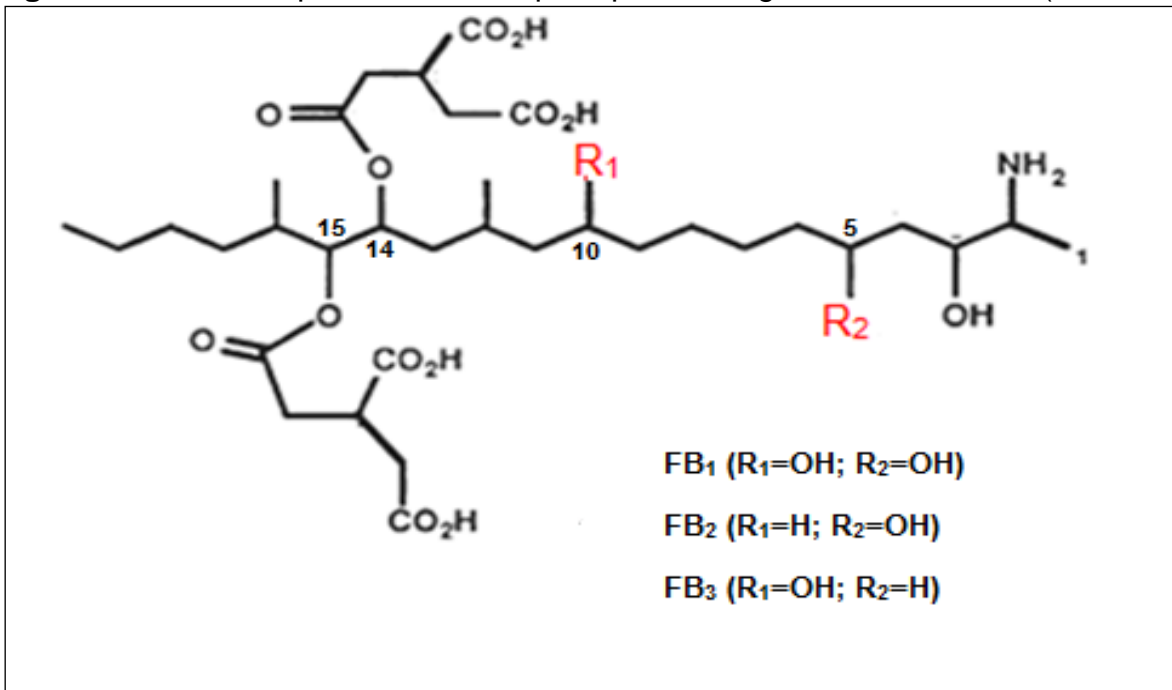
fator de risco para danos no túbulo neural (DTN) em ratos e humanos (BORDIN et al., 2014; SUAREZ et al., 2012).

Danos no túbulo neural ocorrem ainda na formação do embrião no primeiro mês de vida, onde o não fechamento do túbulo resulta em malformações congênitas como a espinha bífida, paralisia parcial, anencefalia, nascimento prematuro e morte. É recomendável o consumo de grandes quantidades de folato no primeiro trimestre de gravidez para se reduzir o risco de DTN. As fumonisinas podem interferir no metabolismo do folato aumentando a incidência de DTN em populações de risco, isto é, onde a ingesta de folato é insuficiente e o milho e seus derivados constituem a base da alimentação (WU, GROOPMAN e PESTKA, 2014).

A estrutura química das fumonisinas (diéster de propano 1, 2, 3 - ácido tricarboxílico-2 – amino - 12, 16 dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxicosano) foi elucidada em 1988 (BEZUIDENHOUT et al., 1988). É constituída por uma cadeia principal de carbono com duas esterificações nas posições C14 e C15 e um grupo carboxila terminal (Figura 1).

Atualmente já foram caracterizados 28 análogos químicos que são separados em quatro séries: A, B, C e P. Dentre estas, as toxinas da série B (FB₁ e FB₂) são as mais estudadas já que são as mais importantes toxicologicamente. Estes dois análogos de fumonisinas diferem em suas estruturas pela presença/ausência de hidroxilas em C-5 e C-10 (Figura 1). FB₁ tem função hidroxila, tanto em C-5 como em C-10; FB₂ tem uma função hidroxila em C-5, mas não em C-10 (PROCTOR et al., 2006).

Figura 1 - Estrutura química dos dois principais análogos de fumonisinas (FB₁ e FB₂).



Fonte: adaptado de HUSSEIN (2014) e LINO (2009).

A fumonisina FB₁ é a isoforma mais presente no milho correspondendo a 70% de todas as fumonisinas encontradas, os análogos, FB₂ e FB₃ geralmente co-ocorrem com FB₁ em menores níveis (DUTTON, 1996; LOGRIECO et al., 2014), FB₁ é também a mais associada a agravos à saúde, sendo classificada pela "International Agency for Research on Cancer" (IARC) como possível carcinógeno humano do grupo B2 (IARC, 1993).

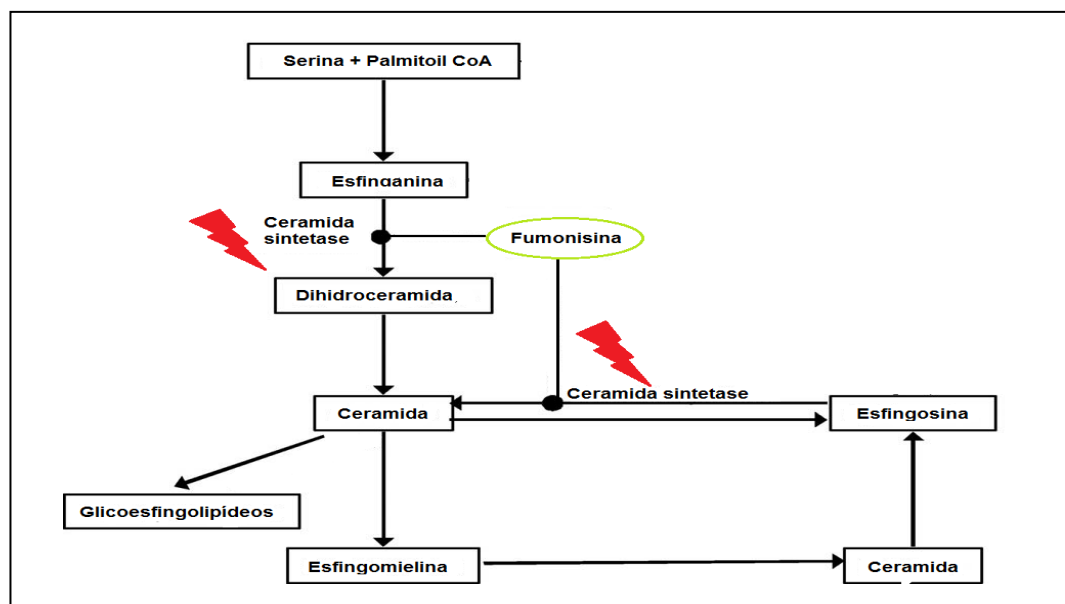
Estruturalmente as fumonisinas são um grupo de micotoxinas com uma forte semelhança com a esfingosina, esfinganina e outras bases esfingóides. Seu mecanismo de toxicidade está relacionado com a inibição do metabolismo dos esfingolípideos, que são lipídeos de membrana que possuem diversas funções no organismo: na regulação celular, na manutenção da estrutura da membrana, na comunicação celular, na modulação de receptores, na diferenciação celular e apoptose. Assim, a inibição da biossíntese dos esfingolípideos pode trazer consequências severas à saúde (RILEY et al., 2001).

Segundo Scott (2012) este grupo de micotoxinas, especialmente FB₁, inibe de forma competitiva, a ceramida sintetase (*N*-acetil transferase) uma enzima chave na síntese de esfingolípídeos. Desta forma, a molécula de fumonisina ocupa o sítio ativo da enzima bloqueando a síntese de ceramida, uma precursora de esfingomiéline e glicosfingolípídeos (Figura 2). Este bloqueio resulta no acúmulo tóxico de bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) juntamente com a interrupção da via de síntese de esfingolípídeos complexos.

Esta perturbação biológica causa alteração nos níveis de esfinganina em tecidos, urina e sangue. A análise laboratorial dessas alterações tem sido proposta como possível biomarcador da exposição à fumonisinas em várias espécies, mas ainda são necessários mais estudos para validação dessa proposta (SOLFRIZZO et al., 2004).

Devido as fumonisinas serem relativamente estáveis ao calor, a sua concentração só é reduzida significativamente se temperaturas acima de 150°C forem utilizadas, além disso, as fumonisinas são resistentes aos processos fermentativos e, portanto, podem ser encontradas em diversos produtos derivados do milho (EFSA, 2005).

Figura 2 – Mecanismo de ação das fumonisinas no metabolismo de esfingolípídeos



Fonte: Adaptado de Stockmann-juvala e Savolainen (2008).

Os processamentos como: extrusão, moagem e cozimento podem reduzir os níveis de fumonisinas em grãos de milho e derivados, todavia, esta redução depende muito de condições como: tempo, pH, concentração inicial e temperatura. Pesquisadores têm observado um aumento nos níveis de fumonisinas em milho que sofreu moagem a seco, enquanto que a situação é inversa para moagem úmida que retém cerca de 20% das fumonisinas na água residual não deixando frações detectáveis no amido (MILANI e MALEKI, 2014).

Embora vários países já possuam legislação e fiscalização dos níveis máximos de fumonisinas admitidos em alimentos, recentemente surgiu uma nova preocupação: as chamadas fumonisinas “mascaradas” ou fumonisinas “ocultas”. Estes termos se referem à fumonisinas complexadas com macronutrientes do próprio alimento como proteínas e carboidratos, de tal forma que essas fumonisinas não são detectadas nas análises de rotina que só mensuram as moléculas livres. Porém, mesmo complexadas após a digestão estas moléculas são liberadas e passam a participar da toxicidade global. Estima-se que produtos de milho tenham de 0,9-1,3 vezes formas de fumonisinas mascaradas em relação a forma livre (BRYLA et al., 2013).

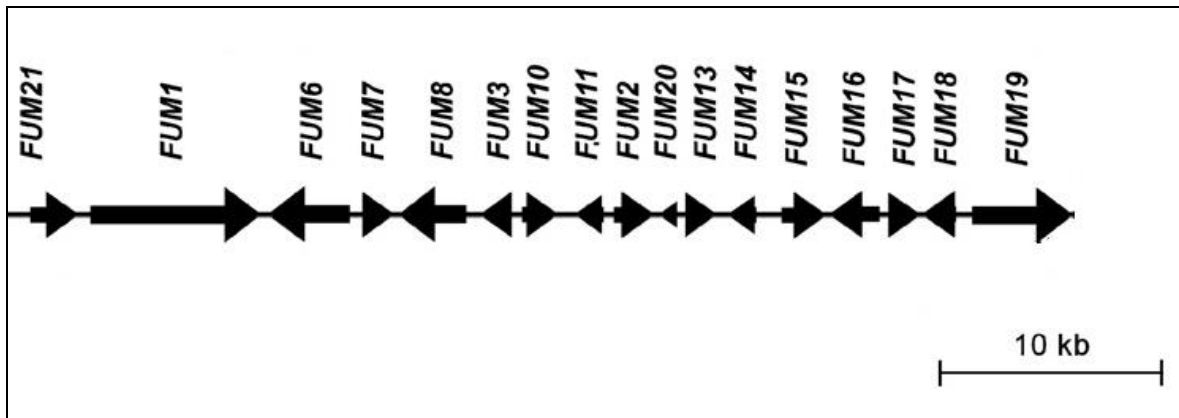
A via biossintética das fumonisinas se inicia com a síntese de um policetídeo, que é composto por uma cadeia carbônica de 18-20 carbonos, posteriormente, ela sofre condensação a uma molécula de alanina e outras modificações como oxigenações e esterificações (PROCTOR et al., 2003).

Análises genéticas e bioquímicas de *F. verticillioides* permitiram a identificação de um *cluster* gênico responsável pela codificação de enzimas envolvidas na biossintese das fumonisinas (este *cluster* foi denominado *cluster FUM*). O *cluster FUM* é composto por 17 genes (*FUM1*(=*FUM5*), *FUM2*(=*FUM12*), *FUM3*(=*FUM9*), *FUM6*, *FUM7*, *FUM8*, *FUM10*, *FUM11*, *FUM13*, *FUM14*, *FUM15*, *FUM16*, *FUM17*, *FUM18*, *FUM19*, *FUM20* e *FUM21*) que são co-regulados (Figura 3). O gene *FUM1* (= *FUM5*) codifica uma enzima denominada policetídeo sintase (Pks) que catalisa o primeiro passo da biossintese das fumonisinas, e como relatado por Desjardins et al. (2002) o nocaute deste gene bloqueia a síntese da toxina.

Nem todos os genes pertencentes ao *cluster FUM* são requeridos para a síntese de fumonisinas, os genes *FUM17*, *FUM18* e *FUM19* não são essenciais para síntese da

toxina, porém, foram incluídos no *cluster* devido a sua localização e co-regulação com os demais genes (PROCTOR et al., 2003; PROCTOR et al., 2008).

Figura 3 - Representação esquemática de genes do *cluster FUM* em *F. verticillioides*. A seta indica o sentido da transcrição.



Fonte: Proctor et al. (2008).

O *cluster* FUM pode variar quanto à ordem, número e orientação dos genes de acordo com a espécie. Em *F. proliferatum*, por exemplo, o gene *FUM17* não foi encontrado, sendo a diferença ainda maior em espécies de outros gêneros como *Aspergillus niger*, que possui apenas 11 homólogos dos 17 genes *FUM* encontrados em *F. verticillioides*. Isso se deve à história evolutiva independente a partir de uma ancestral comum, de onde provavelmente ocorreu transferência horizontal dos genes (PROCTOR et al., 2013).

2.4 LEGISLAÇÃO

Até o momento não existe uma legislação em nível mundial que regulamente os níveis máximos admitidos para fumonisinas em milho, porém, diversos países têm adotado legislações próprias normatizando a produção e o comércio de alimentos susceptíveis a contaminação por micotoxinas (LINO, SILVA e PENA, 2004).

Nos EUA, a FDA (Food and Drug Administration), delimitou valores máximos de 4 µg/g de fumonisinas (FB₁ + FB₂) para milho e seus derivados (FDA, 2001).

No Brasil, o regulamento técnico de 2011 (ANVISA, 2011) que discorre sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas, determinou o atendimento imediato de níveis de fumonisinas ($FB_1 + FB_2$), não superiores a 2 $\mu\text{g/g}$ para milho de pipoca e 0,2 $\mu\text{g/g}$ para alimentos à base de milho destinados à alimentação infantil. Já para os demais produtos e subprodutos como: milho em grão (LMT= 5 $\mu\text{g/g}$); farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica e canjiquinha (LMT=1,5 $\mu\text{g/g}$); amido de milho e outros produtos à base de milho (LMT=1 $\mu\text{g/g}$), a legislação estabeleceu um prazo (até janeiro de 2017) para adequações do setor produtivo.

2.5 *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

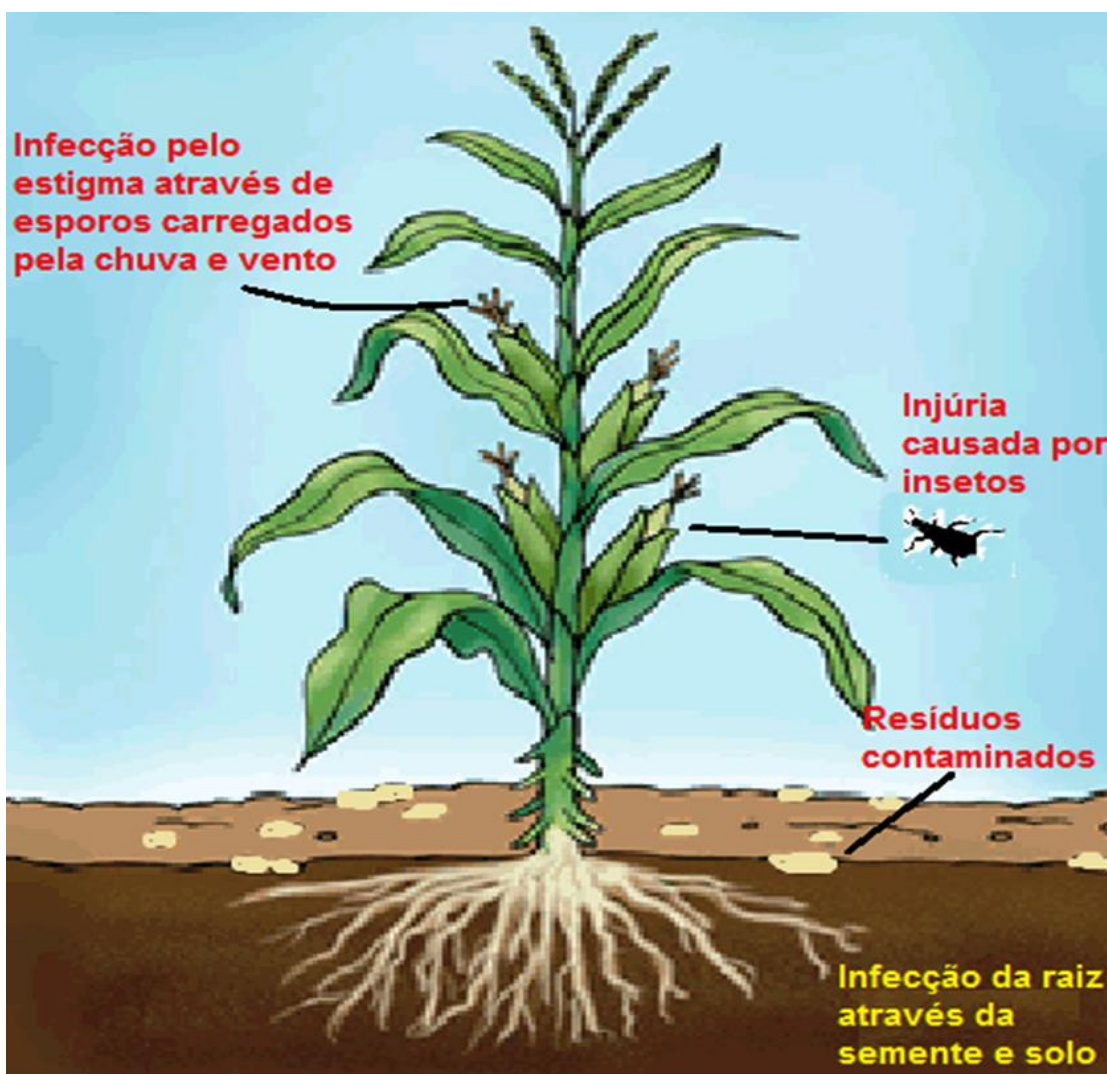
Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (sinônimo de *F. moniliforme* Sheldon) pertence à seção *Liseola*, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales. É um importante patógeno de plantas, destacando-se como o principal fitopatógeno do milho levando ao prejuízo de milhares de dólares todos os anos. O ciclo de infecção de *F. verticillioides* no milho é complexo e distribuído por várias vias (Figura 4).

