



**Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

OELTON FERREIRA ROSA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DE FUMONISINAS PRODUZIDAS POR *Fusarium verticillioides* EM
GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS EM DIFERENTES AMBIENTES**

**GURUPI - TO
2018**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

OELTON FERREIRA ROSA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DE FUMONISINAS PRODUZIDAS POR *Fusarium verticillioides* EM
GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS EM DIFERENTES AMBIENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Produção Vegetal da Universidade Federal do
Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos

**GURUPI - TO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

R788a Rosa Jr, Oelton Ferreira.

Avaliação de fumonisinas produzidas por *Fusarium verticillioides* em genótipos de milho cultivados em diferentes ambientes. / Oelton Ferreira Rosa Jr. – Gurupi, TO, 2018.

91 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Produção Vegetal, 2018.

Orientador: Gil Rodrigues dos Santos

1. Avaliação de fumonisinas produzidas por *Fusarium verticillioides* em genótipos de milho cultivados em diferentes ambientes. 2. Utilização de diferentes métodos de inoculação na seleção de híbridos de milho à podridão de espigas causada por *Fusarium verticillioides* em diferentes estados brasileiros. 3. Transmissão e incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de genótipos de milho em função do método de inoculação nas espigas. 4. Estudo toxicológico e parâmetros zootécnicos de frangos de corte alimentados com farelo de milho contaminado com fumonisina. I. Título

CDD 635

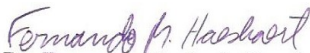
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.


Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).


ATA nº 03/2018


ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE OELTON FERREIRA ROSA JUNIOR, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS


Aos 24 dias do mês de Maio do ano de 2018, às 8:00 horas, no prédio do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, na Sala de defesa da PGPV, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos, do Câmpus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins; Prof. Dr. Fernando Machado Haesbaert, do Câmpus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins; Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar, do Câmpus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins; Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmiento, do Câmpus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins; Prof. Dra. Talita Pereira de Souza Ferreira, do Câmpus Universitário de Gurupi/Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTRADO de OELTON FERREIRA ROSA JUNIOR, intitulada **“AVALIAÇÃO DE FUMONISINAS PRODUZIDAS POR *Fusarium verticillioides* EM GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS EM DIFERENTES AMBIENTES”**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-o ao título de doutor em Produção Vegetal. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Dr. Fernando Machado Haesbaert
Universidade Federal do Tocantins
Primeiro examinador

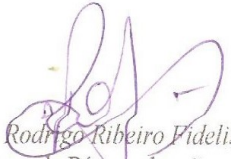

Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar
Universidade Federal do Tocantins
Segundo examinador


Dr. Renato de Almeida Sarmiento
Universidade Federal do Tocantins
Terceiro examinador


Dra. Talita Pereira de Souza Ferreira
Universidade Federal do Tocantins
Quarto examinador


Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 24 de Maio de 2018.


Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

A Deus, pela realização deste sonho que nasceu aos 14 anos de idade! E ainda, por me manter firme aos projetos de evangelização mesmo com tantos compromissos firmados na vida acadêmica e profissional.

A oportunidade de conhecer pessoas, culturas e crescer intelectualmente, nos capacitando a enxergar um mundo de forma mais crítica e responsável. Por estes motivos, especialmente agradeço ao professor Dr. Gil Santos, que através de sua orientação, apoio e confiança, pude ter êxito neste importante processo de formação.

Ao professor Dr. Fernando Haesbaert, que de forma sublime, dedicou-se ao desenvolvimento das análises estatísticas e modelos matemáticos. Muito obrigado!

À Conceição Alves, em memória, querida mãe, que através de seu amor incondicional, pode cuidar, proteger e tornar tudo mais leve e suave em nossas vidas. Te dedico!

À Cynthia Alves, a melhor irmã do mundo!

À Donatil Alves, querida tia que nos abraçou nos momentos que mais precisávamos.

À família Santos Alves, tão importante no início de minha vida acadêmica.

Ao tio Juarez Gonçalves, em memória, responsável mesmo sem saber, pela concretização desta etapa acadêmica tão importante.

A Sarah Modesto, pelas orações, carinho, dedicação, parceria e cumplicidade.

Ao amigo, Diretor de Pesquisa Carlos Raupp o qual promoveu a flexibilidade aos estudos mesmo com tantas responsabilidades numa empresa com tantos desafios. Obrigado!

Ao amigo, fitopatologista Elcio Alves: Pessoa incrível, com inúmeras virtudes e sempre presente!

Aos amigos de trabalho, Francinéia Barbosa, Eliane Silva, Rodrigo Toloy e Gabriela Rossato, que lindamente compreenderam minha dedicação a esta fase tão importante em minha vida.

Ao programa de Pós Graduação da UFT, campus de Gurupi.

Aos amigos Mateus Dalcin, Dalmarcia, Athos, Jhone e Rosangela, parceiros na pós graduação, no laboratório de fitopatologia, que contribuíram em diversos momentos para a realização das pesquisas.

Àqueles que contribuíram direta e indiretamente por esta conquista!

RESUMO GERAL

A cultura do milho é responsável por 40% dos grãos produzidos no país, sendo considerada um dos segmentos mais importantes para a economia do agronegócio brasileiro. Devido ao seu alto valor nutritivo, o milho possui grande suscetibilidade ao crescimento de fungos, com destaque para *Fusarium verticillioides*, que além de causar danos nas raízes, colmos e espigas, é responsável por produzir fumonisinas, um grupo de micotoxinas termoestáveis e possivelmente carcinogênico, ao homem e animais. É sabido que apesar da importância não existem muitas informações associando a influência de diferentes fatores sobre a sua produção, principalmente nas condições tropicais brasileiras. Desta forma, estudos foram realizados com o objetivo geral de avaliar a influência de fatores ambientais, genótipos e métodos de inoculação de *F. verticillioides* na severidade da podridão de espigas, qualidade sanitária das sementes, produtividade do milho, na produção de fumonisinas e histopatologia em frangos de corte. As investigações aqui relatadas foram divididas em quatro capítulos. No primeiro capítulo, avaliou-se o efeito de fatores ambientais, genótipos e métodos de inoculação de *F. verticillioides* na produção de fumonisinas em grãos de milho. No segundo capítulo, comparou-se em locais diferentes métodos de inoculação artificial (spray, injetável) e natural de *F. verticillioides* em dez genótipos de milho pela quantificação da severidade da doença e produtividade. No terceiro capítulo, realizou-se um levantamento da população de *F. verticillioides* através de análise sanitária e transmissão do fungo à campo das plantas para as sementes e das sementes para as plântulas inoculados com diferentes métodos de inoculação. Por fim, o quarto capítulo, avaliou-se na safra de 2015/2016, procedentes de lavouras experimentais contendo cultura de milho, híbridos comerciais inoculados com *F. verticillioides* e determinou-se os parâmetros zootécnicos e histopatológicos em frangos de corte. O delineamento experimental para o primeiro e segundo capítulos, desenvolvidos em campo, foi igualmente realizado nos quatro locais estudados, sendo o de blocos ao acaso em fatorial de 10x3, com três repetições, sendo dez genótipos de milho e três métodos de inoculação. No terceiro capítulo, desenvolvido em laboratório, os experimentos tiveram o delineamento inteiramente casualizado, em fatorial de 10x3 com quatro repetições, sendo dez genótipos de milho e três métodos de inoculação. Utilizou-se as sementes provenientes dos híbridos que foram inoculados pelos três métodos de inoculação. Cada unidade experimental consistiu de um Gerbox contendo 25 sementes. No quarto capítulo, o experimento foi conduzido no aviário experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, no campus de Araguaína-TO. Foram utilizados 160 pintos de um dia, frangos de corte da linhagem Cobb 500, distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com dois tratamentos (ração basal de milho com ausência de fumonisina e a ração de grãos de milho com fumonisina), com 10 repetições contendo 8 aves cada. Todas as análises da concentração fumonisinas foram realizadas no Laboratório de Micotoxologia (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e utilizou-se a metodologia de quantificação denominada LC-MS/MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) POP 45. Com relação aos resultados obtidos, para o primeiro capítulo, concluiu-se que não foi possível assegurar que grãos sintomáticos e assintomáticos quanto à infecção de *Fusarium verticillioides*, estejam livres de contaminação por fumonisinas e os métodos de inoculação por aspersão e o inoculado no centro da espiga não influenciaram em diferentes concentrações de fumonisinas. A produção de fumonisinas nos grãos de milho é potencializada por condições ambientais de temperatura elevada e pela susceptibilidade do genótipo e alta severidade de *F. verticillioides*. Nestas condições, houve tendência de produzir maiores teores de fumonisinas para a maioria dos genótipos avaliados. A produtividade de grãos foi reduzida pela incidência de *F. verticillioides*. Para o segundo capítulo, verificou-se que o método de inoculação artificial através de aspersão no estilo-estigma e o injetável no centro da espiga, proporcionaram maior intensidade da