A infecção pode ocorrer através das sementes, de forma sistêmica onde o fungo é passado da planta “mãe” aos seus descendentes (WILKE et al., 2007). Outra via é através de lesões nos grãos causadas por dano mecânico ou injúria de insetos que podem agir como vetores. Além disso, também pode ocorrer a infecção via estigma através de esporos que são carregados pela água e pelo vento (DE LA CAMPA et al., 2005; DUNCAN e HOWARD, 2010).

Apesar de *F. verticillioides* não formar clamidósporo há um espessamento de suas hifas que lhe confere resistência e viabilidade por um longo período de tempo de tal forma que restos culturais como sabugos, folhas secas, grãos, solo e qualquer parte da planta contaminada podem servir como inóculo para safra seguinte. Além disso, pode haver infecção assintomática onde não há danos visíveis na planta ou aos grãos, o que de certa forma eleva o risco de contaminação cruzada entre lotes de milho não contaminados já que sua presença passa a ser ignorada (ALMEIDA et al., 2000; BRYLA et al., 2013).

Há relatos de que a presença de *F.verticillioides* em milho pode ser benéfica à planta, por estímulo à produção de hormônios de crescimento, por proteção contra insetos ou por competição com outros patógenos como *F. graminearum* e *Aspergillus* spp., reduzindo assim a presença de aflatoxinas no milho (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997). Logrieco et al. (2014) relataram a competição entre *Aspergillus* seção Nigri e *Fusarium* spp.. Da mesma forma Marin et al. (1998) encontraram competição entre *F. verticillioides* e *F. proliferatum* no milho. Este tipo de interação pode influenciar na incidência de micotoxinas, todavia, na maioria das vezes a infecção por *F. verticillioides* é prejudicial à planta.

Tendo colonizado a planta o fungo se desenvolve rapidamente levando ao apodrecimento do caule, raiz, espigas, colmo e à necrose das plântulas. A sintomatologia da fusariose é iniciada por alterações na coloração externa da base do colmo que varia de uma cor branco-rosada a rosa-salmão. Quando a infecção se agrava severamente há esporulação do patógeno na parte externa do tecido afetado. *F. verticillioides* é também o principal responsável pela produção de micotoxinas em milho e seus derivados destacando-se como já foi dito as fumonisinas (MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997).



Fonte: adaptado de Munkvold e Desjardins (1997).

Esta espécie fúngica possui duas fases reprodutivas: uma anamórfica (assexuada), sendo denominado como *F. verticillioides*, e uma teleomórfica (sexuada), antigamente denominada como *Gibberella moniliformis*. A reprodução assexuada ocorre por meio de microconídios que são produzidos em esporodóquios. A presença de macroconídeos é rara. Neste caso, são hialinos, medem 2,5 a 5 x 15 a 60 µm, possuem as extremidades curvadas e apresentam de três a cinco septos. Os microconídios são abundantes e unicelulares, e medem 2 a 3 x 5 a 12 µm. O estágio sexuado de *F. verticillioides* é raramente observado na natureza, na fase sexuada, os peritécios são globosos, lisos e de coloração azul-negra. Os ascos são oblongos, medem 75 a 100 x 10 a 16 µm e contêm oito ascósporos, retos, com extremidades

afiladas, que têm constrição nos septos sendo a maioria com um único septo, que mede 4,5 a 7,0 x 12 a 17 μm (COVARELLI et al., 2012; WORDELL FILHO, 2012).

A contaminação por *F. verticillioides* é favorecida em ambientes com clima tropical e temperado, sua faixa de temperatura de crescimento varia de 22,5 a 27,5 °C. Outro fator importante na infecção e produção de micotoxina por este fungo é a atividade de água (a_w). Para o crescimento de *F. verticillioides* a atividade de água ótima é de 0,98 e a mínima de 0,87, já para a produção de fumonisinas a atividade de água mínima que o fungo necessita é de 0,93 e a ótima é de 0,97 (CAHAGNIER, MELCION e RICHARD-MOLARD, 1995; CAO et al., 2013).

A taxonomia do gênero *Fusarium* tem uma história de debates e controvérsias. Inicialmente Wollenweber e Reinking (1935) descreveram 65 espécies distribuídas em 16 seções e esta foi a base para o estudo do gênero. Mais tarde surgiram novas classificações baseadas em características morfológicas como forma e tamanho de macroconídios, microconídios, clamidósporos, tipo e presença de células conidiogênicas entre outras características.

Nirenberg (1982) descreveu 90 espécies, Nelson, Toussoun e Marasas (1983) reconheceram 30 espécies, e mais recentemente Leslie e Summerell (2006) descreveram 70 espécies. Até o momento, excetuando-se pequenas modificações, a classificação de Leslie e Summerell (2006) é a mais aceita. Após o trabalho dos pesquisadores referidos acima houve o reconhecimento de pelo menos três novas espécies: *F. werrikimbe* e *F. lyarnte* (WALSH et al., 2010) e *F. anatum* (JACOBS et al., 2010).

Com a descrição de "matting types" (necessidade de um parceiro sexual complementar) em *F. solani* e *F. moniliforme*, houve a necessidade de uma nova classificação que levasse em conta o conceito biológico de espécie e não apenas as suas características morfológicas. Para resolver tal problema, Nirenberg e O'donnell (1998) propuseram uma classificação associando conceito biológico e filogenético. Foi então proposto o complexo *Gibberella fujikuroi*, que engloba espécies de várias seções distintas que possuam o anamorfo *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. pseudonygamai*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F.*

circinatum e *F. xylarioid*). Cada espécie possui um *matting type* que é designada pelas letras de “A” a “J”, *F. verticillioides* apresenta a *matyng type* “A”.

Atualmente a descrição de espécies tem sido feita adotando métodos polifásicos que são compostos por análise das características morfológicas, filogenéticas e biológicas, a lista original de Leslie e Summerell (2006) contém a maioria das espécies reconhecidas, mas com algumas alterações por conta de sinonímias. Porém, ainda existem discussões entre grupos de taxonomistas quanto à nomeação correta de algumas espécies (DAREN e ROBERT, 2013).

O desenvolvimento das técnicas moleculares como a PCR permitiu a identificação e diagnose mais rápida de fungos fitopatogênicos. Para o gênero *Fusarium* as sequências de nucleotídeos mais comumente utilizadas para auxiliar na identificação de espécies são aquelas dos genes que codificam para β -tubulina, calmodulina e para o fator de alongamento da tradução *TEF-1 α* (MULÉ et al., 2004; O'DONNELL et al., 2000; SUMMERELL et al., 2003).

A técnica de AFLP (do inglês, Amplified Fragment Length Polymorphism) tem sido utilizada na avaliação da diversidade genética de *Fusarium* spp.. Esta técnica que se baseia na clivagem do DNA genômico por duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente, permite a obtenção de uma grande quantidade e variedade de fragmentos. Mediante tratamento enzimático, adaptadores são adicionados no final dos fragmentos de DNA. Iniciadores específicos, complementares aos adaptadores e acrescidos de um ou mais nucleotídeos seletivos, em condições de stringência adequada vão parear aos adaptadores e permitirão ampliações seletivas por PCR (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Esta técnica alia a robustez da técnica de RFLP com a confiabilidade da técnica de PCR (VOS et al., 1995).

2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A INFECÇÃO FÚNGICA E A PRODUÇÃO DE FUMONISINAS

A produção e o acúmulo de fumonisinas na cadeia produtiva do milho tem se mostrado um sistema complexo regido por diversos fatores, tais como: resistência da planta à infecção fúngica (essa resistência pode envolver várias características como resistência a seca, ao calor, a escassez de nutrientes), armazenamento inadequado, temperatura, umidade, índice pluviométrico, condições geoquímicas, atividade de água,

práticas culturais e resistência a insetos que possam servir como vetores para os fungos.

Um dos fatores mais importantes que tem sido apontado pela literatura é a atividade água (a_w). Battilani et al. (2011) investigaram a influência da dinâmica da disponibilidade de água (umidade e a_w) em grãos de milho em relação a produção de fumonisinas e concluíram que o nível de água no grão durante o amadurecimento impacta diretamente na produção de fumonisinas. Ainda segundo os autores, a colheita tardia interfere na atividade de água do grão e acaba favorecendo a infecção por *F. verticillioides* e, por conseguinte o acúmulo de fumonisinas. Por outro lado, Cao et al. (2013) relataram que um aumento crítico na atividade de água do grão pode levar o fungo ao estresse osmótico diminuindo assim o seu crescimento.

A necessidade de água para o crescimento fúngico é um fator utilizado para dividir os fungos toxigênicos em dois grupos ecológicos, os fungos de campo e os fungos de armazenamento. Os fungos de campo infectam os grãos na fase de desenvolvimento da planta e amadurecimento dos grãos (pré-colheita). Os fungos pertencentes a esse grupo incluem os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Estes fungos de campo requerem uma maior disponibilidade de água (umidade e a_w) dos que os fungos de armazenamento que são representados pelos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium*. Estes últimos gêneros são comumente encontrados em silos, moinhos e armazéns, e se constituem nas principais responsáveis pela deterioração pós-colheita (MÁRCIA e LÁZZARI, 1998).

O inóculo inicial, isto é, a carga fúngica recebida, a competição entre os diferentes micro-organismos, e a interação entre os mesmos também influencia na produção de micotoxinas. Existe ainda a contaminação pós-colheita que ocorre por falta de controle de qualidade nos processos industriais e por contaminação cruzada durante o armazenamento. O tempo em que os grãos permanecem em condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico, seja no campo ou na estocagem, contribui para o aumento da produção e do acúmulo de fumonisinas (ALBERTS et al., 1990; BRYLA et al., 2013).

Recentemente a consistência dos grãos também foi investigada em relação a ocorrência de fumonisinas, grãos mais macios apresentaram níveis mais elevados de fumonisinas em variedades de milho híbrido testadas por Blandino e Reyneri (2008).

A relação entre a composição química dos grãos e a presença de fumonisinas também tem sido analisada por vários pesquisadores. Segundo Bluhm e Woloshuk (2005) a amilopectina e outros açúcares são essenciais para a produção de fumonisinas atuando na indução da biossíntese. Tal hipótese pode explicar os menores níveis da toxina em grãos imaturos que ainda possuem pouca amilopectina.

Dall'asta et al. (2012), investigaram o papel dos ácidos graxos na infecção por *Fusarium* e na produção de fumonisinas. Os autores encontraram uma correlação positiva entre o aumento dos níveis de fumonisinas e a taxa de gorduras totais e ácido linoleico, que é um ácido graxo insaturado frequentemente descrito como modulador da resposta de resistência da planta ao patógeno. Estes resultados não corroboram com o trabalho de Ono et al. (2006) que não encontraram uma correlação entre o conteúdo lipídico e o nível de fumonisinas em milho.

A fase de desenvolvimento também pode impactar na susceptibilidade da planta e ao acúmulo de micotoxinas, Cao et al. (2013) observaram o acúmulo de fumonisinas constante até os grãos atingirem a maturidade fisiológica, a partir daí houve um rápido aumento dos níveis de fumonisinas que foi atribuído a outros fatores inerentes ao desenvolvimento da planta (fatores ambientais).

Bluhm e Woloshuk (2005) investigaram o milho em seis fases de seu desenvolvimento e observaram que a fase de formação do dente, onde há o início da maturidade fisiológica, é a que apresenta os maiores níveis de fumonisinas, entretanto, é importante dizer que a contaminação por *F. verticillioides* pode ocorrer em qualquer uma das fases.

Outro fator importantíssimo é o ataque de insetos, tanto no campo como na estocagem. Insetos são capazes de injuriar a camada de revestimento do grão que funciona como uma barreira física para a infecção fúngica. Aliado a isso danos mecânicos resultantes dos processos de colheita, transporte, secagem e armazenamento também podem contribuir facilitando a infecção dos fungos (DUNCAN e HOWARD, 2009).

Acredita-se que os insetos são os maiores responsáveis pela infecção fúngica no milho (FANDOHAN et al., 2005). *Fusarium* spp. são frequentemente associadas a insetos como *Ostrinia nubilalis*, *Helicoverpa armigera*, *Diabrotica virgifera* e *Frankliniella*

occidentalis (PARSONS e MUNKVOLD, 2012), sendo a broca do milho europeia (*Ostrinia nubilalis*) a mais importante.

Estas mariposas põem ovos sobre a superfície de folhas de milho que após eclodirem em forma de larva formam túneis através de perfuração na haste da planta, resultando na redução da produtividade e qualidade dos grãos. As perfurações causadas pelas larvas podem transportar esporos de *Fusarium* da superfície da folha para os tecidos mais internos (MAZZONI et al., 2011).

Uma das estratégias utilizadas para reduzir o ataque de *O. nubilalis* e outros insetos é o cultivo de milho transgênico que carrega em seu genoma o gene *Bt* de *Bacillus thuringensis*, que codifica uma proteína que quando ingerida se torna tóxica para os insetos, esta proteína é denominada *Cry* (DE LA CAMPA et al., 2005; PICOT et al., 2011). Ostry et al. (2010) em sua revisão analisaram 23 estudos de campo e dentro desses 19 relataram diminuição de micotoxinas de *Fusarium* spp. em milho *Bt*, reforçando a hipótese de que essa tecnologia pode ajudar a reduzir os níveis de fumonisinas no milho.

No Brasil a adoção da tecnologia de transgenia é regulada em diferentes instâncias, dentre elas pelo o Conselho Técnico Nacional de Biossegurança (CTNBio). Até o momento, esta instância colegiada vinculada ao Ministério de Ciência e Tecnologia, deliberou favoravelmente para o cultivo comercial de quatro culturas, porém, somente algodão, milho e soja estão sendo comercializadas. O milho ocupa 32% da área com culturas geneticamente modificadas no Brasil, ficando atrás somente da soja que ocupa 67%.

Estima-se que a área plantada com milho transgênico (safra verão + safra inverno) ocupe atualmente 12,9 milhões de hectares. Considerando a área total de plantio de milho no território brasileiro na safra 2013/2014, a adoção da tecnologia para o cereal chega a 81,5% do total. Dentre os estados da federação, Paraná e Mato Grosso lideraram a produção de milho transgênico no país em 2013, com 19,31 e 19,86 milhões de toneladas, respectivamente. Juntos estes dois estados são responsáveis por 45,6% da produção de milho transgênico no Brasil (CÉLERES, 2013).

De La Campa et al. (2005) avaliaram vários híbridos de milho *Bt* em comparação com suas linhas isogênicas convencionais não-*Bt*, por dois anos, em dois países, na

Argentina e nas Filipinas. Os autores observaram uma diminuição significativa nos níveis de fumonisina para as linhagens *Bt* no experimento da Argentina, porém, o resultado do experimento nas Filipinas foi o contrário. Esse trabalho exemplifica bem a controvérsia que se encontra na literatura sobre o assunto.

Segundo Hammond et al. (2004), o milho *Bt* pode reduzir efetivamente a contaminação por fumonisinas, porém, a produção de fumonisina é influenciada por uma vasta gama de condições ambientais sendo assim necessários estudos mais elaborados levando em conta vários fatores para elucidar essa relação.

Como descrito por Arias et al. (2012) a presença de fumonisinas também pode ser influenciada pela variedade, isto é, o potencial genético do cultivar e sua interação com o patógeno, sendo a resistência genética o principal mecanismo profilático na redução de fumonisinas no milho.

O milho crioulo é composto por populações que não sofreram intervenções genéticas e que tradicionalmente são cultivados por pequenos produtores. Estas populações apresentam alta variabilidade genética e elevado potencial adaptativo a condições ambientais geo-específicas. A alta variabilidade genética encontrada no milho crioulo pode servir de base para os melhoristas em busca de genes de resistência a patógenos como *Fusarium* (ARAÚJO e NASS, 2002).

Segundo Dall'asta et al. (2012) e Arias et al. (2012) a relação entre presença de fumonisinas e milho híbrido permanece controversa e necessita de mais investigação já que a produção de fumonisinas é regulada por um sistema complexo que envolve vários contextos.

Dentro das condições ambientais que influenciam a infecção fúngica e a presença de fumonisinas estão as práticas culturais como a rotação de culturas, densidade do plantio, aplicação de fungicidas e fertilização nitrogenada.

O nitrogênio (N) é o macronutriente mais importante na cultura do milho, plantas de milho expostas a carência de nitrogênio ficam mais susceptíveis a infecção por micro-organismos. Blandino e Reyneri (2008) analisaram a influência de diferentes fontes e concentrações de nitrogênio em relação à presença de fumonisinas e concluíram que tanto o excesso quanto a falta de nitrogênio influenciam na ocorrência de fumonisinas, sendo necessária uma concentração balanceada que leve em conta o

clima, a capacidade de absorção de N da cultura, o teor de N do solo, a frequência e época das aplicações.

Fungos podem utilizar diversas fontes de nitrogênio, mas preferencialmente utilizam amônio e glutamina em relação a outras fontes de nitrogênio, tais como nitrato e nitrito (MARZLUF, 1997). Existem reguladores globais da expressão de genes que controlam a utilização do nitrogênio. Estes reguladores são chamados de AREA e NIT2 em *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*, respectivamente (KUDLA et al., 1990). AREA e NIT2 são reprimidos quando quantidades suficientes de amônio ou outras fontes preferenciais de nitrogênio estão disponíveis, mas quando estes estão ausentes no ambiente há a ativação de uma nova via para utilização de nitrogênio. O primeiro passo dessa via é a ligação de AREA à região GATA de promotores. Vários genes do *cluster FUM* possuem região GATA em seus promotores, além disso, fungos com AREA não funcional são incapazes de crescer e produzir fumonisinas em meio contendo nitrito. Em contraste cepas com expressão constitutiva de AREA crescem e produzem fumonisinas até mesmo em escassez de nitrogênio (KIM e WOLOSHUK, 2008).

Ainda dentre deste contexto, é importante mencionar sobre as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), as quais podem estimular a produtividade das plantas por meio de vários mecanismos. Entre esses mecanismos pode-se destacar a fixação biológica de nitrogênio, a indução de resistência sistêmica a patógenos, 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 (BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2011).

Um exemplo de BPCP bem conhecido são as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum*. A capacidade de *Azospirillum* fixar nitrogênio em gramíneas foi descrita pela pesquisadora brasileira Dra. Johanna Döbereiner. Desde então *Azospirillum* spp. têm sido empregadas como inoculante em diversas pesquisas e confirmando seus benefícios que incluem: a melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo o teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água do apoplasto, maior elasticidade da parede celular, maior produção de biomassa e maior altura de plantas

(HUNGRIA, 2011). Além disso, as BPCP podem ter atividade antagonista a fitopatógenos, inclusive a *F. verticillioides* no milho. A linhagem Ab-V5 de *A. brasilense* foi recentemente registrada no MAPA como inoculante comercial para milho, trigo e arroz (Biomax premium®), mas até o momento não existem relatos de seu efeito antagonista a *F. verticillioides* no milho.

Esta revisão da literatura demonstra que existem múltiplos fatores e complexas interações envolvidas na infecção fúngica e ocorrência de micotoxinas em alimentos, e que mais estudos são necessários para se conseguir efetivamente reduzir os níveis de micotoxinas que contaminam o milho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo analisar o efeito de diferentes práticas de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de BPCP, em diferentes genótipos de milho, sobre a incidência de *Fusarium* spp. e fumonisinas e sua influência na diversidade genética de *F. verticillioides*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos de grãos de milho, coletados na Fazenda Escola UEL, no município de Londrina-PR, e no município de Florestópolis-PR.
- Identificar morfológicamente até o nível de gênero os fungos isolados.
- Identificar molecularmente até o nível de espécie, por meio de sequenciamento de parte do gene que codifica para *TEF-1 α* , os isolados previamente identificados morfológicamente como *Fusarium* spp..
- Investigar o potencial toxigênico dos isolados pela amplificação de parte dos genes *FUM1* e *FUM8*.
- Analisar a variabilidade genética de um conjunto de isolados de *F. verticillioides* por meio da técnica de AFLP.
- Detectar e quantificar fumonisinas (FB₁ e FB₂) nos 16 tratamentos, ou seja, quatro genótipos de milho em quatro condições culturais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INFRAESTRUTURA

As análises micológicas (morfológicas e moleculares) foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular de Fungos (Centro de Ciências Biológicas, UEL).

A quantificação de fumonisinas e outras análises físico-químicas foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (Centro de Ciências Exatas, UEL).

O cultivo do milho foi conduzido em duas localidades, em uma propriedade rural na cidade de Florestópolis (Lat. 22° 51' 48" S Long. 51° 23' 14" O) e na Fazenda Escola da UEL no município de Londrina ("Lat. 23° 18' 36" S Long. 51° 09' 46"O), ambos localizados na região norte do Paraná.

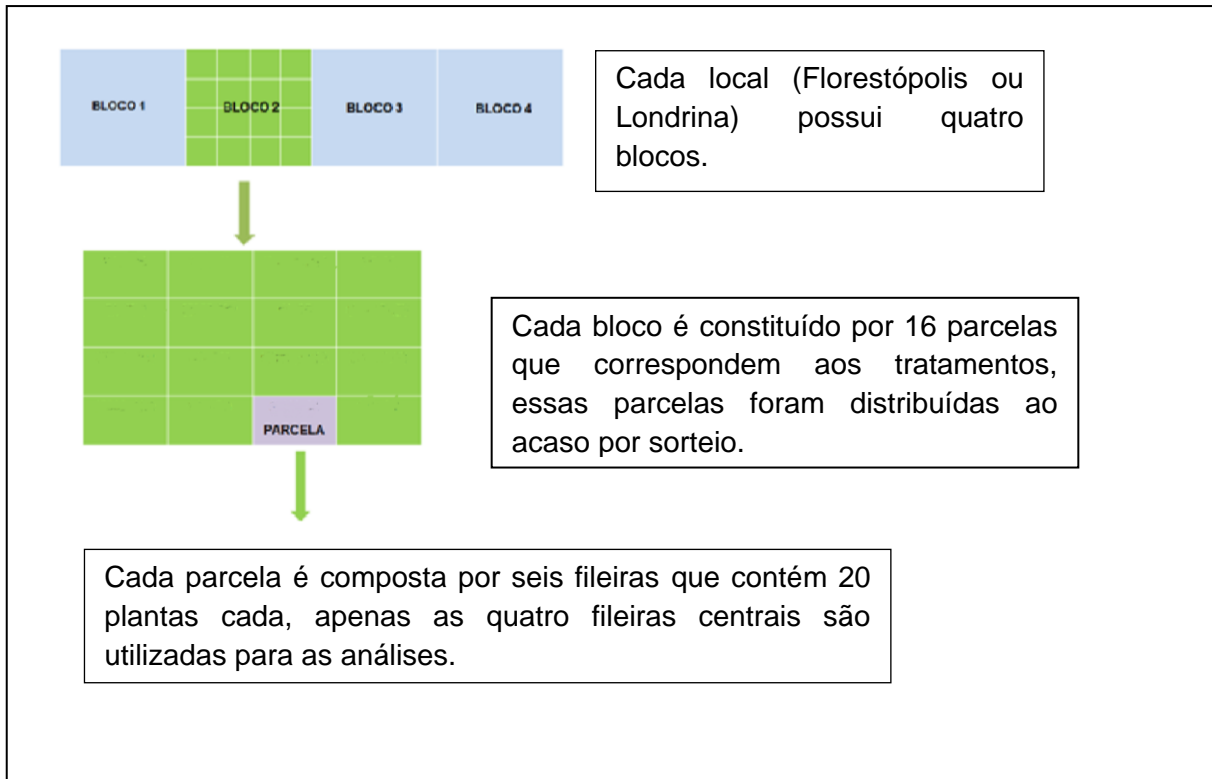
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E MATERIAL VEGETAL

O experimento foi delineado de maneira multifatorial 4x4, envolvendo a avaliação de quatro genótipos de milho em quatro tipos diferentes de fertilização nitrogenada.

Foram avaliados os seguintes genótipos de milho: a) um híbrido comercial (HC); b) duas populações sintetizadas pelo Programa de Melhoramento da UEL (ST 509 e ST 1309) e c) uma variedade crioula denominada "Caiano" (CA).

Quanto às condições de fertilização, foram avaliadas: (a) (AC) adubação completa (adubação de plantio + adubação de cobertura); (b) (AP) adubação plantio (somente adubação de plantio); (c) (IBV) inoculante Ab-V5 (adubação de plantio + inoculação com bactéria diazotrófica estirpe Ab-V5); (d) (IZM) inoculante ZM (adubação de plantio + inoculação de bactéria diazotrófica ZM).

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso (Figura 5), sendo quatro blocos (repetições) onde cada bloco continha os 16 tratamentos, cada tratamento era composto por seis fileiras de 4 m de comprimento, no espaçamento de 0,90 m entre fileiras e de 0,20 m entre as plantas, porém apenas as quatro fileiras centrais foram utilizadas para as análises.

Figura 5 - Delineamento experimental

A colheita das espigas foi realizada manualmente, ainda no campo foram analisadas algumas características de interesse agrônomo como: número de espigas danificadas, produtividade de grãos em toneladas por hectare, diâmetro da espiga, comprimento da espiga, altura da planta, produtividade de espigas e número de plantas por parcela (dados não mostrados) e foi mensurada a umidade relativa do grão com o auxílio do aparelho Multi-grain medidor de umidade portátil (Agrosystems).

A debulha das espigas foi realizada com a ajuda de um debulhador industrial, onde cada fileira foi debulhada individualmente, posteriormente os grãos das quatro fileiras que constituíam uma parcela foram misturados afim de se obter uma amostra composta diminuindo assim as chances de se utilizar grãos de uma mesma planta nas análises posteriores. Ao final se obteve uma amostra de cerca de 800 g de cada tratamento que foi acondicionada em sacos de papel a 4 °C até a sua utilização.

4.3 INOCULANTES E ADUBAÇÃO QUÍMICA

Foram utilizados como inoculantes duas estirpes bacterianas: *Azospirillum brasilense* Ab-V5 registrada no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) como inoculante comercial de milho, trigo e arroz e *Methylobacterium komagatae* ZM, bactéria promotora do crescimento de plantas (BPCP) isolada de girassol, ainda sem registro no MAPA. As bactérias foram crescidas em 250 mL de meio M15 líquido, composto por concentrações definidas de glicerol, açúcar cristal, extrato de levedura, monoidrogenofosfato de potássio e solução de micronutrientes (MARCELINO, 2012), por 48h sob agitação em incubadora orbital (130 r.p.m. a 28 °C). Após este período, os cultivos foram interrompidos e a concentração de células foi estimada por leitura em câmara de Neubauer e normalizada a uma suspensão de células na concentração de $2,5 \times 10^9$ células por mL.

Posteriormente foi realizado o preparo dos inoculantes líquidos pela mistura de concentrações definidas de polivinilpirrolidona (PVP), glicerol, extrato de levedura, goma xantana, ferro, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), sulfato de magnésio, cloreto de sódio, nitrato de amônio, solução de micronutrientes, diidrogenofosfato de potássio e monoidrogenofosfato de potássio, conforme MARCELINO (2012). A concentração final de células nas formulações inoculantes foi de 10^9 células por mL⁻¹, utilizada em volume adequado para a embebição dos substratos “germitest”. Foi realizada a inoculação direta pela mistura do inoculante (ZM ou AB-V5) com as sementes de milho, 20 mL do inoculante por kg/semente, 12 horas antes do plantio.

A adubação de plantio foi realizada pela adição ao solo de 350 kg/ha da formulação 4-14-8 (que resultou em 14 kg de Nitrogênio + 49 kg de Fósforo + 28 kg de Potássio). A adubação de cobertura se deu pela mistura de nitrogênio na proporção de 100 kg/ha.

4.4 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS

4.4.1 Extração e Purificação de Fumonisinias

Para extração de fumonisinias, uma parcela representativa de cerca de 200 g de grãos foi retirada de cada amostra e dentro dessa parcela uma alíquota de 10 g de milho foi triturada.

Ao produto triturado foram adicionados 30 mL de uma mistura metanol:água (3:1 v/v). Após repouso por 10 minutos à temperatura ambiente o material foi submetido à agitação por 30 minutos a 150 r.p.m. A suspensão foi centrifugada a 4.500 r.p.m. por 10 minutos e o sobrenadante (aprox. 1 mL) foi submetido a uma pré-limpeza em minicoluna de troca aniônica Sep-Pak acell plus QMA (Waters co., Ltda) previamente acondicionada com 6 mL de metanol:água (3:1 v/v) seguido de 3 mL de metanol. As fumonisinias foram eluídas em 10 mL de ácido acético 0,5 % em metanol, este eluato foi submetido a secagem a 45 °C e o resíduo dissolvido em 800 µL de metanol:água (3:1 v/v) seguido de fracionamento em alíquotas de 200 µL e novamente seco a fluxo de gás N₂ a 45 °C. Por fim, procedeu-se acondicionamento em freezer a -20°C para posterior quantificação de fumonisinias B1 e B2 (MORENO, 2008).

4.4.2 Quantificação de Fumonisinias por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação de fumonisinias (FB₁ e FB₂) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Shephard et al. (1990), modificado por Ueno et al. (1997). Para tanto, uma alíquota de 200 µL seca sob nitrogênio foi redissolvida em acetonitrila:água (1:1 v/v) e submetida a derivatização com 200 µL de o-ftaldilaldeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio a 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol) a mistura foi injetada em CLAE (sistema isocrático de fase reversa) consistindo de uma bomba Shimadzu LC-10AD detector de fluorescência RF-10A XL e coluna C18 nucleosil 100-5 (4,6x 250 mm Macherey-nagel GmbH e co.). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu em uma mistura de metanol: fosfato de sódio 0,1M (80:20, v/v) ajustado para pH de 3,3 com ácido ortofosfórico. O fluxo foi de 1

mL./min⁻¹ e a temperatura de forno constante de 25 °C, os limites de sensibilidade da técnica são de 50 ng/g para FB₁ e de 80 ng/g para FB₂.

4.5 ANÁLISES MICOLÓGICAS E EXTRAÇÃO DE DNA

4.5.1 Avaliação da Incidência Fúngica em Grãos de Milho

Para análise da incidência fúngica no milho os grãos foram inicialmente desinfetados superficialmente pela lavagem em solução de hipoclorito de sódio a 0,4 % por 2 minutos. Foi realizado o plaqueamento de 120 grãos por tratamento (10 grãos/placa) em ambos os locais de cultivo, totalizando 3840 grãos. As amostras foram plaqueadas em meio DG18 (ágar Dicloran Glicerol 18% com cloranfenicol). O crescimento se deu por sete dias a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C, em seguida foi determinada a incidência fúngica total através da contagem de grãos infectados por *Fusarium*. Os resultados foram expressos em percentagem de grãos infectados conforme Pitt e Hocking (2009).

Através de caracteres morfológicos (macroscópicos e microscópicos) chegou-se a uma identificação inicial dos isolados até o nível de gênero, posteriormente uma amostra representativa de isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* foi selecionada para obtenção de culturas monospóricas. Isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e os demais gêneros foram observados e identificados, mas não foram objetos deste estudo.

4.5.2 Purificação dos Isolados de *Fusarium* spp.

Para análise molecular foram selecionados ao acaso 160 isolados de *Fusarium* spp. (10 isolados de cada tratamento), sendo 80 isolados de cada local de cultivo.

Para obtenção de colônias puras, esses 160 isolados foram transferidos para meio ágar dicloran cloranfenicol peptona (DCPA) e foram incubados por cinco dias a 25 °C ± 2 °C. Após o crescimento, os isolados foram transferidos novamente para placas de petri contendo meio DCPA através da técnica de estria por esgotamento, o cultivo ocorreu por 10 dias a 25 °C ± 2 °C. Uma parte do micélio foi recortada e imersa em 1,4 mL de água estéril para estocagem e armazenamento a 4 °C.

4.5.3 Extração de DNA Genômico de *Fusarium* spp.

Para extração do DNA genômico os isolados foram inoculados em meio DCPA até apresentarem crescimento micelial e formação de conídios (cerca de 10 dias). A partir destas culturas foi preparada uma suspensão de aproximadamente 4×10^8 conídios em 60 μ L de Tween 80 e adicionou-se 100 mg de microesferas de sílica (0,1mm), essa mistura foi macerada com o auxílio do aparelho L- Beader3® (Loccus Biotecnologia).

A extração do DNA genômico foi feita utilizando o kit de extração Biopur extração mini spin DNA genômico® (Biometrix) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

A quantificação do DNA foi inicialmente determinada por método espectrofotométrico, em NanoDrop® (Thermo Scientific), e posteriormente a quantidade de DNA foi confirmada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), através da comparação da fluorescência sob luz UV entre as bandas de DNA obtidas e uma amostra de DNA de concentração já conhecida. Após a quantificação as amostras foram armazenadas a -20 °C, onde permaneceram até o momento do uso.

4.6 ANÁLISE DE AFLP "AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM" EM *FUSARIUM* SPP.

4.6.1 Restrição do DNA Genômico

A análise de AFLP foi realizada segundo Vos et al. (1995) com adaptações, onde 250 ng de DNA genômico foram submetidos a uma dupla digestão com enzimas de restrição, utilizando 2 μ L de tampão 10x *One Phor All* Amersham®, 0,2 μ L de BSA 100x N.E. Biolabs®, 5 U da enzima *MseI* (N.E. Biolabs®) (corte frequente), 5 U da enzima *EcoRI* (N.E. Biolabs®) (corte raro) e água ultrapura esterilizada para completar o volume final de 20 μ L. Os tubos foram mantidos por 12 horas a 37 °C e, em seguida, por 20 minutos a 65 °C, para inativação das enzimas. Para confirmação do êxito desta etapa foi realizada uma eletroforese do produto da digestão em gel de agarose a 1% que foi corado em brometo de etídio e fotografado sob luz UV.