podridão da espiga, possibilitando diferenciar do método natural. Em Planaltina, verificou-se que o método de inoculação por aspersão resultou em maior severidade da doença, causada por *Fusarium verticillioides* do que o método de inoculação injetável no centro da espiga. Os híbridos de milho P4285, DKB390PRO2 e DKB310PRO2 foram os mais resistentes à podridão da espiga, nos quatro ambientes, enquanto que o híbrido 32R48YH apresentou a maior severidade da doença. O método de inoculação artificial foi o mais eficiente em ambientes de climas amenos e esta informação é importante na padronização do método para seleção e caracterização de genótipos de milho em programas de melhoramento. Para o terceiro capítulo, concluiu-se que as sementes oriundas de espigas inoculadas com spray apresentaram maior grau de incidência do patógeno, sendo este, o método mais eficiente de inoculação artificial de *F. verticillioides* na fase R1 para a avaliação de emergência de sementes. Os híbridos 32R48YH e o DKB240PRO2 tiveram o maior nível de infecção por *F. verticillioides* pois obtiveram a maior incidência do fungo. Enquanto que os híbridos P3630H e P4285H demonstraram ser os mais resistentes, pois obtiveram as menores incidência do patógeno. Os híbridos P3250, 32R48YH e 30K75Y apresentaram menor percentagem de emergência quando a inoculação foi realizada pelo método injetável enquanto que os híbridos P4285H, 30K75Y e DOW30A37PW apresentaram menor percentagem de emergência quando a inoculação foi realizada pelo método spray. A transmissão da semente para a planta foi confirmada pela análise molecular. Verificou-se que, apesar das plantas não terem apresentado sintomas visíveis, pôde-se confirmar que houve infecção latente. A técnica de PCR foi capaz de revelar a presença do patógeno nas sementes de milho em menor nível de incidência avaliado (1%). No quarto capítulo, foi concluído que a concentração de 2,78µg/g de fumonisina determinada na ração não foi suficiente para provocar alterações nos parâmetros zootécnicos (peso das aves e no consumo de ração) e histopatológico (tecidos do intestino, fígado e coração) de aves da linhagem COBB 500, alimentadas até o 21º dia. As análises dos parâmetros zootécnicos e histopatológicos permitiram revelar concentrações mínimas e seguras de fumonisina que não provocaram danos toxicológicos em aves da linhagem COBB 500. Este é um importante parâmetro que pode contribuir nas etapas de produção de carnes e de produtos avícolas.

Palavras-chave: *Zea mays*; podridão da espiga; micotoxinas; sanidade de sementes, histopatologia.

ABSTRACT GERAL

The corn crop is responsible for 40% of the grains produced in the country, being considered one of the most important segments for the Brazilian agribusiness economy. Due to its high nutritional value, maize is highly susceptible to fungus growth, especially *Fusarium verticillioides*, which besides causing damage to the roots, stalks and ears, is responsible for producing fumonisins, a group of thermostable mycotoxins and possibly carcinogenic, to man and animals. It is known that despite the importance, there is not much information associating the influence of different factors on its production, mainly in Brazilian tropical conditions. Studies were carried out with the general objective of evaluating the influence of environmental factors, genotypes and methods of inoculation of *F. verticillioides* on the severity of ear rot, seed quality, maize productivity, fumonisin production and histopathology in broilers. The investigations reported here were divided into four chapters. In the first chapter we evaluated the effect of environmental factors, genotypes and methods of inoculation of *F. verticillioides* on the production of fumonisins in corn grains. In the second chapter, was compared in different locations, methods of artificial (spray and injectable) and natural inoculation of *F. verticillioides*

in ten maize genotypes by quantification of disease severity and productivity. In the third chapter a population of *F. verticillioides* was carried out through sanitary analysis and transmission of the fungus from plants to the seeds and from seeds to the seedlings inoculated with different methods of inoculation. Finally, the fourth chapter evaluated the harvest of 2015/2016 coming from crops containing commercial hybrids corn inoculated with *F. verticillioides* and the zootechnical and histopathological parameters were determined in broilers. The experimental design for the first and second chapters, conducted in the field, was also performed in the four localities studied, being a randomized block design in a 10x3 factorial scheme, with three replications, being ten maize genotypes and three inoculation methods. In the third chapter the experiments had a completely randomized design, in a 10x3 factorial scheme with four replications, being ten maize genotypes and three inoculation methods. Were used seeds from the hybrids that were inoculated by the three methods of inoculation. Each replicate consisted of a Gerbox containing 25 seeds. In the fourth chapter, the experiment was conducted in the experimental aviary of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the Federal University of Tocantins, on the campus of Araguaína-TO. A total of 160 broilers of Cobb 500 lineage (of one day old), were used in a completely randomized experimental design with two treatments (basal corn meal with no fumonisin and corn grain feed with fumonisin), with 10 replicates containing 8 broiler chicks each. All fumonisin concentration analyzes were performed at the Laboratory of Mycotoxology (LAMIC), Federal University of Santa Maria (UFSM), and the quantitative methodology called LC-MS / MS (Liquid Chromatography Mass Spectrometry) POP 45 was used. Regarding the results obtained, for the first chapter, it was concluded that it was not possible to assure that symptomatic and asymptomatic grains for *Fusarium verticillioides* infection are free from fumonisin contamination and the methods of inoculation by spraying and inoculation in the center of the ear did not influence different concentrations of fumonisins. Fumonisin production in maize grains is potentiated by high temperature environmental conditions and the susceptibility of the genotype and high severity of *F. verticillioides*. Under these conditions, there was a tendency to produce higher levels of fumonisins for most genotypes evaluated. The grain yield was reduced by the incidence of *F. verticillioides*. For the second chapter, it was verified that the method of artificial inoculation by sprinkling in the style-stigma and the injectable in the center of the spike, provided a greater intensity of the rot of the ear, allowing to differentiate of the natural method. In Planaltina, it was verified that the spray inoculation method resulted in a greater severity of the disease, caused by *F. verticillioides* than the injectable inoculation method in the center of the spike. Hybrids of maize P4285, DKB390PRO2 and DKB310PRO2 were the most resistant to ear rot in the four environments, while the hybrid 32R48YH showed the highest severity of the disease. The artificial inoculation method was the most efficient in mild climate environments and this information may be important in the standardization of the method for selection and characterization of maize genotypes in breeding programs. For the third chapter, it was concluded that the seeds from ears inoculated with spray presented a higher level of incidence of the pathogen, being this the most efficient method of artificial inoculation of *F. verticillioides* in the R1 phase for seed emergence evaluation. The hybrids 32R48YH and DKB240PRO2 had the highest level of infection by *F. verticillioides* because they had the highest incidence of the fungus. While the hybrids P3630H and P4285H proved to be the most resistant because they obtained the lowest incidence of the pathogen. Hybrids P3250, 32R48YH and 30K75Y presented a lower percentage of emergence when the inoculation was performed by the injectable method, while the hybrids P4285H, 30K75Y and DOW30A37PW showed a lower percentage of emergence when the inoculation was performed by the spray method. The transmission of the seed to the plant was confirmed by molecular analysis. It was found that, although the plants showed no visible symptoms, it was possible to confirm that there was a latent infection. The PCR technique was able to reveal the presence of the pathogen in maize