4.6.2 Ligação de Adaptadores

Ao término da digestão, os fragmentos foram ligados a adaptadores complementares aos sítios de corte *EcoRI* e *MseI*. Para etapa de ligação os fragmentos obtidos foram ligados aos adaptadores de *EcoRI* $0,5 \mu\text{M L}^{-1}$ e *MseI* $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$, com a enzima T4 DNA ligase 1U; tampão T4 DNA ligase 1X; NaCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$; BSA $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e DTT $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ em um volume final de $10 \mu\text{L}$. A reação foi incubada por 3 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, seguido de 30 minutos a $17 \text{ }^\circ\text{C}$ e finalmente 10 minutos a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ em termociclador. O produto final dessa reação foi diluído com água ultrapura na proporção de 1:3.

4.6.3 Pré-Amplificação

O produto da ligação já diluído serviu como molde para etapa de pré-amplificação. Os fragmentos ligados foram amplificados com um par de *primers* pré-seletivo contendo uma base seletiva. A amplificação foi realizada num volume final de $10 \mu\text{L}$, utilizando $3,5 \mu\text{L}$ do kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada *primer* pré-seletivo, $2,92 \mu\text{L}$ de água ultrapura e $3,0 \mu\text{L}$ da diluição da reação de restrição/ligação. Essa amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) sob a seguinte programação: ciclo inicial de 2 minutos a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ seguido de 20 ciclos de 1 segundo a $90 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 segundos a $56 \text{ }^\circ\text{C}$ e 2 minutos a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ e por fim, 30 minutos a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.6.4 Amplificação Seletiva

Em seguida foram realizadas as reações de amplificação seletiva compostas de $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada *primer* seletivo de *MseI* e *EcoRI*; $3,5 \mu\text{L}$ GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); e $3 \mu\text{L}$ do DNA pré-amplificado diluído (1:8) com água ultrapura, para um volume final de $10 \mu\text{L}$. Para a amplificação seletiva foram testados seis combinações de *primers EcoR1* e *Mse1* contendo dois ou mais nucleotídeos seletivos (E-AAT/M-CA, E-AAC/M-CA, E-AGC/M-CA, E-AAC/M-CAT, E-ACA/M-CAT, E-AAC/M-CTT), as reações de amplificação seletiva foram conduzidas sob a seguinte programação: ciclo inicial de 2 minutos a $94 \text{ }^\circ\text{C}$; 30 segundos a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e 2 minutos a 72

°C; 8 ciclos de 1 segundo a 94 °C, 30 segundos a 64 °C e 2 minutos a 72 °C; 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.

Ao final da reação foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida para seleção das combinações de *primers* que resultaram em maiores polimorfismos, entre as seis combinações testadas foram selecionadas três (E-AAT/M-CA, E-AAC/M-CA, E-AGC/M-CA) para serem submetidas à eletroforese capilar em sistema automatizado. Para resolução dos produtos de PCR obtidos da reação seletiva o conjunto de amostras amplificadas com *primers* marcados com os fluoróforos FAM (azul), HEX (verde), NED (amarelo) foram combinados na seguinte proporção: 1 µL de FAM: 2 µL de HEX: 2 µL de NED com 5,0 µL de água ultrapura, desta mistura 1,0 µL foi adicionado a 0,2 µL de *size standard* 500 ROX (Applied Biosystems) e 8,8 µL de formamida Hi-Di. Em seguida, foram desnaturados a 95 °C por 3 minutos, imediatamente resfriados em um banho de gelo por alguns minutos e submetidos à eletroforese capilar pelo sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems). Os resultados da eletroforese dos fragmentos foram combinados em uma matriz binária pelo software GeneMapper® v.4.1 (Applied Biosystems). O loco de AFLP foi considerado polimórfico quando um produto de amplificação esteve presente em alguns indivíduos e ausente em outros, por outro lado, o loco de AFLP foi considerado monomórfico quando estava presente em todos os indivíduos analisados. Os fragmentos foram pontuados como "1" para presença da banda e "0" para ausência da banda.

4.6.5 Análises Estatísticas dos Dados de AFLP

Para evitar a subestimação da similaridade genética entre os indivíduos foram utilizados todos os fragmentos sendo estes polimórficos ou monomórficos.

A partir da matriz binária dos dados de AFLP foi realizada uma análise de agrupamento através da construção de um dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA. As frequências alélicas do conjunto de isolados de *F. verticillioides* (n=157) foram estimadas e submetidas à Análise de Variância Molecular (AMOVA). Os programas computacionais utilizados

foram NTSYS-pc 2.2 (ROHLF, 2000) e Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010).

Também foi realizada uma avaliação da estrutura populacional através de um teste de atribuição de indivíduos a grupos (k), onde 157 isolados de *F. verticillioides* estimados de um a oito grupos (isolados de CA, HC, V1 e V2 nos dois locais) foram analisados com 100.000 repetições através do programa Structure Versão 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). Para interpretação dos dados foi utilizado a estatística ΔK (EVANNO et al., 2005) embutida na plataforma virtual Structure Harvester (EARL e VON HOLDT, 2012).

A fim de se ilustrar melhor o nível da diversidade genética entre os isolados foi realizada, através do programa FAMD (SCHULUTER e HARRIS, 2006), uma análise de coordenadas principais (PCoA), onde os isolados são representados por pontos no plano cartesiano.

4.7 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE PCR

4.7.1 Amplificação de Fragmento do gene *TEF-1 α*

Buscando a identificação das espécies a nível molecular 67 isolados foram selecionados com base na análise de agrupamento obtida pelos dados de AFLP. A seleção foi feita de maneira que os isolados representassem satisfatoriamente os grupos formados no dendrograma.

O DNA dos isolados escolhidos foram submetidos à amplificação utilizando o par de *primers* TEF-1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') e TEF-2 (5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATZCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998) que amplificam parte do gene *TEF-1 α* que codifica para o fator de alongamento da tradução. A amplificação foi realizada segundo o protocolo de Watanabe et al. (2011), sob os seguintes parâmetros: a reação foi composta em um volume final de 25 μ L que continha: 2,5 μ L de 10X tampão de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,2 mmol L⁻¹ de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,4 μ mol L⁻¹ de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2,0 mmol L⁻¹ de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA)

e 10 ng de DNA genômico. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos compostos por 40 segundos de desnaturação a 95°C, 35 segundos a 60°C para o anelamento e 40 segundos a 72°C para extensão, seguida de uma extensão final de cinco minutos a 72°C, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. DNA Ladder 1 kb Plus® (Invitrogen Life Technologies, USA) foi utilizado como padrão de tamanho para os produtos da PCR.

Os produtos da amplificação foram purificados através do uso do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) segundo protocolo do fabricante. Os fragmentos purificados foram submetidos ao sequenciamento pelo método de terminação de cadeia descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977).

4.7.2 Reação de Sequenciamento Parcial do gene *TEF-1α* de *Fusarium* spp.

As reações de sequenciamento foram realizadas com volume final de 10µL, cada uma destas contendo: 1µL de tampão, 1 µL de *primer forward* ou *reverse* (10 pmol/ µL), 2 µL de DNA (20 ng/µL), 2 µL do Kit BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) e 4 µL de água ultrapura para completar o volume da reação. Esta foi submetida ao termociclador VERITI® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), previamente programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por um minuto, seguido de 30 ciclos compostos por 20 segundos de desnaturação a 95°C, 15 segundos a 50°C para o anelamento e um minuto a 60°C para extensão, seguida de uma extensão final de um minuto e 30 segundos a 60°C.

A purificação da reação foi realizada adicionando-se 1:10 do volume de acetato de amônio 7,5 mol L⁻¹ e 27,5 µL de etanol absoluto. O material foi mantido a temperatura de -20°C por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 3.220 r.p.m., por 45 minutos, a 20°C. Ao precipitado resultante foram adicionados 130 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 3.220 r.p.m., por 15 minutos, a 20°C. Subsequentemente, foram acrescentados 0,2 µL de acetato de amônio 7,5 mol L⁻¹ e 80

μL de isopropanol 80%, mantendo a placa por 10 minutos a 25°C, seguido de centrifugação a 3.220 r.p.m., 20°C por 40 minutos. Logo após 80 μL de álcool 70% foram adicionados ao precipitado seguido de nova etapa de centrifugação a 3.220 r.p.m., por 15 minutos a 20°C. Após a secagem do precipitado o material foi ressuspenso em 10 μL de formamida, e em seguida a placa foi submetida ao analisador genético ABI 3500XL (Applied Biosystems,USA).

4.7.3 Alinhamento e Análises Filogenéticas

A análise da qualidade das sequências foi visualizada através do eletroferograma com o auxílio do programa Bioedit 7.2.5 e pela nota obtida através do algoritmo de PHRED calculada na plataforma virtual Electropherogram Quality Analysis (TOGAWA e BRIGITO, 2003). Em seguida as sequências foram comparadas por alinhamento local com as sequências já depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através da ferramenta BLAST nucleotide (ALTSCHUL et al., 1990). A edição e alinhamento múltiplo das sequências foram conduzidos através do programa Bioedit 7.2.5 e *ClustalW* embutido no pacote computacional MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2011).

Foi realizado a Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as sequências utilizando o programa Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010) com vistas a avaliar o grau de diferenciação e estruturação das populações, somado a isso foi feita a análise de haplótipos utilizando o programa DnaSP 5.10.01 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

Foi realizada a construção de uma árvore filogenética utilizando o método *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de bootstrap com 1.000 repetições utilizando o programa MEGA 6.0. Nesta análise de agrupamento foram utilizados os representantes dos haplótipos identificados e mais três indivíduos que haviam sido identificados pelo BLAST como outras espécies que não *F. verticillioides*.

4.7.4 Investigação do Potencial Toxigênico dos Isolados

Para investigar o potencial para produção de fumonisinas, um total de 160 isolados de *Fusarium* spp. foram submetidos a uma multiplex PCR utilizando-se *primers*

específicos para identificação dos genes *FUM1* e *FUM8*, ambos essenciais na síntese das fumonisinas. Os pares de *primers* utilizados foram descritos por Proctor et al. (2004): *FUM1* (F-5'- ACAAGTGTCTTGGGGTCCAGG-3') e (R-5'- GATGCTCTTGGGAAGTGGCCTACG-3') e *FUM8* (F-5'- CGTAGTAGGAATGAGAAGGATG-3') e (R-5'- GCAAGCTTTGTGGCTGATTGTC).

A amplificação foi realizada segundo o protocolo de Wang et al. (2010), sob os seguintes parâmetros: a reação foi composta em um volume final de 25 µL que continha: 2,5 µL de 10X tampão de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA), 1,0 mmol L⁻¹ de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,2 umol L⁻¹ de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2,0 mmol L⁻¹ de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA) e 10 ng de DNA genômico. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos compostos por um minuto de desnaturação a 94°C, 45 segundos a 55°C para o anelamento e um minuto a 72°C para extensão, seguida de uma extensão final de 10 minutos a 72°C, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. DNA Ladder 1 kb Plus® (Invitrogen Life Technologies, USA) foi utilizado como padrão de tamanho para os produtos da PCR.

Amostras que se apresentaram negativas foram submetidas á um controle externo de reação, PCR do gene *TEF-1α* (Item 4.7.1), a onde o DNA foi avaliado quanto á sua capacidade de ser amplificado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados sob a forma de artigo científico intitulado "Incidence of fumonisins and *Fusarium* spp. in grains harvested from four maize genotypes grown under distinct nitrogen fertilizer conditions" a ser enviado para publicação em periódico a ser definido.

Incidence of fumonisins and *Fusarium* spp. in grains harvested from four maize genotypes grown under distinct nitrogen fertilizer conditions.

Josué José da Silva

Universidade Estadual de Londrina

Resumo

Este trabalho teve por objetivo analisar a presença de fumonisinas e incidência de *Fusarium* spp. em grãos recém-colhidos de diferentes genótipos de milho, cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento de plantas. O experimento foi realizado no verão de 2012, em Londrina e Florestópolis, ambas localizados no estado do Paraná, Brasil, região de grande importância para a produção de grãos de milho. Em cada local foi realizado um experimento multifatorial 4x4, sendo avaliados quatro genótipos de milho: um híbrido comercial transgênico, duas variedades sintetizadas pelo Programa de Melhoramento da Universidade Estadual de Londrina, e uma variedade crioula denominada “Caiano” e quatro diferentes condições de fertilização nitrogenada: adubação de plantio, adubação de plantio e de cobertura, adubação de plantio e uso de inoculante contendo *Azospirillum brasilense*, adubação de plantio e uso de inoculante contendo *Methylobacterium komagatae* em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições. Fumonisinas B1 e B2 foram detectadas em todos os tratamentos, em ambos locais de cultivo, com níveis variando de 0,4 a 9,1 µg/g. Um total de seis amostras apresentaram níveis de fumonisinas totais superiores ao limite máximo tolerável pela legislação brasileira (5 µg/g). Dentre os 3.840 grãos analisados, 77% estava infectado com *Fusarium* spp. Não foi detectada influência das diferentes condições de fertilização nitrogenada sobre a incidência de *Fusarium* spp. e nível de fumonisinas. O percentual de grãos infectados e níveis de fumonisinas foram estatisticamente diferentes entre os genótipos de milho. Em ambos os locais de cultivo, o híbrido comercial apresentou maior percentual médio de grãos infectados (84,37%)

por *Fusarium* spp. e maior quantidade de fumonisinas (de 3,5 a 9,1 µg/g). Um total de 160 isolados de *Fusarium* spp. foi isolado e submetido a análises moleculares, as quais revelaram a presença de *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, e preponderantemente *F. verticillioides*. Os marcadores de AFLP revelaram a existência de diferenciação genética significativa entre as populações fúngicas obtidas nos dois locais de cultivo. Os dados de AFLP mostraram, ainda, que a distribuição da diversidade genética de *F. verticillioides* ocorreu de maneira diferenciada entre os genótipos de milho dos quais foram isolados. A diversidade genética de *F. verticillioides* foi analisada por meio de 709 marcadores de AFLP. Os resultados revelaram alta diversidade genética para *F. verticillioides* e diferenças na estrutura genética das populações provenientes dos diferentes genótipos de milho e local. Produtos de amplificação obtidos por PCR revelaram que a maioria dos isolados de *Fusarium* spp. (95%) contém os genes *FUM1* e *FUM8*, o que indica elevado potencial toxigênico deste gênero nos campos analisados no presente trabalho.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*, *Fusarium* spp., fumonisinas, milho, AFLP

Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de grãos de milho (USDA 2014). A boa posição brasileira no ranking mundial se deve, em parte, à adoção da tecnologia de produção de híbridos associada à transgenia que ocorreu a partir de safra de 2007/2008. Atualmente, cerca de 460 cultivares de milho estão disponíveis no mercado brasileiro, sendo que 250 são cultivares transgênicas, especialmente resistentes a insetos da ordem lepidóptera (Cruz, Filho and Queiroz 2014). A produção da safra 2013/2014 ultrapassou a 80 milhões de toneladas de grãos, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China (Ranum et al. 2014). Apesar deste cenário favorável a produção, a contaminação de grãos com micotoxinas tem sido uma importante preocupação dos envolvidos no agronegócio do milho. Ademais, esta preocupação também deveria assolar a agricultura familiar brasileira que tem o milho como um dos principais cultivos para a subsistência ou venda local. Em geral, estes agricultores cultivam variedades convencionais ou crioulas e evitam o uso de insumos agrícolas externos à propriedade.

Dentre as micotoxinas, a classe das fumonisinas é indubitavelmente a mais relevante para a cultura do milho. Até o momento, já foram caracterizados 28 análogos de fumonisinas, sendo que as fumonisinas B1 (FB₁) e B2 (FB₂) são as mais tóxicas e podem ocorrer em grandes quantidades no milho (Alizadeh et al. 2012, Bryla et al. 2013). A ocorrência de FB₁ e FB₂ em milho e produtos à base de milho produzidos no Brasil tem sido reportada por vários autores (Almeida et al. 2000, Camargos et al. 2000, Hirooka et al. 1996, Lanza et al. 2014, Ono et al. 2008, Queiroz et al. 2012, Scussel et al. 2013, van der Westhuizen et al. 2003, Vargas et al. 2001, dentre outros). Devido aos diversos agravos que as fumonisinas podem causar à saúde animal e humana (Bermudez et al. 1995, Casteel et al. 1994, Marasas et al. 1988, Miller 2001, Wang et al. 1991), o Brasil, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceu limites máximos tolerados (LMT) de fumonisinas em grãos de milho. Segundo a legislação (Anvisa 2011), a partir de janeiro de 2017, o limite máximo tolerável para fumonisinas (FB₁ + FB₂) em grãos de milho será de 5 µg/g.

Dentre as principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de fumonisinas destacam-se *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, ambas frequentemente encontradas em milho. A necessidade de cumprir a referida deliberação da Anvisa tem estimulado as investigações a campo visando estabelecer estratégias para mitigar as consequências da fusariose na cultura do milho.

A infecção por *Fusarium* spp. e a ocorrência de fumonisinas em milho podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como: temperatura, disponibilidade de água, danos causados por insetos, virulência das cepas fúngicas, composição química do grão, inóculo inicial, interação planta-patógeno, interações e competições entre a microbiota, fatores genéticos intrínsecos a cada planta e práticas culturais (Arias et al. 2012, Marin et al. 2013). Dentre as práticas culturais, a rotação de culturas tem se mostrado eficaz na redução de *Fusarium* spp. em milho e, conseqüentemente, na redução de fumonisinas (Abbas et al. 2004, Jaime-Garcia and Cotty 2010). A fertilização nitrogenada, quantidade e forma de aplicação, é outro tipo de manejo que influencia na incidência e quantidade de micotoxinas (Blandino et al. 2008, Abbas et al. 2009).

Com vistas a outros objetivos que não o controle de micotoxinas, o Brasil tem tentado aprimorar a tecnologia de inoculação de gramíneas, incluindo o milho, com Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP). Estas bactérias beneficiam o crescimento das plantas pela combinação de diversos mecanismos, incluindo a capacidade de fixação biológica de nitrogênio e de atuarem como agentes de controle biológico de patógenos (Hungria 2011). Pelo conhecimento que se tem até então, não existe informação sobre o efeito dos inoculantes contendo BPCP sobre a incidência de *Fusarium* spp. e fumonisinas em milho no campo.

Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo analisar a presença de fumonisinas e incidência de *Fusarium* spp. em diferentes genótipos de milho, incluindo variedades convencionais, crioula e híbrido transgênico *Bt*, cultivados sob diferentes condições de fertilização nitrogenada, incluindo o uso de BPCP. Além disso, também se constituiu objetivo deste trabalho analisar a diversidade genética dos isolados de *Fusarium* spp. por meio de AFLP, sequências de nucleotídeos do gene *TEF-1 α* e PCR específica para os genes *FUM1* e *FUM8*.

Material e métodos

Experimento em campo e amostragem

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, sendo avaliados quatro genótipos de milho e quatro tipos diferentes de fertilização nitrogenada em blocos completamente casualizados com quatro repetições. Cada bloco foi composto por 16 parcelas de seis fileiras de 4 m de comprimento, no espaçamento de 0,90 m entre fileiras e de 0,20 m entre as plantas. Apenas as quatro fileiras centrais foram utilizadas para as análises de incidência de infecção por *Fusarium* e contaminação com fumonisinas. As demais fileiras foram utilizadas como fronteiras.

Foram avaliados os seguintes genótipos de milho: a) um híbrido comercial que faz uso da tecnologia *Bt* (HC); b) duas variedades sintetizadas pelo Programa de Melhoramento da Universidade Estadual de Londrina, ST 509 (V1) e ST 1309 (V2) e c) uma variedade crioula denominada "Caiano" (CA).

Quanto às condições de fertilização, foram avaliadas: a) (AP) adubação de plantio (somente adubação de plantio); b) (AC) adubação completa (adubação de plantio + adubação de cobertura, sem inoculação); c) (IBV) inoculante comercial Ab-V5 registrado do MAPA que contém bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* (adubação de plantio + inoculação); d) (IZM) inoculante ZM que contém uma bactéria promotora do crescimento em plantas (BPCP) isolada de girassol da espécie *Methylobacterium komagatae* (adubação de plantio + inoculação). A adubação mineral de plantio foi feita com 350 kg/ha de formulação 4-14-8 NPK (fornecendo 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.

Inoculação dos grãos com BPCP

As estirpes bacterianas foram cultivadas em 250 mL de meio M15 líquido (composição em processo de patente) por 48h sob agitação em incubadora orbital (130 r.p.m. 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 do inoculantes foi misturado com 1 kg de sementes de milho, 12 horas antes do plantio.

Extração, purificação e quantificação de fumonisinas por CLAE

Para determinação de fumonisinas FB₁ e FB₂ por CLAE, uma parcela representativa de cerca de 200 g foi retirada de cada amostra e dentro dessa parcela uma alíquota de 10 g de milho foi triturada para extração e purificação segundo Moreno (2008). Por fim, o eluato de fumonisinas purificadas foi armazenado em freezer a -20°C para posterior quantificação.

A quantificação FB₁ e FB₂ foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Shephard et al. (1990) modificado por Ueno et al. (1997). Os limites de sensibilidade da técnica foram de 0,05 µg/g para FB₁ e de 0,08 µg/g para FB₂.

Incidência fúngica em grãos de milho

Para análise da incidência fúngica no milho os grãos foram inicialmente desinfetados superficialmente pela lavagem em solução de hipoclorito de sódio a 0,4 % por 2 minutos. Foi realizado o plaqueamento de 120 grãos por tratamento (10 grãos/placa) em ambos os locais de cultivo, totalizando 3840 grãos. As amostras foram plaqueadas em meio DG18 (ágar Dicloran Glicerol 18% com cloranfenicol). As placas

foram incubadas por sete dias a 25 °C. A percentagem de grãos infectados foi determinada conforme Pitt and Hocking (2009).

Extração de DNA

Um total de 160 isolados de *Fusarium* spp. (10 isolados de cada tratamento), sendo 80 isolados de cada local de cultivo, foram selecionados ao acaso e crescidos em meio DCPA até a obtenção de colônias monospóricas puras, livres de qualquer contaminação.

A extração de DNA genômico foi feita utilizando o Kit Biopur extração mini spin DNA genômico (Biometrix, Curitiba, Brasil) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

Análise de AFLP

A análise de AFLP foi realizada segundo Vos et al. (1995) com adaptações, onde 250 ng de DNA genômico foram submetidos a uma dupla clivagem com enzimas de restrição, utilizando 2 µL de tampão 10x *One Phor All* Amersham®, 0,2 µL de BSA 100x N.E. Biolabs®, 5 U da enzima *MseI* (N.E. Biolabs®) (corte frequente) e 5 U da enzima *EcoRI* (N.E. Biolabs®) (corte raro) em um volume final de 20 µL. Os tubos foram mantidos por 12 horas a 37 °C e, em seguida, por 20 minutos a 65 °C, para inativação das enzimas. Para etapa de ligação, os fragmentos obtidos foram ligados aos adaptadores de *EcoRI* 0,5 µM L⁻¹ e *MseI* 0,25 µmol L⁻¹, com a enzima T4 DNA ligase 1U; tampão T4 DNA ligase 1X; NaCl 0,05 mol L⁻¹; BSA 50 ng/µL; DTT 0,25 mmol L⁻¹ em um volume final de 10 µL. A reação foi incubada por 3 horas a 37 °C, 30 minutos a 17 °C e por 10 minutos a 70°C em termociclador. O produto da ligação foi diluído (1:3) com água ultrapura e serviu como molde para etapa de pré-amplificação. Os fragmentos ligados foram pré-amplificados com um par de *primers* contendo uma base seletiva. A amplificação foi realizada num volume final de 10 µL, utilizando 3,5 µL do kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); 3,7 µmol L⁻¹ de cada *primer* pré-seletivo, 2,92 µL de água ultrapura e 3,0 µL da diluição da reação de restrição/ligação. Essa amplificação foi

realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) sob a seguinte programação: ciclo inicial de 2 minutos a 72 °C seguido de 20 ciclos de 1 segundo a 90 °C, 30 segundos a 56 °C e 2 minutos a 72 °C e por fim, 30 minutos a 60 °C.

Em seguida foram realizadas as reações de amplificação seletiva compostas de 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada *primer* acrescido de dois ou mais nucleotídeos seletivos; 3,5 μL GoTaq® *Green Master Mix* (Promega); e 3 μL do DNA pré-amplificado diluído (1:8) com água ultrapura, para um volume final de 10 μL . Para a amplificação seletiva foram testados seis combinações de *primers EcoR1* e *Mse1* contendo variados nucleotídeos seletivos (E-AAT/M-CA, E-AAC/M-CA, E-AGC/M-CA, E-AAC/M-CAT, E-ACA/M-CAT, E-AAC/M-CTT), as reações de amplificação seletiva foram conduzidas sob a seguinte 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 64 °C e 2 minutos a 72 °C; 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.

Um volume de 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 no analisador genético ABI3500XL® (Applied Biosystems, Austin, USA).

O loco de AFLP foi considerado polimórfico quando um produto de amplificação esteve presente em alguns indivíduos e ausente em outros, por outro lado, o loco de AFLP foi considerado monomórfico quando estava presente em todos os indivíduos analisados. Os fragmentos foram pontuados como "1" para presença da banda e "0" para ausência da banda.

Análise dos dados de AFLP

Para evitar a subestimação da similaridade genética entre os indivíduos foram utilizados todos os fragmentos sendo estes polimórficos ou monomórficos.

A partir da matriz binária dos dados de AFLP foi realizada uma análise de agrupamento através da construção de um dendrograma utilizando o coeficiente de

similaridade de Jaccard pelo método de agrupamento UPGMA. As frequências alélicas do conjunto de isolados de *F. verticillioides* (n=157) foram estimadas e submetidas à Análise de Variância Molecular (AMOVA). Os programas computacionais utilizados foram NTSYS-pc 2.2 (Rohlf 2000) e Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier and Lischer 2010).

Também foi realizada uma avaliação da estrutura populacional através de um teste de atribuição de indivíduos a grupos (k), onde 157 isolados de *F. verticillioides* estimados de um a oito grupos (isolados de CA, HC, V1 e V2 nos dois locais) foram analisados com 100.000 repetições através do programa Structure Versão 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Para interpretação dos dados foi utilizado a estatística ΔK (Evanno et al. 2005) embutida na plataforma virtual Structure Harvester (Earl and vonHoldt 2012).

A fim de se ilustrar melhor o nível da diversidade genética entre os isolados foi realizado, através do programa FAMD (Schuluter and Harris 2006), uma análise de coordenadas principais (PCoA), onde os isolados são representados por pontos no plano cartesiano.

Análise da sequência de nucleotídeos de parte do gene *TEF-1 α*

Para a identificação molecular foi realizada a amplificação de parte do gene que codifica para o fator de alongamento da tradução (*TEF-1 α*), utilizando o par de *primers* EF-1 (5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') e EF-2 (5'-GGA(G/ A)GTACCAGT(G/ C)ATZCATGTT-3') descritos por O'Donnell et al. (1998). A amplificação foi realizada segundo o protocolo de Watanabe et al. (2011), sob os seguintes parâmetros: a reação foi composta em um volume final de 25 μL que continha: 2,5 μL de 10X tampão de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,2 mmol L^{-1} de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2,0 mmol L^{-1} de MgCl_2 (Invitrogen Life Technologies, USA), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA) e 10 ng de DNA genômico. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) programado para um ciclo inicial

de desnaturação a 95 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos compostos por 40 segundos de desnaturação a 95 °C, 35 segundos a 60 °C para o anelamento e 40 segundos a 72 °C para extensão, seguida de uma extensão final de cinco minutos a 72 °C, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. DNA Ladder 1 kb Plus® (Invitrogen Life Technologies, USA) foi utilizado como padrão de tamanho para os produtos da PCR.

Os produtos da amplificação foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) segundo protocolo do fabricante. Os amplicons purificados foram submetidos ao sequenciamento utilizando o kit BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing® (Applied Biosystems, Austin, USA) no analisador genético ABI3500XL® (Applied Biosystems, Austin, USA) pelo método de terminação de cadeia descrito por Sanger et al. (1977).

A análise da qualidade das sequências foi visualizada através do eletroferograma com o auxílio do programa Bioedit 7.2.5 e pela nota obtida através do algoritmo de PHRED calculada na plataforma virtual Electropherogram quality analysis (Togawa and Brigito 2003). As sequências foram comparadas por alinhamento local com as sequências já depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) através da ferramenta BLAST nucleotide (Altschul et al. 1990), a edição e alinhamento múltiplo das sequências foram conduzidos através do programa Bioedit 7.2.5 e *ClustalW* embutido no pacote computacional MEGA 6.0 (Tamura et al. 2011).

Para analisar o grau de diferenciação e estruturação das populações, uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada utilizando-se do programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier and Lischer 2010). Para a identificação de haplótipos o programa DnaSP 5.10.01 (Librado and Rozas 2009) foi utilizado.

Com representantes dos haplótipos identificados e mais três isolados que haviam sido identificados pelo BLAST como outras espécies que não *F. verticillioides*, uma árvore filogenética foi inferida utilizando o método *Neighbor-Joining* (NJ) utilizando o programa MEGA 6.0.

Investigação do potencial toxigênico dos isolados

Para investigar o potencial para produção de fumonisinas, um total de 160 isolados de *Fusarium* spp. foram submetidos a uma multiplex PCR utilizando-se *primers* específicos para identificação dos genes *FUM1* e *FUM8*, ambos essenciais na síntese das fumonisinas. Os pares de *primers* utilizados foram descritos por Proctor et al. (2004): *FUM1* (F-5'- ACAAGTGTCTTGGGGTCCAGG-3') e (R-5'- GATGCTCTTGGGAAGTGGCCTACG-3') e *FUM8* (F-5'- CGTAGTAGGAATGAGAAGGATG-3') e (R-5'- GCAAGCTTTGTGGCTGATTGTC).

A amplificação foi realizada segundo o protocolo de Wang et al. (2010), sob os seguintes parâmetros: a reação foi composta em um volume final de 25 μ L que continha: 2,5 μ L de 10X tampão de PCR (Invitrogen Life Technologies, USA), 1,0 mmol L⁻¹ de dNTP (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,2 μ mol L⁻¹ de cada um dos respectivos *primers* (Invitrogen, Life Technologies, USA), 2,0 mmol L⁻¹ de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, USA), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, USA) e 10 ng de DNA genômico. Uma reação controle foi realizada a partir da substituição de DNA genômico por água ultrapura. As reações foram submetidas a um termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos compostos por um minuto de desnaturação a 94 °C, 45 segundos a 55 °C para o anelamento e um minuto a 72 °C para extensão, seguida de uma extensão final de 10 minutos a 72 °C, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e fotografado sob luz UV. DNA Ladder 1 kb Plus® (Invitrogen Life Technologies, USA) foi utilizado como padrão de tamanho para os produtos da PCR.

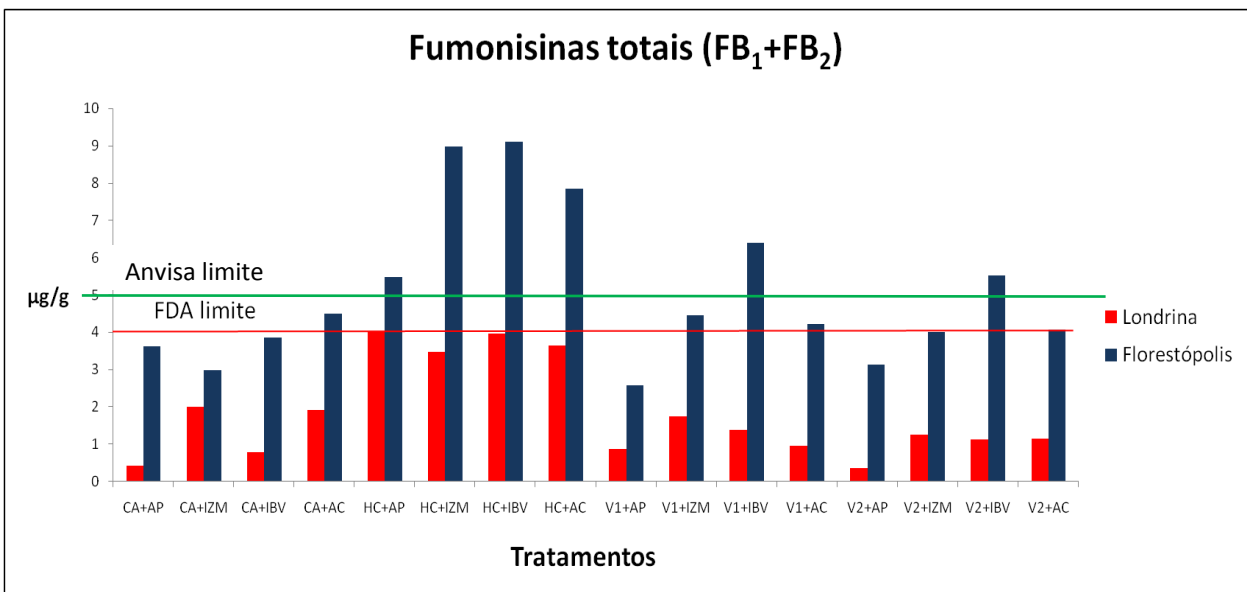
Amostras que se apresentaram negativas foram submetidas á um controle externo de reação, PCR do gene *TEF-1 α* (p.62), a onde o DNA foi avaliado quanto á sua capacidade de ser amplificado.

Resultados e discussão

Contaminação com fumonisinas e incidência de *Fusarium* spp.

Fumonisinias B1 e B2 foram detectadas em todos os 16 tratamentos, em ambos locais de cultivo avaliados (Figura 1), com níveis variando de 0,4 a 9,1 µg/g. Um total de seis amostras apresentaram níveis superiores ao limite máximo tolerável de 5 µg/g estabelecido pela ANVISA e 10 amostras seriam preteridas segundo o regime da FDA que estabelece o limite de 4 µg/g. Níveis semelhantes de contaminação por fumonisinas em grãos de milho, produzido no Brasil, já foram relatados por diversos autores (Ono et al. 2006, Oliveira et al. 2006, Queiroz et al. 2012, Scussel et al. 2013).

Figura 1. Gráfico da contaminação por fumonisinas totais (FB₁+FB₂) nos 16 tratamentos em Londrina e Florestópolis.



A quantidade de fumonisinas detectada diferiu estatisticamente ($p < 0,01$) entre os dois locais de cultivo e entre os genótipos de milho. As amostras cultivadas em Florestópolis-Paraná, em ambiente de agricultura familiar, apresentaram-se mais contaminadas com fumonisinas (2,57 a 9,11 µg/g, média de 5,05 µg/g) do que as

amostras cultivadas em Londrina-Paraná, em uma Fazenda Escola de Agronomia (0,4 a 4,02 µg/g, média de 1,81 µg/g) (Tabela 1).