seeds at a lower incidence level (1%). In the fourth chapter, it was concluded that the concentration of 2.78 µg/g of fumonisin determined in the diet was not sufficient to cause alterations in the zootechnical parameters (broilers weight and feed consumption) and histopathological parameters (intestinal, liver and heart tissues) of broilers of the COBB 500 lineage, fed until the 21st day. Analyzes of the zootechnical and histopathological parameters allowed to reveal minimum and safe concentrations of fumonisin that did not cause toxicological damages in broilers of Cobb 500 lineage. This is an important parameter that can contribute in the stages of production of meat and broiler chicks products.

Keywords: *Zea mays*; ear rot; mycotoxins; seed health, histopathology.

SUMÁRIO

<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	12
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
1. AVALIAÇÃO DE FUMONISINAS PRODUZIDAS POR <i>Fusarium verticillioides</i> EM GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS EM DIFERENTES AMBIENTES	17
1.1 <u>RESUMO</u>	18
1.2 <u>ABSTRACT</u>	18
1.3 <u>INTRODUÇÃO</u>	19
1.4 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	20
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
1.6 <u>CONCLUSÃO</u>	36
1.7 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	37
1.8 <u>TABELAS SUPLEMENTARES</u>	40
2. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO NA SELEÇÃO DE HÍBRIDOS DE MILHO À PODRIDÃO DE ESPIGAS CAUSADA POR <i>Fusarium verticillioides</i> EM DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS	43
2.1 <u>RESUMO</u>	43
2.2 <u>ABSTRACT</u>	44
2.3 <u>INTRODUÇÃO</u>	44
2.4 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	46
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
2.6 <u>CONCLUSÃO</u>	56
2.7 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	57
3. TRANSMISSÃO E INCIDÊNCIA DE <i>Fusarium verticillioides</i> EM SEMENTES DE GENÓTIPOS DE MILHO EM FUNÇÃO DO MÉTODO DE INOCULAÇÃO NAS ESPIGAS	60
3.1 <u>RESUMO</u>	60
3.2 <u>ABSTRACT</u>	60
3.3 <u>INTRODUÇÃO</u>	61
3.4 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	62
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
3.6 <u>CONCLUSÃO</u>	75
3.7 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	75
4. ESTUDO TOXICOLÓGICO E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM FARELO DE MILHO CONTAMINADO COM FUMONISINA	79
4.1 <u>RESUMO</u>	79
4.2 <u>ABSTRACT</u>	79

4.3	<u>INTRODUÇÃO</u>	80
4.4	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	81
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.6	<u>CONCLUSÃO</u>	90
4.7	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	91

INTRODUÇÃO GERAL

A produção brasileira de milho é de cerca de 80 milhões de toneladas de grãos por ano, classificando o país como um dos maiores produtores mundiais e exportadores deste cereal (FAO, 2017). O milho é um cereal com uma grande possibilidade de uso, tal como para alimentação animal, para uso industrial, e também, para o consumo humano. Estima-se que no Brasil cerca de 70% a 80% do milho produzido é dirigido à alimentação animal, tal como a indústria de rações, 51% são direcionados ao setor avícola, 33% à suinocultura, 11% à pecuária, especialmente a leiteira, e 5% para outros animais. No Brasil, este cereal é utilizado para preparar pratos típicos como bolo de milho, mingau de milho, "angu" (uma espécie de mingau firme e salgado), "canjiquinha" (um prato salgado à base de grãos de milho quebrados) dentre outros (QUEIROZ et al., 2012).

Diante de um consumo extremamente expressivo, a qualidade dos grãos tem importância fundamental para a segurança alimentar dos consumidores, e a baixa incidência de micotoxinas nos grãos representa uma característica de grande relevância para a cultura. Devido à importância econômica desta cultura e adoção de tecnologias pelos produtores, a demanda por sementes de milho de alta qualidade aumentou, fazendo com que as empresas de sementes adotem muitas vezes padrões de qualidade mais restritos do que os estabelecidos somente pelo sistema de certificação (FANTAZZINI et al, 2016).

Dentre as doenças mais importantes e de difícil controle da cultura do milho, estão às podridões de espiga que reduzem a quantidade e qualidade dos grãos (WHITE, 1999; REID et al., 1999; PRESELLO et al., 2008). As principais doenças associadas ao milho, no Brasil, são causadas por fungos, sendo representado principalmente pelo gênero *Fusarium*, que além de atacarem as raízes e colmo da planta, são os grandes causadores de grãos ardidos que comprometem a produção e na maioria dos casos são identificados apenas nos centros de processamentos. Além disso, a espécie *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (teleomorfo *Giberella fujikuroi* Sawada) (RHEEDER et al., 2002) são os maiores produtores de fumonisinas.

A fumonisina é um metabólico tóxico secundário produzidas principalmente por *F. verticillioides*, fungo predominante na cultura milho (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; THIEL et al., 1992). Essa espécie é capaz de produzir níveis elevados de fumonisinas, possui ampla distribuição geográfica e ocorrência frequente em grãos de milho (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). Mais de 28 diferentes tipos de fumonisinas já foram isolados, sendo a toxina predominante a fumonisina B1 (FB1), que também apresenta maior toxicidade.

A FB1 tem sido associada com baixo desempenho, aumento do peso relativo de vísceras e hepatite tóxica em aves domésticas (KUBENA et al., 1995).

O mecanismo de ação das fumonisinas está relacionado com o bloqueio na síntese dos esfingolípídeos, substância importante para a integridade da membrana celular e transporte iônico através das células. Os esfingolípídeos são predominantes no sistema nervoso central e periférico, principalmente como lipídeo da mielina, estando localizados nos oligodendrócitos e células de Schwann (WANG et al., 1991).

Os produtos base das rações, como os grãos, podem apresentar alto risco de contaminação por micotoxinas nos diferentes estágios da produção, como na colheita, processamento e armazenamento dos mesmos. Dependendo do nível de contaminação dos grãos e do período de exposição dos animais, as micotoxinas podem afetar seriamente a saúde e o seu desempenho, causando significativas perdas econômicas na indústria animal. Apesar da importância atribuída as fumonisinas, existem poucos relatos sobre o controle genético da incidência de fumonisina testados em híbridos de milho plantados em diferentes ambientes brasileiros, correlacionando diferentes níveis de severidades bem como formas de inoculação e ou sua transmissibilidade. Além disso, pouco se sabe quanto à concentração mínima de fumonisina em ração de milho capaz de causar danos, zootécnicos ou histopatológicos, em aves.

Um importante ponto a ser considerado é sobre os problemas acarretados por esta classe de micotoxina, onde no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu os limites máximos (BUTRÓN et al., 2006) para: (i) milho em grão: 5µg/g; (ii) farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha: 1,5µg/g; e (iii) amido de milho e outros produtos à base de milho: 1µg/g (BRASIL-ANVISA, 2012). Esses limites pré-estabelecidos possuem grande importância, pois são substâncias de grande estabilidade química e térmica, podendo persistir nos alimentos ou rações mesmo após a inativação dos fungos por meio de processos de industrialização e, ao serem metabolizadas pelos animais, podem ocorrer em carne, ovos e leite, constituindo um risco para a saúde humana (CAST, 2003). Desta forma, este trabalho teve como objetivo Avaliar a fumonisina produzida por *Fusarium verticillioides* em grãos de milho em diferentes ambientes, genótipos e métodos de inoculação e histopatologia em frangos de corte.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos** - Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília-DF. Nº 46 – 09/03/11 – Seção 1 – p.66. Resolução nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011.
- BUTRÓN, A.; SANTIAGO, R.; MANSILLA, P.; PINTOS-VARELLA, C.; ORDÁS, A.; MALVAR, R.A. Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.16, p.6113-6117, 2006.
- CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa., n.139, 2003, 191p.
- FANTAZZINI, T. B.; GUIMARÃES, R. M.; CLEMENTE, A. da C. S.; CARVALHO, E. R.; MACHADO, J. da C.: *Fusarium verticillioides* INOCULUM POTENTIAL AND ITS RELATION WITH THE PHYSIOLOGICAL STORED CORN SEEDS QUALITY. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 32, n. 5, p. 1254-1262, Sept./Oct. 2016.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em 03 nov. 2017.
- KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; FLETCHER, O. J. Influence of ochratoxin A and vanadium on various parameters in growing chicks. **Poultry Science**, v. 65, p. 1671-1678, 1995.
- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.
- PRESELLO, D. A.; BOTTA, G.; IGLESIAS, J.; EYHÉRABIDE, G. H. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. **Crop Protection**, v. 27, p. 572-576, 2008.
- QUEIROZ, V. A. V. et al. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 28, n. 1, p. 83-86, May 2012.
- REID, L. M.; NICOL, R.W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J. D.; YOUNG, J. C.; STEWART, D. W.; SCHAAF SMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Iowa, v. 89, p. 1028-1037, 1999.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F.; VISNER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**. 2002; 68, 2101 e 2105.
- RHEEDER, J.P. et al. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.68. p.2101-2105, 2002.
- THIEL, P.G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLUM, W. C. A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**. v.1, 17:3–9.1992.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 266, n. 22, p. 486-490, Aug. 1991.

WHITE, D. G. *Compendium of corn diseases*. 3th Ed. **The American Phytopathological Society**. APS Press. 1999.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliação de fumonisina produzida por *F. verticillioides* em grãos de milho em diferentes ambientes, genótipos e métodos de inoculação;

Utilização de diferentes métodos de inoculação na avaliação de híbridos de milho à podridão de espigas causada por *F. verticillioides* em diferentes estados brasileiros.

Transmissão e incidência de *Fusarium verticillioides* em genótipos de milho em função do método de inoculação nas espigas.

Estudo toxicológico e parâmetros zootécnicos de frangos de corte alimentados com farelo de milho contaminado com fumonisina.

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DE FUMONISINAS PRODUZIDAS POR *Fusarium verticillioides* EM GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS EM DIFERENTES AMBIENTES

1.1 RESUMO

As micotoxinas são substâncias tóxicas capazes de causar intoxicação aguda ou crônica em humanos e animais. As fumonisinas são micotoxinas produzidas principalmente pelo fungo *Fusarium verticillioides*, o principal patógeno do milho. Até o momento, 28 compostos análogos foram identificados como fumonisinas, sendo a fumonisina B1 (FB1) o composto mais toxigênico para animais e humanos. Este análogo é o mais frequentemente encontrados em alimentos, respondendo por cerca de 70% da contaminação natural da fumonisina e pouco se sabe sobre a dinâmica da produção destas micotoxinas por *F. verticillioides*. O objetivo deste trabalho foi avaliar alguns fatores que podem levar a uma alta produção de fumonisinas por *F. verticillioides* em grãos de milho, através do método de inoculação de patógenos com diferentes genótipos cultivados em quatro estados brasileiros. Foram conduzidos experimentos com a cultura do milho em 2015/2016, em campos experimentais de milho, localizados em áreas distintas do Brasil, nas cidades de Gurupi - TO, Toledo - PR, Planaltina - DF e Itumbiara - GO. Os ensaios com a mesma metodologia foram implementados nos quatro locais, elaborados com delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema fatorial 10 x 3, com três repetições, sendo 10 genótipos de milho e 3 métodos de inoculação. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que não foi possível assegurar que os grãos sintomáticos e assintomáticos da infecção por *F. verticillioides* estejam livres de contaminação por fumonisina. Alta severidade nos grãos de *F. verticillioides* infectados nem sempre mostram altas concentrações de fumonisinas. Ambientes com temperaturas mais altas podem favorecer a produção de altas concentrações de fumonisina em híbridos de milho. Os métodos de inoculação em spray e a inoculação no centro da espiga não apresentaram diferença na concentração de fumonisinas.

Palavra-chave: *Zea mays*; micotoxinas; temperatura.

1.2 ABSTRACT

Mycotoxins are toxic substances capable of causing acute or chronic intoxication in humans and animals. Fumonisins are mycotoxins produced mainly by the fungus *Fusarium verticillioides*, the main pathogens of maize. To the date, 28 analogous compounds have been identified as fumonisins with fumonisin B1 (FB1) being the most toxigenic compound to animals and human, most frequently found in food, accounting for about 70% of the natural fumonisin contamination and little is known about the dynamics of the production of these mycotoxins by *F. verticillioides*. The aim of this work was to evaluate some factors that may lead to high fumonisin production by *F. verticillioides* in maize grains, correlating the pathogen inoculation method with different genotypes grown in four Brazilian states. Experiments were conducted in the corn crop in 2015/2016, in experimental corn fields, located in distinct areas of Brazil, in the cities of Gurupi - TO, Toledo - PR, Planaltina -DF, and Itumbiara - GO. The trials with the same methodology were implemented in the four locations described in the experimental design of a randomized block design, in a 10 x 3 factorial scheme, with three replicates, being 10 maize genotypes and 3 inoculation methods. According to the results obtained it can be concluded that it was not possible to assure that symptomatic and asymptomatic grains for *F. verticillioides* infection are free from fumonisin contamination. High grain severity from *F. verticillioides* infected does not always show high concentrations

of fumonisins. Environments with higher temperatures may influence the production of high concentrations of fumonisin in maize hybrids. Spray inoculation methods and inoculation at the center of the ear did not show different in the concentrations of fumonisins.