A diferença observada nos níveis de contaminação entre os locais de cultivo pode ser resultante de fatores ambientais como o clima e condições de solo que influenciam a produção de fumonisinas no milho. Outro fator importante que pode se entropor à discussão é a possibilidade de que as populações fúngicas sejam geneticamente distintas nos dois locais, exibindo perfis infectivos e micotoxicológicos diferentes (Covarelli et al. 2012).

É válido ressaltar que o experimento em Florestópolis foi realizado em ambiente de agricultura familiar o que não ocorreu no experimento de Londrina, e por conta disso houve diferenças nas práticas culturais, por exemplo: em Londrina ocorreu rotação de culturas, onde anteriormente ocorreu o plantio de trigo, o mesmo não aconteceu no campo de Florestópolis que foi caracterizado pela monocultura do milho.

Jaime-Garcia e Cotty (2010) investigaram o papel da rotação de culturas na redução da incidência de *Aspergillus flavus* no solo e observaram que a incidência desta espécie foi significativamente influenciada por esta prática. O efeito da rotação de culturas sob os fungos do gênero *Fusarium* também foi avaliado em por Hwang et al. (2009), em canola. Os autores concluíram que a diversificação das culturas pode reduzir a incidência deste gênero no solo.

A rotação de culturas favorece o manejo integrado de pragas e fitopatógenos, reduzindo o inóculo inicial (Reid, Zhu and Ma, 2001), podendo assim impactar na incidência fúngica e conseqüentemente na contaminação por micotoxinas.

Interessantemente, a comparação das médias das quantidades de fumonisinas detectadas nos diferentes genótipos de milho mostrou que o híbrido comercial, em ambos os locais, apresentava níveis de fumonisinas significativamente superiores àqueles detectados nas variedades de milho estudadas neste trabalho. Esta diferença no conteúdo de fumonisinas entre os genótipos de milho pode ser decorrente de características genéticas intrínsecas a esses materiais o que resulta em interações singulares entre a planta e o patógeno, tal como descrito por Cao et al. (2014).

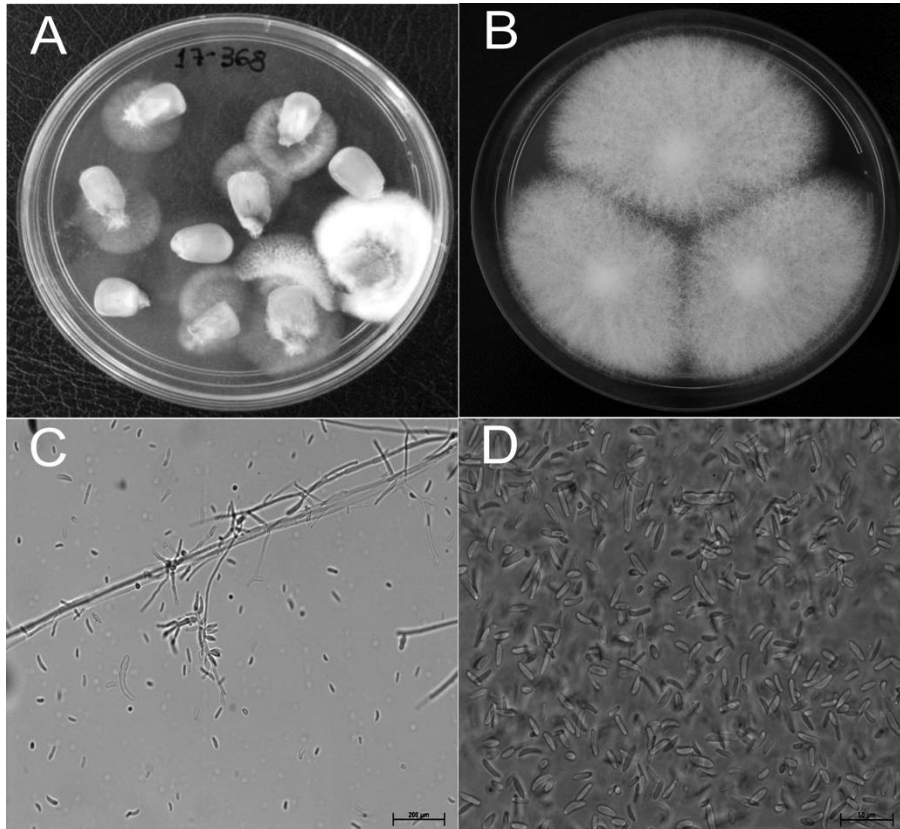
Tabela 1. Incidência de *Fusarium* spp. e ocorrência de fumonisinas FB₁, FB₂ e totais em grãos de milho.

Variáveis	Valores médios da % Infecção de <i>Fusarium</i> spp.	Valores médios de Fumonisinas (µg/g)			Variação Min. Max.
		FB1	FB2	Total	
Genótipo	*	*	*	*	
Caiano	75.31 a	1.25 a	1.25 a	2.51 a	0.4-4.5
Híbrido comercial	84.37 b	2.82 b	2.99 b	5.81 b	3.5-9.1
ST 509	75.52 a	1.48 a	1.34 a	2.82 a	0.9-6.4
ST 1309	71.04 a	1.38 a	1.19 a	2.58 a	0.4-5.5
Práticas de fertilização	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
Adubação completa	79.47	1.77	1.77	3.54	1.2-7.9
Adubação de plantio	74.68	1.43	1.14	2.56	0.4-5.5
Inoculante Ab-V5	78	2.02	2	4.02	0.8-9.1
Inoculante ZM	74	1.72	1.89	3.61	1.3-9.0
Local	n.s.	*	*	*	
Florestópolis	75.67	2.57 a	2.47a	5.04 a	2.6-9.1
Londrina	77.44	0.89 b	0.92 b	1.81 b	0.4-4.0

n.s., * : não significativo, significativo em nível de 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Dentre o total de grãos avaliados (3.840), 77% estavam infectados com *Fusarium* spp. (Figura 2). O percentual de grãos infectados com *Fusarium* spp. encontrados neste estudo se assemelha com outros trabalhos realizados no Brasil e no mundo (Fandohan et al. 2005, Ono et al. 2006, Cao et al. 2013, Stumpf et al. 2013) confirmando a predominância deste gênero na cultura do milho. Outros gêneros fúngicos, tais como *Aspergillus* e *Penicillium*, também foram encontrados, mas em frequências extremamente baixas (dados não mostrados).

Figura 2. Aspectos morfológicos de *Fusarium* spp.. (A) Isolamento fúngico em meio DG18 (B) Crescimento fúngico em meio DCPA após 7 dias a 25°C, (C) Células conidiogênicas em forma de fialídes (40x), (D) Macro e microconídios (100x).



Os genótipos de milho diferiram estatisticamente com relação ao percentual de grãos infectados. A infecção foi menor nas variedades sintéticas (75,52 % em V1 e 71,04 % em V2) e crioula (75,31 % em CA) do que no híbrido comercial (HC) que apresentou, em média, 84,37% de grãos infectados por *Fusarium* spp. (Tabela 1).

A maior taxa de infecção fúngica no híbrido, em relação às variedades, não pode ser explicada por danos provocados por insetos, uma vez que todos os grãos apresentavam-se assintomáticos sem sinais de herbivoria. O híbrido comercial estudado neste trabalho, expressa a proteína Cry1F que confere resistência contra o ataque de alguns insetos da ordem Lepidóptera. Segundo a literatura, a redução dos danos causados por insetos, em decorrência da expressão de proteínas Cry, reduz a vulnerabilidade a fungos e conseqüentemente a contaminação por micotoxinas (De La

Campa et al. 2005). Os mecanismos pelos quais as plantas não danificadas e não provenientes de grãos infectadas são infectadas por *Fusarium* spp. ainda são objetos de discussão na literatura e ainda carecem de serem melhor explicados (Maiorano et al. 2009).

A composição química dos grãos tem sido apontada como fator importante na vulnerabilidade à infecção fúngica e no acúmulo de micotoxinas. Dall'Asta et al. (2012) investigaram o papel dos ácidos graxos na infecção por *Fusarium* e na produção de fumonisinas e encontraram uma correlação positiva entre o aumento dos níveis de fumonisinas e a taxa de gorduras totais e ácido linoleico, que é um ácido graxo insaturado frequentemente descrito como modulador da resposta de resistência da planta ao patógeno. Outros fatores como dureza dos grãos, atividade de água, teor de amilopectina e ergosterol também tem sido estudados (Bluhm and Woloshuk 2005, Blandino and Reyneri 2008, Cahagnier et al. 1995, Cao et al. 2013). De modo geral a resistência genética a infecção fúngica é uma característica de herança quantitativa influenciada por diversos fatores e ainda necessita de muitos estudos para sua compreensão.

O tratamento das sementes com os inoculantes IBV e IZM não interferiu no percentual de grãos infectados com *Fusarium* spp. e na ocorrência de fumonisinas. Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos AC, AP, IBV e IZM (Tabela 1). Contudo, este é o primeiro estudo que investigou o efeito destes inoculantes sobre a infecção de *Fusarium* spp. e presença de fumonisinas em milho no campo.

Análise de diversidade genética de *Fusarium* spp. e identificação molecular dos isolados fúngicos

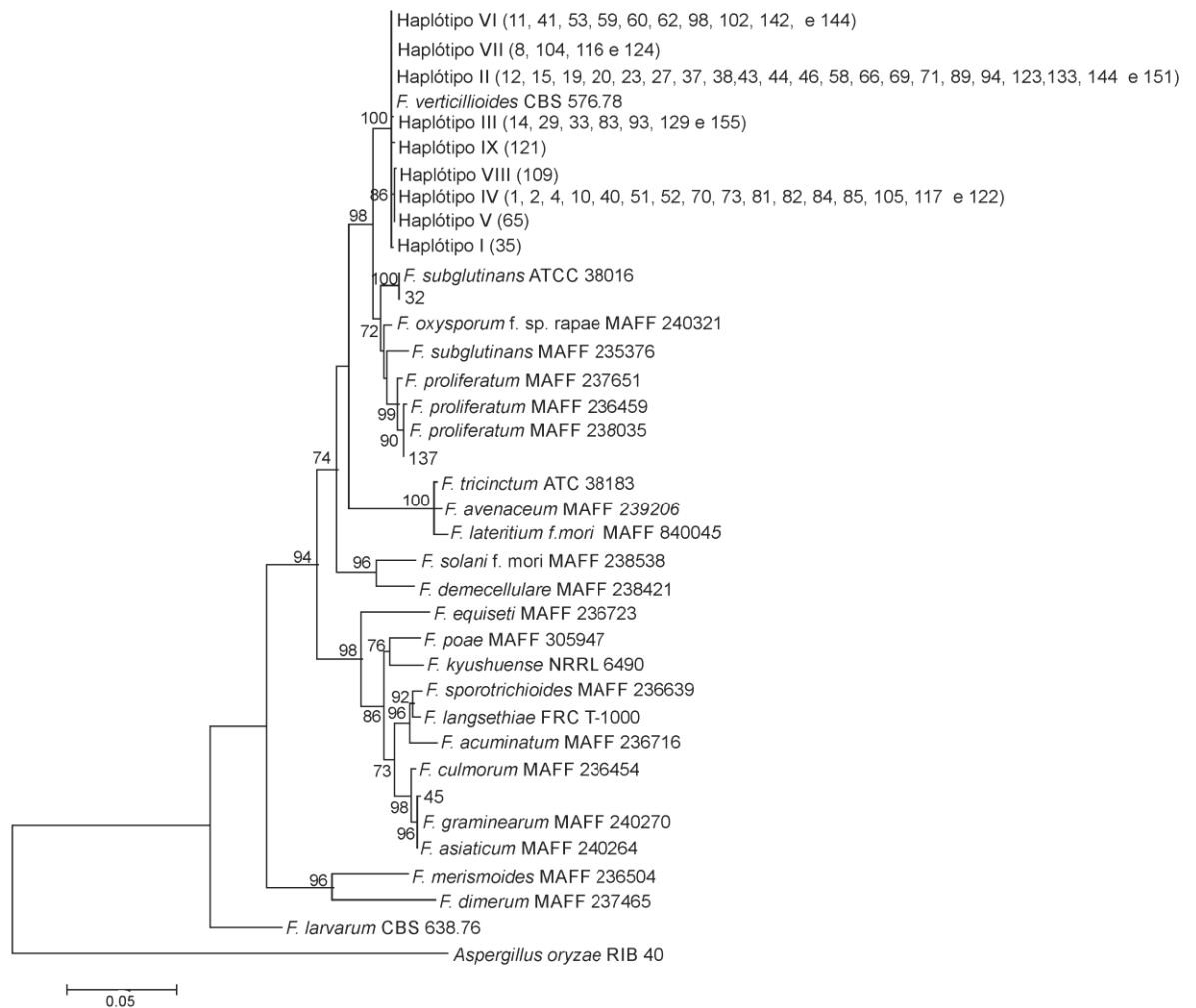
Um total de 160 isolados de *Fusarium* spp. foram submetidos à análise de AFLP, utilizando três combinações de enzima-*primer*, as quais geraram 757 locos, variando de 50 a 500 pb. A análise de agrupamento revelou a formação de quatro grupos (G I, GII, G III e G IV) em nível de 50% de similaridade genética, sendo que G I contemplou a maioria dos isolados fúngicos (Figura 3).

Visando a identificação das espécies isoladas, representantes dos grupos e subgrupos (67 isolados), foram selecionados com base nas dissimilaridades genéticas evidenciadas pelo AFLP, foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene *TEF-1 α* . As sequências de nucleotídeos revelaram a existência de nove haplótipos, as quais foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética (Figura 4) juntamente com sequências, disponíveis no GenBank, de espécies tipo ou néotipo do gênero *Fusarium*.

Dos sessenta e sete isolados sequenciados, sessenta e quatro isolados pertencentes ao grupo I de AFLP foram identificados através do sequenciamento parcial do gene *TEF-1 α* como pertencentes a espécie *F. verticillioides* confirmando, assim, a prevalência desta espécie em milho e revelando uma grande variabilidade intraespecífica. Os demais grupos revelados pela análise de AFLP foram compostos por um isolado cada.

O grupo II ficou representado pelo isolado, de número 32, que foi identificado como *F. subglutinans*. Esta espécie tem sido relatada como uma das mais frequentes em campos de milho assintomáticos, porém é uma espécie de alta toxigenicidade associada à produção de beauvericina e moniliformina (Reyes-Velázquez et al. 2011). O grupo III foi representado pelo isolado 45, o qual foi identificado como *F. graminearum* que é uma espécie comumente encontrada em grãos de cereais, e capaz de produzir as toxinas deoxinivalenol (DON) e zearalenona (Moretti et al. 2014). O grupo IV foi constituído pelo isolado 137, que pertence à espécie *F. proliferatum*. Tal como *F. verticillioides*, esta espécie é frequente no milho e considerada uma das principais responsáveis pela produção de fumonisinas em cereais. (Mohale et al. 2013, Zhang et al. 2013).

Figura 4. Árvore filogenética inferida pelo algoritmo de *Neighbor-joining* (NJ) utilizando o programa MEGA 6.0, baseada em dados de sequência do gene *TEF1α* de cepas tipo de *Fusarium* spp. e isolados de milho do presente estudo. Nós suportados por valores de bootstrap >70% são indicados por valores numéricos. *Aspergillus oryzae* é o outgroup.



Análise de diversidade genética de *F. verticillioides* por meio de AFLP

Um total de 709 locos de AFLP obtidos de 157 isolados de *F. verticillioides* foi utilizado para Análise de Variância Molecular (AMOVA), inicialmente separando os isolados fúngicos por local de cultivo. Encontrou-se uma diferenciação genética significativa ($p < 0,05$) entre os isolados fúngicos obtidos dos dois locais de cultivo (Londrina e Florestópolis).

O índice de fixação (F_{st}) foi de 0,18 (Tabela 2), o que mostra uma alta diferenciação e sugere um fluxo gênico restrito entre estas populações (Young et al. 2000). As diferenças genéticas entre as populações fúngicas dos dois locais corroboram com a diferença encontrada na ocorrência de fumonisinas para os dois locais.

Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) e F_{ST} em isolados de *F. verticillioides* segundo sua origem geográfica.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação	Índice de fixação
Entre locais	1	447.653	5.45732	18	* F_{ST} : 0.17995
Dentro de locais	153	3805.031	24.86948	82	
Total	154	4252.684	30.3268		

Estatisticamente significativo em nível de 5%

Embora a biossíntese de fumonisinas seja influenciada por diversos fatores, existe a possibilidade que estes conjuntos de isolados geneticamente diferentes, detectadas por meio de AFLP, exibam perfis infectivos e micotoxicológicos distintos (Covarelli et al. 2012).

Em Florestópolis encontrou-se uma diferenciação significativa ($p < 0,05$) entre os isolados fúngicos obtidos dos diferentes genótipos de milho. Cerca de 11% ($F_{st} = 0,107$) da variação genética total ocorreu entre os grupos de isolados fúngicos que foram obtidos dos diferentes genótipos de milho (Tabela 3). Segundo Young et al (2000) este nível de diferenciação genética é considerado moderado. Da mesma forma, através da AMOVA, detectaram-se diferenças significativas ($p > 0,05$), entre os isolados fúngicos obtidos dos diferentes genótipos de milho cultivados em Londrina, entretanto, neste caso a variação genética entre os grupos foi de 0,045, ou seja, um F_{st} menor que em Florestópolis (Tabela 3). Conclui-se que em ambas as regiões, a distribuição da diversidade genética ocorreu de maneira diferenciada entre os genótipos de milho.

Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) e F_{ST} em isolados de *F. verticillioides* segundo o genótipo do milho.