Keywords: *Zea mays*; mycotoxins; temperature.

1.3 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de milho (*Zea mays*) no mundo, gerando na safra de 2016/2017, mais de 92 milhões de toneladas (CONAB, 2017). Apesar disso é uma cultura, que dentre vários fatores, é afetada por muitas doenças que levam a uma baixa produtividade e grande perda econômica. As principais doenças associadas ao milho, no Brasil, são causadas por fungos, sendo representados principalmente pelo gênero *Fusarium*, que além de atacarem as raízes e colmos da planta, são os grandes causadores de grãos ardidos que comprometem a produção e são identificados apenas na entrega dos grãos nos centros de processamentos (DOOHAN *et al.*, 2003). Fungos do gênero *Fusarium*, sobretudo a espécie *F. verticillioides*, produzem micotoxinas, com destaque para a fumonisina, que são encontradas frequentemente em milho e derivados (WHO, 2002). Essas toxinas são encontradas em diferentes regiões e predominam em climas tropicais e subtropicais como no Brasil em que o desenvolvimento de fungos é favorecido pelas condições ambientais como alta temperatura e elevada umidade (MALLMANN & DILKIN, 2007).

As principais classes de fumonisina são FB1, FB2 e FB3 (YOCHIZAWA *et al.*, 1996). Até o presente, foram identificados 28 compostos análogos designados por fumonisinas, sendo a fumonisina B1 (FB1) o composto com maior toxicidade e mais frequentemente encontrado em alimentos, constituindo cerca de 70% da contaminação natural de fumonisinas (DOMIJAN, 2012). Essas toxinas provocam leucoencefalomalácia em cavalos e coelhos (ROSS *et al.*, 1992), inchaço e edema pulmonar em suínos (DESJARDINS *et al.*, 1998) e câncer hepático em roedores (DESJARDINS, 2006). Os efeitos da exposição de seres humanos às fumonisinas pela dieta ainda permanecem incertos, porém a ingestão de FB1 vem sendo correlacionado com a incidência de câncer esofágico em diversos locais do mundo como China (CHU & LI, 1994), África (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; RHEEDER *et al.*, 1992), Irã (ALIZADEH *et al.*, 2012), Argentina (SOLFRIZZO *et al.*, 2004) e Brasil (WESTHUIZEN *et al.*, 2003). Além disso, a FB1 é classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como substância pertencente ao grupo 2B, ou seja, possível carcinógeno em humanos (IARC, 2002).

Devido aos problemas acarretados por esta classe de micotoxina, órgãos internacionais estabeleceram limites máximos de concentração de fumonisinas no milho destinado a produção de alimentos e rações (BUTRÓN *et al.*, 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu os limites máximos para: (i) milho em grão: 5 µg/g; (ii) farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha: 1,5 µg/g; e (iii) amido de milho e outros produtos à base de milho: 1 µg/g (ANVISA, 2011). Esses limites pré-estabelecidos possuem grande importância pois são substâncias de grande estabilidade química e térmica, podendo persistir nos alimentos ou rações mesmo após a inativação dos fungos por meio de processos de industrialização e, ao serem metabolizadas pelos animais, podem ocorrer em carne, ovos e leite, constituindo um risco para a saúde humana (CAST, 2003).

Regiões de clima tropical como Brasil, Argentina e África do Sul, há carência em pesquisas que visem a resistência de genótipos do milho a infecção causada por *F. verticillioides* e ao acúmulo de fumonisina, culminando em um limitado número de genótipos resistentes tanto a infecção do patógeno como ao acúmulo desta micotoxina (AFOLABI *et al.*, 2007; SAMPIETRO *et al.*, 2009). No Brasil, a contaminação de alimentos por fumonisina tem sido tratada por diversos autores, de maneira especial no milho e seus derivados (BITTENCOURT *et al.*, 2005; 2009; BORDIN *et al.*, 2014). Contudo, pouco se sabe sobre a dinâmica da produção dessas micotoxinas por *F. verticillioides*, não havendo até o momento estudos que correlacionem tais níveis de fumonisina.

A falta de um eficiente monitoramento dos índices de micotoxinas nos grãos fazem com que altas concentrações de fumonisina sejam passadas despercebidas e processadas junto aos grãos. Além disso, *Fusarium* é um microrganismo que pode ser endofítico e pouco se sabe sobre a relação entre a presença do fungo em grãos de milho e seus índices previstos de fumonisinas. Desta forma, podem-se adotar práticas de produção que diminuam os níveis desta micotoxina nos grãos de milho. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos fatores ambientais, genótipos e métodos de inoculação de *F. verticillioides* na produção de fumonisinas em grãos de milho.

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

Locais dos experimentos e tratamentos:

Os experimentos foram conduzidos na safra de 2015/2016, em lavouras experimentais de milho, localizados em áreas distintas do Brasil, nos municípios de Gurupi, no Tocantins

(TO), Toledo, no Paraná (PR), Planaltina, no Distrito Federal (DF) e Itumbiara, em Goiás (GO), conforme localização demonstrada na Figura 1.

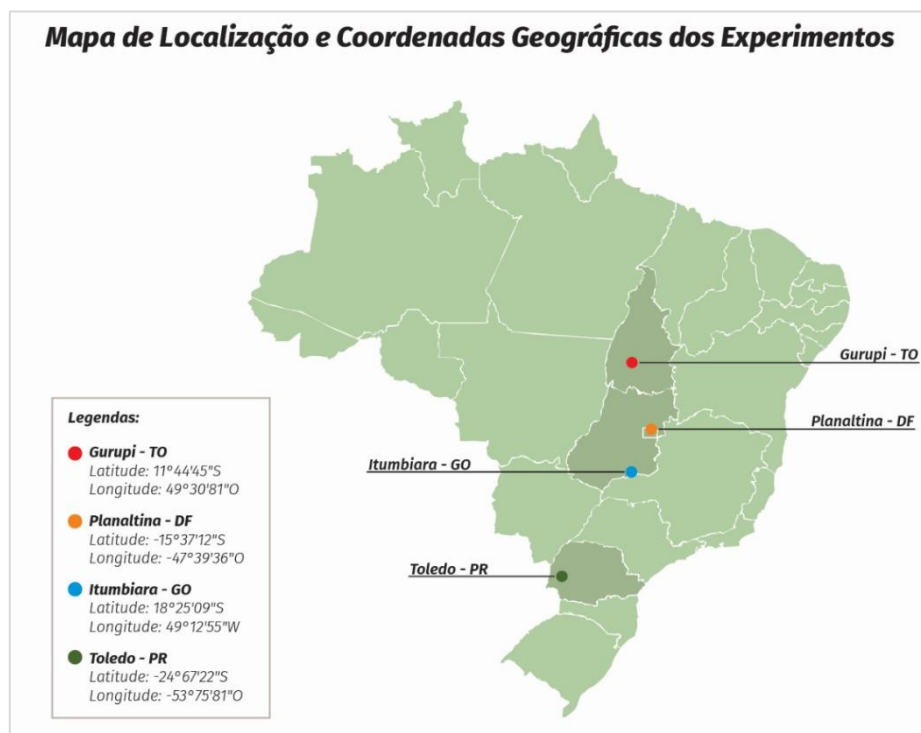


Figura 1. Mapa de localização e coordenadas geográficas dos experimentos.

Gurupi está inserido no Bioma Cerrado e segundo a classificação de Köppen & Geiger (1928), o clima da região é Aw, definido como tropical quente e úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno e altitude de 278 m. O período de instalação e condução do experimento foi de fevereiro a junho de 2016. Toledo está inserido no Bioma Mata Atlântica e altitude de 550 m. O clima da região é Cfa, definido como clima subtropical, com verões quentes, geadas pouco frequentes, sem estação seca definida. O período de instalação e condução do experimento foi de fevereiro a julho de 2016. Planaltina está inserido no Bioma Cerrado e tem altitude de 1175 m. O clima da região é Aw, definido como tropical quente e úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. O período de condução foi de dezembro de 2015 a abril de 2016. Itumbiara está inserido no Bioma Cerrado e tem altitude de 448 m; o clima da região é Aw, definido como tropical quente e úmido com estação chuvosa no verão. O período de instalação deste experimento foi de dezembro de 2015 a abril de 2016.

Nos quatro locais experimentais realizou-se a implantação de uma miniestação meteorológica capaz de registrar as variáveis climáticas e proporcionar um microclima favorável ao desenvolvimento da doença nas espigas, sendo a sua instalação iniciada a partir da inoculação, indo do florescimento até a colheita. As variáveis climáticas de temperaturas

máximas e mínimas (°C) e precipitações (mm) dos quatro locais foram monitoradas e registradas durante o período que foi da inoculação do patógeno até a colheita dos grãos (Figura 2).

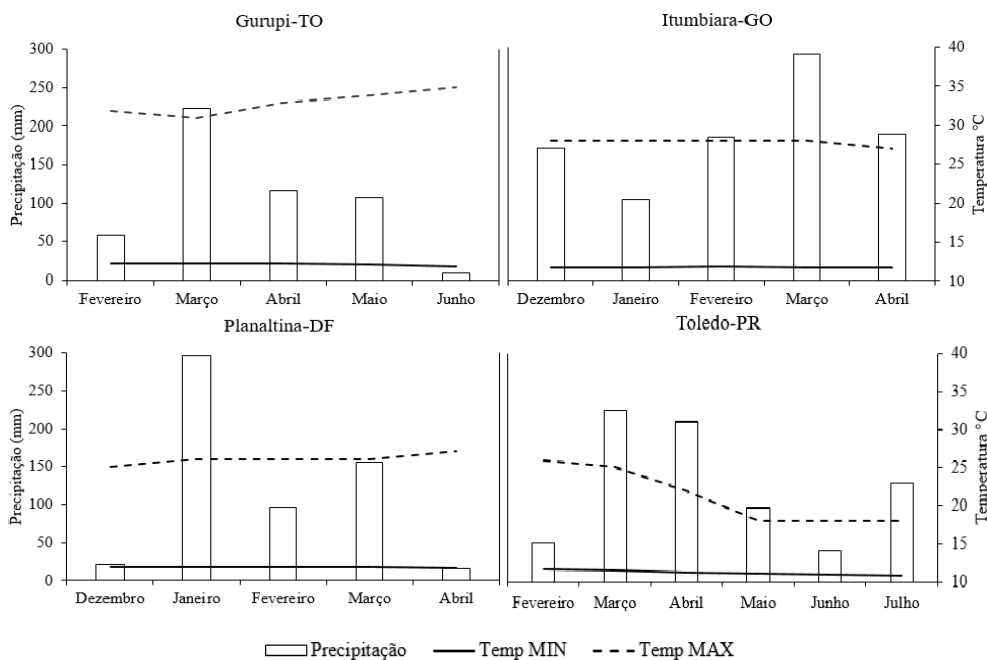


Figura 2. Variáveis climáticas representadas pelas temperaturas máxima e mínima (°C) e precipitação (mm) verificadas em Gurupi, Tocantins (TO); Itumbiara, Goiás (GO); Planaltina, Distrito Federal (DF); Toledo, Paraná (PR), durante a condução do experimento de milho.

O delineamento experimental foi igualmente realizado nos quatros locais estudados, sendo o de blocos ao acaso em esquema fatorial de 10 x 3, com três repetições, sendo dez genótipos de milho e três métodos de inoculação. Os dez híbridos de milho utilizados foram: P30K75Y, P32R48YH, P3250, P3340YHR, P3630H, P4285H, DKB240PRO2, DKB390PRO2, DKB310PRO2 e DOW30A37PW.

Os três métodos de inoculação foram: (i) método injetável da suspensão de conídios no centro da espiga, simulando a infecção das espigas de milho pelo fungo a partir de danos físicos causados, em sua maioria, por insetos; (ii) método da pulverização da suspensão de conídios na forma de spray sob os estilo-estigmas, simulando a disseminação natural dos esporos que chegam até os estigmas das espigas; e (iii) método natural, onde não houve nenhum tipo de inoculação artificial, sendo este a testemunha. Após a inoculação, um pacote de papel foi utilizado para cobrir a espiga com o objetivo de proporcionar um melhor ambiente para o desenvolvimento do patógeno, bem como, servir de barreira para interferência de outras parcelas.

Para inoculação de *F. verticillioides* nas espigas, uma suspensão desse fungo foi obtida a partir do seu cultivo em meio de cultura BDA, sendo que em cada local utilizaram-se isolados da espécie de sua própria região. Padronizou-se a inoculação de suspensão com 5×10^5 conídios mL^{-1} .

Cada unidade experimental (parcela) foi composta por 2 linhas de 4,5 metros e 30 plantas por cada linha. Nos tratamentos com inoculação todas as plantas das linhas foram avaliadas, exceto as duas primeiras e duas últimas plantas. Em ambos os métodos artificiais, realizou-se a inoculação de 2 mL da suspensão por espiga quando as plantas estavam em estágio fenológico R1 (florescimento e polinização), período de maior susceptibilidade a infecção (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). Parcelas de igual tamanho foram destinadas à testemunhas (infecção natural).

Isolamento do patógeno, Postulados de Koch e identificação molecular:

Para o isolamento do patógeno, sementes sintomáticas de cada local estudado foram analisadas quanto à presença de *F. verticillioides*. Procedeu-se a repicagem do fungo em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200 g batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar em 1 L de água destilada). Os isolados foram identificados com base em sua morfologia típica, que se caracterizou pela presença de longas cadeias de microconídios produzidos em monofialides (TAPIA & AMARO, 2014). Para purificação das colônias dos isolados, foi utilizada a técnica da cultura monospórica (MENEZES, 2011), em que uma suspensão de conídios do fungo foi colocada em 5 mL de água destilada e esterilizada, em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar (AA: 20 g de ágar em 1 L de água destilada). Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, foi realizado a observação dos conídios germinados, em microscópio ótico. Os conídios que germinaram, isoladamente foram repicados para tubos de experimento e placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para posteriores trabalhos de inoculações. Os Postulados de Koch foram feitos com inoculações da suspensão do fungo contendo 5×10^5 conídios mL^{-1} em plantas saudáveis do híbrido 32R48YH. As inoculações foram realizadas de duas formas, uma nos estilo-estigmas e a outra no centro da espiga, quando as plantas estavam em estágio fenológico R1 e após 25 dias da inoculação, todas as espigas foram colhidas para identificação do patógeno presente nos grãos.