Local	Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação	Índice de fixação
Florestópolis	Entre genótipos	3	179.028	2.12547	10.72	* F_{ST} : 0.10718
	Dentro de genótipos	78	1327.858	17.70477	89.28	
	Total	81	1506.886	19.83024		
Londrina	Entre genótipos	3	168.335	1.39701	4.51	* F_{ST} : 0.04510
	Dentro de genótipos	74	2129.81	29.58069	95.49	
	Total	77	2298.145	30.9777		

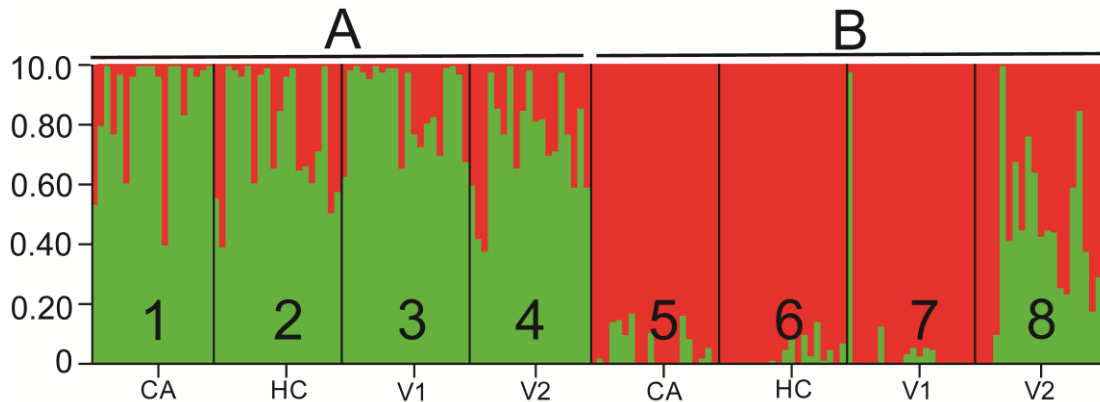
Estatisticamente significativo em nível de 5%

Pamphile e Azevedo (2002) utilizaram a técnica de RAPD em isolados de *F. verticillioides* de milho, e tiveram êxito em discriminar os isolados segundo os genótipos do cultivar de origem, evidenciando uma forte associação entre a diversidade genética dos isolados fúngicos e a planta hospedeira. Estes resultados corroboram com os encontrados por Amoah et al. (1996) que também utilizaram marcadores de RAPD para estudar isolados fúngicos de milho em províncias de Gana.

A AMOVA dos dados de AFLP não revelou diferenças significativas entre os conjuntos de isolados fúngicos obtidos dos grãos de milho gerados sob as diferentes práticas de fertilização.

Para elucidar a estrutura populacional dos isolados de *F. verticillioides* foi realizado um teste de atribuição com base no modelo Bayesiano implementado no programa Structure. Esta análise mostrou que o número ideal de “cluster genotípico” para alocar os 157 isolados é igual a dois ($K=2$), os quais estão fortemente relacionados à sua origem geográfica (Figura 5).

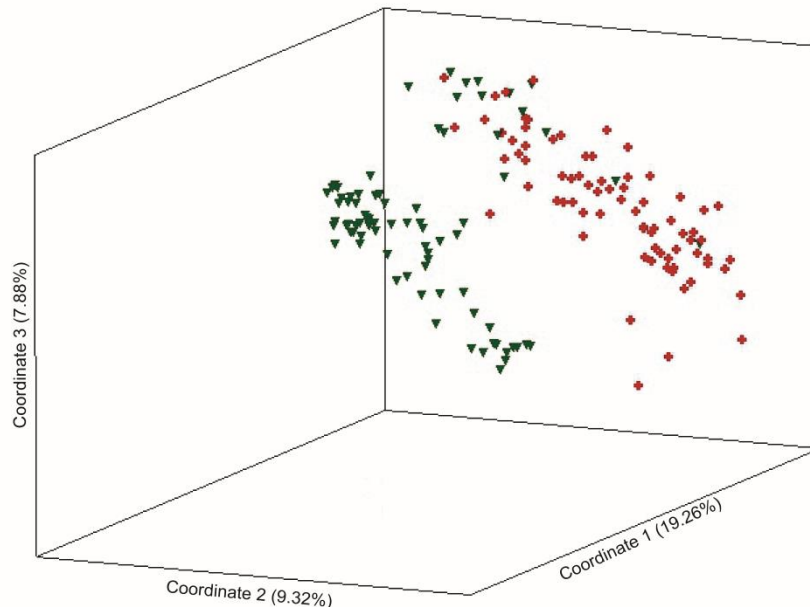
Figura 5. Resultado do teste de atribuição. Grupos de 1 a 4 (*Cluster A*) representam os isolados de Londrina e os grupos de 5 a 8 (*Cluster B*) os isolados de Florestópolis. CA (Caiano), HC (Híbrido comercial), V1 (ST 509), V2 (ST 1309). Cada cor representa um *cluster* genotípico atribuído probabilisticamente pelo software Structure 2.3.4.



Os *clusters* A e B são formados, respectivamente, pelos quatro conjuntos de isolados oriundos da região de Londrina e de Florestópolis. Com exceção do conjunto de isolados da variedade V2, o *cluster* B é mais uniforme geneticamente que o *cluster* A. O conjunto de isolados fúngicos provenientes da variedade V2 cultivada em Florestópolis compartilha grande parte de seus alelos com os isolados do *cluster* A.

A Análise de Coordenadas Principais (PcoA) (Figura 6) corrobora com os dados apresentados pelo Structure, onde é possível observar um agrupamento robusto entre os isolados de acordo com sua origem geográfica, salvo uma única exceção: os isolados fúngicos provenientes da variedade de milho V2 de Florestópolis se agrupam junto aos demais isolados de Londrina. A diferença na estrutura genética do conjunto de isolados provenientes da variedade V2 pode ser explicada por uma característica descrita por Wilke et al. (2007), que é a possibilidade de transmissão de *F. verticillioides* de maneira sistêmica pelas sementes. Supõe-se que a variedade V2 possuía uma população de fungos própria da semente que foi utilizada no plantio em Londrina e Florestópolis.

Figura 6. Análise de coordenadas principais (PcoA) em isolados de *F. verticillioides*. Isolados identificados por uma cruz= oriundos de Florestópolis, isolados identificados com triângulo= oriundos de Londrina.



Os resultados encontrados para região sul do Brasil, Paraná, diferem daqueles obtidos para o milho cultivado na Itália e na Argentina. Covarelli et al. (2012) não encontraram relação entre a diversidade genética e a procedência geográfica dos isolados de *F. verticillioides* em milho cultivado na Itália. Da mesma forma, Reynoso et al. (2009) não encontraram diferenciação genética entre populações de isolados de *F. verticillioides* procedentes de diferentes regiões da Argentina. A comparação dos nossos resultados com os obtidos pelos autores citados acima sugere que nos campos brasileiros há maior diversidade genética para *F. verticillioides*.

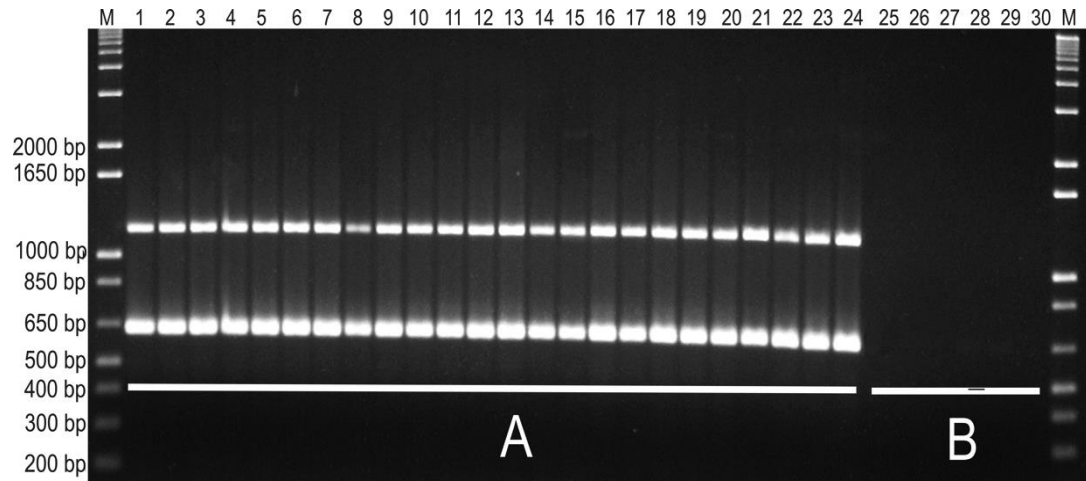
Avaliação do potencial toxigênico de *Fusarium* spp.

A síntese de uma cadeia carbônica e sua posterior aminação são duas etapas chaves na biossíntese das fumonisinas. A primeira etapa é catalisada por uma policetídeo sintase, a qual é codificada pelo gene denominado *FUM1*. A aminação do policetídeo é catalisada por uma α -oxiamina sintase codificada pelo gene *FUM8*. A

presença de ambos os genes fornece um bom indício do potencial toxigênico de *Fusarium* (Seo et al. 2001).

Os isolados de *F. subglutinans*, *F. graminearum* e *F. proliferatum* não deram origem a produtos de amplificação para os genes *FUM1* e *FUM8* (Figura 7). Ao contrário destas espécies, produtos de amplificação obtidos por PCR revelaram que a maioria dos isolados de *F. verticillioides* (95%) contém os genes *FUM1* e *FUM8*, o que indica um elevado potencial toxigênico de *F. verticillioides* corroborando com outros trabalhos da literatura (Sanchez-Rangel et al. 2011, Wang et al. 2010, Zhang et al. 2013). Cerca de 96% dos isolados de Florestópolis possuem os genes *FUM1* e *FUM8*, ao passo, que 92% dos isolados de Londrina possuem em seu genoma estes dois genes.

Figura 7. PCR Multiplex utilizando *primers* específicos para os genes *FUM1* (635 bp) e *FUM8* (1152 bp). (M) DNA Ladder 1 kb plus, (A) Isolados potencialmente produtores de fumonisinas 1-24 *F. verticillioides*. (B) Isolados não produtores, 25-27 *F. verticillioides*, 28-30 *Fusarium* spp..



Conclusões

Nas condições de cultivo utilizadas as variedades sintéticas e crioula apresentaram menor percentual de grãos infectados com *Fusarium* spp. e menos contaminação por fumonisinas B1 e B2 que o híbrido comercial. O percentual de grãos infectados com *Fusarium* spp. foi similar em ambos os locais, mas os níveis de fumonisinas encontrados foram significativamente superiores na região tradicionalmente manejada por agricultores familiares, onde não houve rotação de culturas. Foi demonstrado que a maior parte dos isolados de *Fusarium* spp. possui potencial para produção de fumonisinas.

Nenhuma associação significativa entre tipo de adubação nitrogenada, incidência de *Fusarium* spp. e nível de fumonisinas foi encontrada. A diversidade genética de *F. verticillioides* é alta e está estreitamente associada a sua origem geográfica. Há associação entre a diversidade genética dos isolados de *F. verticillioides* e o genótipo da planta hospedeira.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES e ao CNPq que financiaram este estudo.

Referências bibliográficas:

ANVISA. Online Archive of Ministério da Saúde [Internet]. 2011. Brasília (DF): RDC N°7, DE 18 de fevereiro de 2011. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10269e8043ec6fc2af60ef6b7f09096f/rdc0007_18_02_2011.pdf?MOD=AJPERES.

Abbas HK, Zablutowics RM, Weaver MA, Horn BW, Xie W, Shier WT. 2004. Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *Can. J. Microbiol.* 50:193-199.

Abbas HK, Wilkinson JR, Zablutowicz RM, Accinelli C, Abel CA, Bruns HA, Weaver MA. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Rev.* 28:142-153.

Alizadeh AM, Rohandel G, Roubarmohammadi S, Roubary M, Sohanaki H, Ghiasian SA, Taherkhani A, Semnani S, Aghasi M. 2012. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.* 13:2625-2628.

Almeida AP, Corrêa B, Mallozzi MAB, Sawazaki E, Soares LMV. 2000. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Braz J Microb.* 31:321-326.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-410.

- Amoah BK, Rezanoor HN, Nicholson P, Macdonald MV. 1995. Variation in the *Fusarium* section Liseola: pathogenicity and genetic studies of isolates of *Fusarium moniliforme* Sheldon from different hosts in Ghana. *Plant Pathol.* 44:563-572.
- Arias SL, Theumer MG, Mary VS, Rubinstein HR. 2012. Fumonisin: probable role as effectors in the complex interaction of susceptible and resistant maize hybrids and *Fusarium verticillioides*. *J Agric Food Chem.* 60:5667-5675.
- Bermudez AJ, Ledoux DR, Rottinghaus GE. 1995. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. *Avian Dis.* 39:879-886.
- Blandino M, Reyneri A. 2008. Effect of Maize Hybrid Maturity and Grain Hardness on Fumonisin and Zearalenone Contamination. *Ital J Agron.* 3:107-117.
- Blandino M, Reyneri A, Vanara F. 2008. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. *Crop Prot.* 27:222-230.
- Bluhm BH, Woloshuk CP. 2005. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol Plant Microbe Interact.* 18:1333-1339.
- Bryła M, Roszko M, Szymczyk K, Jedrzejczak R, Obiedzinski MW, Sekul J. 2013. Fumonisin in plant-origin food and fodder - a review. *Food Addit Contam Part A.* 30:1626-1640.
- Cahagnier B, Melcion D, Richard-Molard D. 1995. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. *Lett Appl Microbiol.* 20:247-251.

- Camargos SM, Soares LMV, Sawazaki E, Bolonhezi D, Castro JL, Bortolletto N. 2000. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. *Braz J Microbiol.* 31:225-228.
- Cao A, Santiago R, Ramos AJ, Marin S, Reid LM, Butron A. 2013. Environmental factors related to fungal infection and fumonisin accumulation during the development and drying of white maize kernels. *Int J Food Microbiol.* 164:15-22.
- Cao A, Santiago R, Ramos AJ, Souto XC, Aguin O, Malvar RA, Butrón A. 2014. Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. *Int J Food Microbiol.* 177:63-71.
- Casteel SW, Turk JR, Rottinghaus GE. 1994. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. *Fundam Appl Toxicol.* 23:518-524.
- Covarelli L, Stifano S, Beccari G, Raggi L, Lattanzio VM, Albertini E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiol.* 31:17-24.
- Cruz J C, Filho I A P, Queiroz L R. 2014. Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2013/14. Available from : <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>.
- Dall'Asta C, Falavigna C, Galaverna G, Battilani P. 2012. Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and fumonisin production. *J Agric Food Chem.* 60:3800-3808.
- de la Campa R, Hooker DC, Miller JD, Schaafsma AW, Hammond BG. 2005. Modeling effects of environment, insect damage, and *Bt* genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines. *Mycopathologia.* 159:539-552.

- Duncan KE, Howard RJ. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol Plant Microbe Interact.* 23:6-16.
- Earl D, vonHoldt B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* 4:359-361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol Resour.* 14:2611-2620.
- Excoffier I, Lischer HEI. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10:564–567.
- Fandohan P, Gnonlonfin B, Hell K, Marasas WFO, Wingfield MJ. 2005. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. *International Journal of Food Microbiology.* 99:173-183.
- Hwang SF, Ahmed HU, Gossen BD, Kutcher HR, Brandt SA, Strelkov SE, Chang KF, Turnbull GD. 2009. Effect of crop rotation on soil pathogen population dynamics and canola seedling establishment. *Plant Pathol. J.* 8:106-112.
- Hirooka EY, Yamaguchi MM, Aoyama S, Sugiura Y, Ueno Y. 1996. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Addit Contam Part A.* 13:173-183.

- Hungria M. 2011. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação e rendimento a baixo custo. [internet]. Available from: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/doc325.pdf>.
- IARC. 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC Press; p. 445–466.
- Jaime-Garcia R, Cotty PJ. 2010. Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biol Biochem.* 42: 1842-1847.
- Lanza FE, Zambolim L, Veras da Costa R, Vieira Queiroz VA, Cota LV, Dionísia da Silva D, Coelho de Souza AG, Fontes Figueiredo JE. 2014. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Prot.* 165:232-237.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25:1451–1452.
- Maiorano A, Reyneri A, Sacco D, Magni A, Ramponi C. 2009. A dynamic risk assessment model (FUMAgrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Prot.* 28:243-256.
- Marasas WF, Jaskiewicz K, Venter FS, Van Schalkwyk DJ. 1988. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S Afr Med J.* 74:110-114.
- Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* 60:218-237.
- Miller JD. 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environ Health Perspect.* 2:321-324.

- Mohale S, Medina A, Rodriguez A, Sulyok M, Magan N. 2013. Mycotoxigenic fungi and mycotoxins associated with stored maize from different regions of Lesotho. *Mycotoxin Res.* 29:209-219.
- Moretti A, Panzarini G, Somma S, Campagna C, Ravaglia S, Logrieco AF, Solfrizzo M. 2014. Systemic growth of *F. graminearum* in wheat plants and related accumulation of deoxynivalenol. *Toxins.* 6:1308-1324.
- Munkvold GP, Desjardins AE. 1997. Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence?. *Plant Dis J.* 81:556-565.
- Moreno EC. 2008. Microbiota fúngica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 99.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:2044-2049.
- Oliveira GR, Ribeiro JM, Fraga ME, Cavaglieri LR, Direito GM, Keller KM, Dalcerro AM, Rosa CA. 2006. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia.* 162:355-362.
- Ono EY, Silva M, Hashimoto EH, Vizoni E, Kawamura O, Sugiura Y, Hirooka EY. 2008. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Parana State, Brazil. *Food Addit Contam Part A.* 25:1392-1399.