A partir dos isolados fúngicos crescidos em meio BDA foi feita a extração do DNA, de acordo com o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990). Foi utilizada um total de oito amostras para a análise molecular, sendo, duas procedências por cada local, nos municípios de

Gurupi, Itumbiara, Planaltina e Toledo. Cerca de 1 mg de micélio do *Fusarium* foi homogeneizado em um microtubo de centrífuga de 2,0 mL com auxílio de um pistilo na presença de 600 µL do tampão de extração CTAB 2% (NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl pH 8-100 mM e Polyvinylpyrrolidone 1%), acrescido de 0,2% de β -mercaptoetanol. Depois de homogeneizado, a suspensão foi incubada à 65 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi centrifugada a 14000 RPM, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a 14000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL e logo depois foi adicionado igual volume de isopropanol gelado a -20 °C. A mistura foi homogeneizada e mantida a -20°C por 30 minutos e após este período foi centrifugada a 14000 RPM por 15 minutos para a precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e diluído em 50µL de água Mili-Q. O DNA foi armazenado a -20°C até ser utilizado em reação de PCR.

A reação de PCR para detecção do *F. verticillioides* foi feita com uma mistura de 5,0µL do tampão (100 mM TrisHCl pH 8,5; - 500 mM KCl 1X), 1,0 µL de dNTPs (0,2 mM), 1, 5µL de MgCl₂, 2,5 µL dos oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso (0,5 mM), 1,0 µL da enzima TaqDNA polimerase (LGC) (5U/µL), 5,0 µL de DNA total e o volume final da reação foi ajustado com água Mili-Q para 50,0 µL. Foram utilizados os primers VER1 e VER2, descritos por Mulè *et al.* (2004). O regime do termociclador para essa reação foi de 95°C por 5 minutos, e 25 ciclos de 1,5 minutos a 95°C, 1,5 minutos a 62°C, 1,5 minutos a 72°C, com uma etapa final para extensão de 72°C por 10 minutos. O produto desta amplificação foi submetido a eletroforese convencional em gel de agarose 1% e visualizado em transluminador UV. Isolados da mesma amostra submetida a análise de PCR foram enviados para o Laboratório Agrônômica, para uma segunda análise de PCR e sequenciamento, para confirmação da espécie.

Avaliação dos experimentos:

Quando os genótipos estavam na fase fenológica R6, caracterizada como maturação fisiológica, iniciou-se o monitoramento da umidade dos grãos até atingir o nível de 17%. Em seguida, foi colhido um total de 150 espigas, sendo coletadas 50 espigas por cada tratamento de inoculação. Posteriormente, as espigas foram dispostas no secador automatizado para que os grãos atingissem umidade de 13%, para em seguida, proceder-se a debulha. Antes da debulha,

as espigas foram avaliadas quanto à severidade do fungo e na sequência, os grãos foram debulhados e submetidos a análises da massa de grãos e do teor da micotoxina fumonisinas B1 e B2.

A avaliação da severidade da doença foi feita de forma visual e comparativa onde foi atribuída uma nota de acordo com os aspectos das espigas (AGROCERES, 1996) e os híbridos que receberam notas de 1 a 3 foram classificados como de alta a mediana resistência. Os que receberam notas de 4 a 6 foram classificados como de mediana susceptibilidade e os híbridos que receberam notas de 7 a 9, foram classificados como de mediano a altamente susceptíveis. A avaliação da massa de mil grãos, em gramas, foi realizada logo após a debulha das espigas, contabilizando mil grãos de cada linha do tratamento, para todas as repetições e pesado em balança calibrada. Já a quantificação de fumonisina (FB1 e FB2) foi realizada no Laboratório de Micotoxologia (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em LC-MS/MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) POP 45.

Análises estatísticas:

Anteriormente à análise de variância, os dados foram verificados quanto ao atendimento dos pressupostos do modelo matemático de normalidade dos erros pelo teste de Shapiro-Wilk (Shapiro-Wilk, 1967), e homogeneidade de variância dos erros pelo teste de Batlett (Batlet, 1937). Quando os dados não atenderam algum destes pressupostos, foram transformados pela metodologia de Box-Cox. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância para cada local e posterior análise de variância conjunta de todos os locais, e em seguida, ao teste Skott e Knott (Skott e Knott, 1974) para a comparação de médias para os fatores e desdobramentos de interações significativas. Os dados de fumonisina foram correlacionados com os valores de massa de mil grãos, severidade, temperatura máxima e mínima.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises de variância:

De acordo com a análise de variância (Tabela Suplementar 1) observou-se significância na interação entre tratamentos e ambientes. Sendo assim, realizou-se em cada ambiente, de forma separada para severidade e massa de mil grãos. A interação entre inoculação e genótipo não foi significativa para severidade e massa de mil grãos, desta forma, não foram realizadas

análises específicas considerando-se a separação de cada uma das inoculações. Embora a interação entre genótipos e inoculação não tenha sido significativa, o efeito isolado de cada um desses fatores foi significativo.

Identificação dos isolados:

Na Figura 3 pode-se observar o peso molecular das amostras de DNA dos isolados fúngicos obtidos de espigas contendo sementes sintomáticas. A amostra resultou na amplificação de um produto de 658 nucleotídeos para região EF e esta sequência apresentou 99% de identidade com *F. verticillioides* (Acesso nº FN179338.1), respectivamente, cobrindo 99% da sequência, de acordo com consulta ao BLAST/NCBI. Em relação à análise morfológica do isolado também foram visualizadas estruturas ao microscópio típicas do patógeno (Figura

3) em que se verificou conidióforos com microconídios formados em longas cadeias e em monofiálides. Baseado nos resultados obtidos nas análises moleculares, bem como nas características morfológicas, o isolado avaliado trata-se de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