- Ono EYS, Biazon L, Silva Md, Vizoni É, Sugiura Y, Ueno Y, Hirooka EY. 2006. Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. *Braz Arch Biol Technol.* 49:63-71.
- Pamphile J, Azevedo J. 2002. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*. L). *World J Microbiol Biotechnol.*18:391-396.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Fungi and food spoilage*. London: Springer US.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945–959.
- Proctor RH, Plattner RD, Brown DW, Seo JA, Lee YW. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycol Res.* 108:815-822.
- Queiroz VAV, de Oliveira Alves GL, da Conceição RRP, Guimarães LJM, Mendes SM, de Aquino Ribeiro PE, da Costa RV. 2012. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control.* 28:83-86.
- Ranum P, Pena-Rosas JP, Garcia-Casal MN. 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Ann N Y Acad Sci.* 1312:105-112.
- Reid LM, Zhu X, Ma BL. 2001. Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to *gibberella* (*Fusarium graminearum*) ear rot. *Plant and Soil.* 237:1-14.
- Reyes-Velázquez W, Figueroa-Gómez R, Barberis M, Reynoso M, Rojo FA, Chulze S, Torres A. 2011. *Fusarium* species (section *Liseola*) occurrence and natural

incidence of beauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Res.* 27:187-194.

Reynoso M, Chulze S, Zeller K, Torres A, Leslie J. 2009. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. *Eur J Plant Pathol.* 123:207-215.

Rohlf FJ. 2000. ntsys-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system [CD-ROM]. Version 2.1. Exeter Software. New York. 1 CD-ROOM: color.

Sanchez-Rangel D, SanJuan-Badillo A, Plasencia J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J Agric Food Chem.* 53:8565-8571.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74:5463-5467.

Schluter PM, Harris SA. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes.* 6:569-572.

Scussel VM, Savi GD, Costas LLF, Xavier JJM, Manfio D, Bittencourt KO, Aguiar K, Stein SM. 2013. Fumonisin in corn (*Zea mays* L.) from Southern Brazil. *Food Addit Contam Part B.* 7:151-155.

Seo JA, Proctor RH, Plattner RD. 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.* 34:155-165.

- Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. 1990. Quantitative Determination of Fumonisin B1 and B2 by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Liquid Chromatography*. 13:2077-2087.
- Stumpf R, Dos Santos J, Gomes LB, Silva CN, Tessmann DJ, Ferreira FD, Machinski MJ, Del Ponte EM. 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Braz J Microbiol*. 44:89-95.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA 6.0: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Togawa RC, Brigido MM. 2003. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. [internet]. Available from: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>.
- Ueno Y et al. 1997. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol*. 5:1143-1150.
- USDA. United States Department of Agriculture. 2014. Foreign Agricultural Service, Grain: World Markets and Trade. [cited 2015 Feb 12]. Available From: <http://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade>.
- Van der Westhuizen L, Shephard GS, Scussel VM, Costa LLF, Vismer HF, Rheeder JP, Marasas WFO. 2003. Fumonisin Contamination and *Fusarium* Incidence in Corn from Santa Catarina, Brazil. *J Agric Food Chem*. 51:5574-5578.

- Vargas EA, Preis RA, Castro L, Silva CM. 2001. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Addit Contam Part A*. 18:981-986.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 23:4407-4414.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH, Jr. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem*. 266:14486-14490.
- Wang J, Wang X, Zhou Y, Du L, Wang Q. 2010. Fumonisin detection and analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium* spp. in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) in Zhejiang Province of China. *J Sci Food Agric*. 90:836-842.
- Watanabe M, Yonezawa T, Lee K-i, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Goto K, Hara-Kudo Y. 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evol Biol*. 11:322.
- Wilke AL, Bronson CR, Tomas A, Munkvold GP. 2007. Seed Transmission of *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Different Temperature Regimes. *Plant Dis*. 91:1109-1115.
- Young AG, Boshier D, Boyle TJB. 2000. *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Melbourne: CSIRO Pub.
- Zhang L, Wang J, Zhang C, Wang Q. 2013. Analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium* species in corn products from three main maize-producing areas in eastern China. *J Sci Food Agric*. 93:693-701.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K. 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.

ABBAS, H. K. et al. Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. **Canadian Journal Microbiology**, v.50, n.1, p.193-9, 2004.

ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. **Archives Microbiology**, v. 192, n. 6, p. 409-25, 2010.

ABIMILHO (Associação Brasileira de indústrias do milho). **Oferta e demanda de milho no Brasil**. 2014. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatistica>>, Acesso em 28 de ago. de 2014.

ALBERTS, J. F. et al. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, 1990.

ALIZADEH, A. M. et al. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 13, n. 6, p. 2625-8, 2012.

ALMEIDA, A. P. et al. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Jornal Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **RDC N°7, DE 18 de fevereiro de 2011**. 2011. Disponível em:
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10269e8043ec6fc2af60ef6b7f09096f/rdc0007_18_02_2011.pdf?MOD=AJPERES, Acesso em 18 de jan. de 2015.

ARAÚJO, P. M. D.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.

ARIAS, S. L. et al. Fumonisin: probable role as effectors in the complex interaction of susceptible and resistant maize hybrids and *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 5667-75, 2012.

ASIKI, G. et al. A pilot study to evaluate aflatoxin exposure in a rural Ugandan population. **Tropical Medicine International Health**, v. 19, n. 5, p. 592-9, 2014.

BATTILANI, P. et al. Dynamic of water activity in maize hybrids is crucial for fumonisin contamination in kernels. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 3, p. 467-472, 2011.

BERMUDEZ, A. J.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. **Avian Diseases**, v. 39, n. 4, p. 879-86, 1995.

BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, n. 11, p. 743-745, 1988.

BLANDINO, M.; REYNERI, A. Effect of Maize Hybrid Maturity and Grain Hardness on Fumonisin and Zearalenone Contamination. **Italian Journal of Agronomy**, v.3, n. 2, p. 107-117, 2008.

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.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion Plant Biology**, v.4, p.343-50, 2001.

BLUHM, B. H.; WOLOSHUK, C. P. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 18, n. 12, p. 1333-1339, 2005.

BORDIN, K. et al. Assessment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. **Food Chemistry**, v. 155, n. 1, p. 174-178, 2014.

BRYLA, M. et al. Fumonisin in plant-origin food and fodder - a review. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 30, n. 9, p. 1626-1640, 2013.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**. v. 20, n. 4, p. 247-51, 1995.

CAO, A. et al. Environmental factors related to fungal infection and fumonisin accumulation during the development and drying of white maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 15-22, 2013.

CAMARGOS, S. M. et al. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n.1, p. 225-228, 2000.

CASTEEL, S. W.; TURK, J. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. **Fundamental Applied Toxicology**, v. 23, n. 4, p. 518-24, 1994.

CELERES. **Informativo de Biotecnologia**. Disponível em:

<<http://celeres.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2013/08/IB13011.pdf>>, acesso em 23 de ago. de 2013.

CONAB (companhia nacional de abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_07_09_09_36_57_10_levantamento_de_graos_julho_2014.pdf>, acesso em 20 de jul. de 2014.

COVARELLI, L. et al. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. **Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 17-24, 2012.

CRUZ, J. C.; FILHO, I. A. P.; QUEIROZ, L. R. **Quatrocentas e sessenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2013/14**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico).

DALL'ASTA, C. et al. Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and fumonisin production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3800-3808, 2012.

DAREN, W. B.; ROBERT, H. P. ***Fusarium: Genomics, Molecular and Cellular Biology***. Caister Academic Press, 2013.

DE LA CAMPA, R. et al. Modeling effects of environment, insect damage, and *Bt* genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines.

Mycopathologia, v. 159, n. 4, p. 539-52, 2005.

DESJARDINS, A. E. et al. FUM1--a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 15, n. 11, p. 1157-64, 2002.

DUNCAN, K. E.; HOWARD, R. J. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 23, n. 1, p. 6-16, 2010.

DUTTON, M. F. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. **Pharmacology Therapeutics**, v. 70, n. 2, p. 137-61, 1996.

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 132-145, 2011.

EARL, D.; VONHOLDT, B. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EFSA (European Food Safety Authority). **Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to fumonisins as undesirable substances in animal feed**. 2005. Disponível em:

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/235.htm>, Acesso em 28 de set. de 2014.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FANDOHAN, P. et al. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 173-183, 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **FAOSTAT**. 2012. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, acesso em 12 de jul. de 2014.

FDA (Food and Drug Administration). **Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance**. 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm109231.htm>, Acesso em 15 de jan. de 2015.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. [S.l.]: Ministério da Agricultura e do Abastecimento [etc.], 1996.

GHAZVINI, D. et al. Genotyping of *Fusarium verticillioides* strains producing fumonisin B1 in feed associated with animal health problems. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz University, v.12, n. 4, 2011.

GELDERBLOM, W. C. et al. Fumonisin novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.

HAMMOND, B. G. et al. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of *Bt* corn grown in the United States in 2000-2002. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1390-1397, 2004.

HIROOKA, E. Y. et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 13, n. 2, p. 173-83, 1996.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação e rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.(Embrapa Soja. Documentos 325).

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

IARC (International Agency Research on Cancer). **Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. 1993. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>, Acesso em 25 de set. de 2014.

JACOBS, A. et al. *Fusarium anatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. **Fungal Biology**, v. 114, n. 1, p.515-27, 2010.

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

KIM, H.; WOLOSHUK, C. P. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Fungal Genetic Biology**, v. 45, n. 6, p. 947-53, 2008.

KUDLA, B. et al. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. **Embo Jornal**, v. 9, n. 5, p. 1355-1364, 1990.

LANZA, F. E. et al. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**, v. 65, n. 1, p. 232-237, 2014.

LESLIE, J. F. et al. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. **International Jornal Food Microbiol**, v. 119, n. 1-2, p. 25-32, 2007.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manuall**. (Blackwell Professional). Ames, Iowa 2006.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n.1, p. 181-192, 2004.

- LOGRIECO, A. F. et al. *Aspergillus* section Nigri as contributor of fumonisin B(2) contamination in maize. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 31, n. 1, p. 149-55, 2014.
- MARCELINO, P. R. F. **Desenvolvimento de meio de cultivo e formulações inoculantes para *Azospirillum brasilense* AbV5**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p.120, 2012.
- MARASAS, W. F. et al. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in esophageal cancer areas in Transkei. **South African Medical Journal**, v. 74, n. 3, p. 110-4, 1988.
- MÁRCIA, B. A.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Food Science Technology**, v. 18, n.4, p. 363-367, 1998.
- MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chemical Toxicology**, v. 60, n.1, p. 218-37, 2013.
- MARIN, S. et al. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. **Jornal Food Protection**, v. 61, n. 11, p. 1489-96, 1998.
- MARROQUÍN-CARDONA, A. G. et al. Mycotoxins in a changing global environment – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 220-230, 2014.
- MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 17-32,1997.
- MATTOSO, M. J.; GARCIA, J. C.; DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C. Aspectos de produção e comércio do milho. **Informe agropecuário**, v. 27, p. 95-104, 2006.

MAZZONI, E. et al. Field control of *Fusarium* ear rot, *Ostrinia nubilalis* (Hubner), and fumonisins in maize kernels. **Pest Management Science**, v. 67, n. 4, p. 458-65, 2011.

MILANI, J.; MALEKI, G. Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2372-2375, 2014.

MILLER, J. D. Factors that affect the occurrence of fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 321-4, 2001.

MORENO, E. C. **Microbiota fungica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, p. 99, 2008.

MORETTI, A. et al. Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. **International Journal Food Microbiology**, v. 167, n.1, p. 57-66, 2013.

MULÈ, G. et al. A Species-Specific PCR Assay Based on the Calmodulin Partial Gene for Identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. **European Journal Plant Pathology**, v. 110, n. 5-6, p. 495-502, 2004.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisins in Maize: Can We Reduce Their Occurrence? **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. Pennsylvania State University Press, 1983.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* Species and Combinations within the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.

ONO, E. Y. et al. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Parana State, Brazil. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 25, n. 11, p. 1392-9, 2008.

ONO, E. Y. S. et al. Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 49, n. 1, p. 63-71, 2006.

ORSI, R. B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 1, p. 75-87, 2000.

OSSELAERE, A. et al. Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. **Food Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 350-355, 2013.

OSTRY, V. et al. A review on comparative data concerning *Fusarium* mycotoxins in Bt maize and non-Bt isogenic maize. **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 3, p. 141-145, 2010.

O'DONNELL, K. et al. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2044-2049, 1998.

O'DONNELL, K. et al. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, n. 1, p. 61-78, 2000.

PARSONS, M. W.; MUNKVOLD, G. P. Effects of planting date and environmental factors on *Fusarium* ear rot symptoms and fumonisin B1 accumulation in maize grown in six North American locations. **Plant Pathology**, v. 61, n. 6, p. 1130-1142, 2012.

PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. **International Journal Food Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 257-65, 1988.

PEIXOTO, C. M. **O milho no Brasil, sua importância e evolução**. 2014. Disponível em: <http://www.pioneersementes.com.br/Media-Center/Pages/DetaildoArtigo.aspx?p=165&t=O+milho+no+Brasil%2c+sua+import%u00e2ncia+e+evolu%u00e7%u00e3o>, Acesso em 12 de jan. de 2015.

PHOKU, J. Z. et al. *Fusarium* infection of maize and maize-based products and exposure of a rural population to fumonisin B1 in Limpopo Province, South Africa. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 29, n. 11, p. 1743-1751, 2012.

PICOT, A. et al. The Dent Stage of Maize Kernels Is the Most Conducive for Fumonisin Biosynthesis under Field Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8382-8390, 2011.

PINTON, P.; OSWALD, I. P. Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1615-43, May 2014.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and food spoilage. 3rd ed. Gaithersburg, Aspen Pub., Inc., 2009.

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, v. 78, n. 1-2, p. 21-37, 1999.

PLEADIN, J. et al. Biochemical Changes in Pig Serum After Ochratoxin A Exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 88, n. 6, p. 1043-1047, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

PROCTOR, R. H. et al. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. **Fungal Genetics Biology**, v. 38, n. 2, p. 237-49, 2003.

PROCTOR, R. H. et al. A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 6, p. 1016-26, 2008.

PROCTOR, R. H. et al. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2424-30, 2006.

PROCTOR, R. H. et al. Birth, death, and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. **Molecular Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 290-306, 2013.

QUEIROZ, V. A. V. et al. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 83-86, 2012.

RANUM, P.; PENA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n.1, p. 105-12, 2014.

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

RILEY, R. T. et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n. 2, p. 301-8, 2001.

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

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

SCOTT, P. M. Recent research on fumonisins: a review. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 29, n. 2, p. 242-8, 2012.

SCUSSEL, V. M. et al. Fumonisins in corn (*Zea mays* L.) from Southern Brazil. **Food Additives Contaminants: Part B**, v. 7, n. 2, p. 151-155, 2013.

UENO, G. S. et al. Mycological Analysis and Multi-Mycotoxins in Maize from Rural Subsistence Farmers in the Former Transkei, South Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 8232-8240, 2013.

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, 2013.

SOLFRIZZO, M. et al. Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 21, n. 11, p. 1090-1095, 2004.

STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. **Human Experimental Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 799-809, 2008.

SUAREZ, L. et al. Neural tube defects on the Texas-Mexico border: what we've learned in the 20 years since the Brownsville cluster. **Birth Defects Research Clinical Molecular Teratology**, v. 94, n. 11, p. 882-92, 2012.

SCHLÜTER, P. M. & HARRIS, S. A. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 1, p. 569-572, 2006.

SHEPHARD, G. S. et al. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, n. 10, p. 2077-2087, 1990.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. **Plant Disease**, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 6.0: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TOGAWA, R.C.; BRIGIDO, M.M. (2003). PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. 1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology - IcoBiCoBi 14th to 16th May 2003. Ribeirão Preto.

UENO, Y. et al. Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver câncer: A 3-year study of corn harvested im Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food Chemical Toxicology**, v. 35, n. 12, p.1143-1150, 1997.

USDA, United States Department of Agriculture. 2014. Foreign Agricultural Service, Grain: World Markets and Trade. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade>. Acesso em 12 de jan. 2015.

VAN DER WESTHUIZEN, L. et al. Fumonisin Contamination and *Fusarium* Incidence in Corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5574-5578, 2003.

VARGAS, E. A. et al. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. **Food Additives Contaminants: Part A**, v. 18, n. 11, p. 981-6, 2001.

VIEGAS, S. et al. Occupational exposure to aflatoxin B1 in swine production and possible contamination sources. **Journal of Toxicology Environmental Health: Part A**, v. 76, n. 15, p. 944-51, 2013.

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

WALSH, J. et al. *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. **Fungal Diversity**, v. 44, n. 1, p. 149-159, 2010.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Jornal Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 14486-90, 1991.

WATANABE, M. et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 1, p. 322, 2011.

WILKE, A. L. et al. Seed Transmission of *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Different Temperature Regimes. **Plant Disease**, v. 91, n. 9, p. 1109-1115, 2007.

WOLOSHUK, C. P.; SHIM, W. B. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 94-109, 2013.

WOLLENWEBER, H. W.; REINKING, O. A. **Die fusarien, ihre beschreibung: schadwirkung und bekämpfung**. P. Parey, 1946.

WORDELL FILHO, J. A. Fusariose ou podridão-de-*Fusarium* na cultura do milho. **Plantio Direto**, v.131, 2012.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Food Science Technology**, v. 5, n. 1, p. 351-72, 2014.