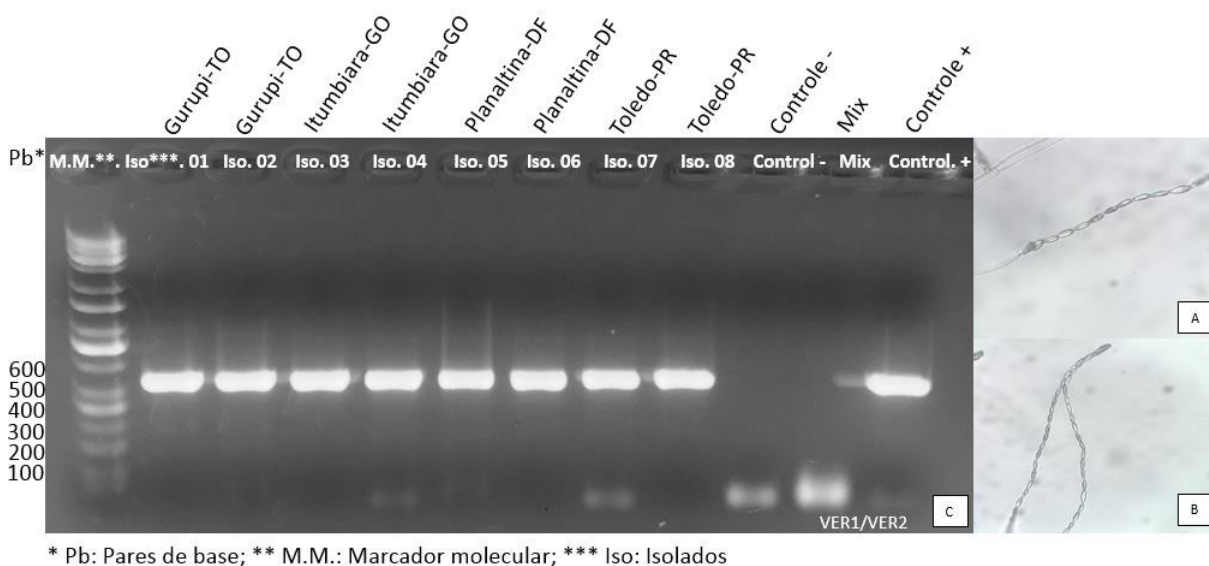


Figura 3. Estruturas morfológicas de *Fusarium verticillioides* produzidas em monofiálides, sendo, A: Conidióforos com microconídios em cadeia; B: Longa cadeia de microconídios. E peso molecular de amostras de isolados fúngicos obtidos de milho (C), sendo, isolados 01 e 02: procedentes de Gurupi-TO; isolados 03 e 04: procedentes de Itumbiara-GO; isolados 05 e 06: procedentes de Planaltina-DF; isolados 07 e 08: procedentes de Toledo-PR; Controle negativo (Controle -): Folha de milho sadia; Mix: Controle relativo, sem adição de DNA; Controle positivo (Controle +): Isolado de *Fusarium verticillioides*.

Produção de fumonisinas em função do local e métodos de inoculação:

Com relação à infecção natural dos híbridos, verificou-se uma grande quantidade de amostras com altos níveis de fumonisinas em três dos quatro municípios avaliados (Tabela 1). Levando em consideração que isso ocorreu no tratamento com infecção em que não houve inoculação artificial, é preocupante ver índices muito elevados decorrentes de infecção natural.

Tabela 1. Percentual de amostras em grãos de milho, procedentes de inoculação artificial (IA) e infecção natural (IN) encontradas com a concentração de fumonisinas acima do limite de tolerância (1,5 µg/g e 1 µg/g), em diferentes estados brasileiros.

Limites de tolerância para Fumonissina B1	Gurupi-TO		Itumbiara-GO		Planaltina-DF		Toledo-PR	
	IA	IN	IA	IN	IA	IN	IA	IN
1,5µg/g (Fm, CM, Fb, Flc, Cnj)	100	70	60	90	100	50	70	0
1µg/g (Am, Opm)	100	90	70	90	100	50	80	0

Fm, CM, Fb, Flc, Cnj: Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos e canjica.

Am, Opm: Amido de milho e outros produtos a base de milho.

Cerca de 70% das amostras do município de Gurupi - TO apresentaram teores de fumonissina B1 (FB1) e 40% das mostras apresentaram teores de fumonissina B2 (FB2), considerados acima do tolerado, caso fossem destinados ao consumo humano (farinha de milho, creme de milho fubá, flocos, canjica e canjiquinha), onde o limite de tolerância para fumonissina é atualmente de 1,5 µg/g. Da mesma forma, se o destino fosse para produção de amido de milho cerca de 90% das amostras estariam acima do nível de tolerância para FB1 e 50% estaria acima do nível de tolerância para FB2, pois neste caso, o limite para fumonissina é de 1 µg/g .

A média de severidade das testemunhas deste experimento foi de 3,44; em que esta nota representa 18,8% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo. Nestas condições, o teor de fumonissina FB1 encontrado foi de 0,4 µg/g a 16,2µg/g, considerando uma média deste teor de 5,48µg/g, é quase 4 vezes maior do que o limite oficialmente estabelecido pela ANVISA. Resultados semelhantes também foram verificados por Hirooka *et al.* (1996), analisando 48 amostras de milho do Paraná, Mato Grosso e Goiás, detectaram fumonisinas B1 e B2 na totalidade das amostras, com níveis de 0,6 a 18,52 µg/g de FB1 e de 1,2 a 19,13 µg/g de FB2; por Yoshizawa *et al.* (1996), analisando 18 amostras de milho tailandês, safra 92/93, detectaram FB1 em 89% das amostras (0,063 a 18,8 µg/g) e FB2 em 67% (0,05 a 1,40 µg/g).

Nas análises de micotoxina FB1 em grãos procedentes de Itumbiara - GO, verificou-se que 90% das amostras de testemunha apresentaram teores acima do tolerado. Desta forma, os

grãos seriam inadequados, caso fossem destinados à fabricação de farinha de milho, creme de milho fubá, flocos, canjica e canjiquinha e para amido de milho e outros produtos à base de milho. Almeida *et al.* (2002) verificaram contaminação em 57 amostras de grãos de milho, provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto nos diferentes estádios de maturidade da planta por FB1 e FB2. Os resultados de Capão Bonito mostraram 92,3% de contaminação das amostras por FB1 (50 a 10,87 µg/g) e 61,5% por FB2 (0,05 a 0,521 µg/g). Nas amostras provenientes da região de Ribeirão Preto essa análise revelou que 96,8% das amostras estavam contaminadas por FB1 (50 a 17,69µg/g) e 74,2% por FB2 (0,05 a 5,24µg/g). Em grãos produzidos em Planaltina - DF, as análises de FB1 revelaram que 50% das amostras da testemunha apresentaram teores acima do tolerado e 10% das amostras estaria também acima deste mesmo nível de tolerância para FB2, caso os grãos fossem processados para os mesmos derivados do milho descritos anteriormente. Orsi *et al.* (2000), estudando 195 amostras de três híbridos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, verificaram que 90,2% das amostras apresentaram-se contaminadas por FB1 (0,87 a 49,3 µg/g) e 97,4% por FB2 (1,96 a 29,16 µg/g).

Para as análises em grãos advindos de Toledo - PR, altos índices de FB1 foram verificados apenas nos genótipos inoculados. Neste município, 70% das amostras de grãos inoculados apresentaram teores acima do tolerado, caso os mesmos fossem destinados à fabricação de farinha de milho, creme de milho fubá, flocos, canjica e canjiquinha, e 80% estariam acima do limite tolerado se fossem destinados a amido de milho. Na testemunha, onde as espigas não tiveram inoculação artificial, não encontrou nenhum análogo de fumonisina FB2 e apenas dois híbridos apresentaram fumonisina na mesma concentração, de 0,27µg/g de FB1. Possivelmente os baixos níveis podem ter sido influenciados pelo clima mais ameno, conforme Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2. Concentração média de fumonisina B1 em grãos de milho oriunda de genótipos que receberam inoculação artificial (IA) influenciados pela temperatura média de diferentes municípios brasileiros.

	Gurupi-TO	Itumbiara-GO	Planaltina-DF	Toledo-PR
	IA	IA	IA	IA
Teores de Fumonisina B1	24,84 µg/g	6,58 µg/g	4,74 µg/g	3,38 µg/g
Temperatura	27,43°C	23,1°C	22,13°C	13,64°C

Na Tabela 2 pode-se verificar os valores de concentração de fumonisina nos genótipos inoculados de cada local, bem como as médias de temperaturas. A maior média de concentração

de FB1 ocorreu no município de Gurupi, sendo o de 24,84 µg/g, acima de 24 vezes o limite de tolerância caso os grãos fossem destinados a amido de milho e outros produtos à base de milho. Neste local a média de temperatura foi de 27,43°C. A menor concentração de FB1 ocorreu em Toledo, com a concentração média de 3,38 µg/g, mais de três vezes acima do limite de tolerância caso os grãos fossem destinados a amido de milho e outros produtos à base de milho e neste local a média de temperatura foi de 13,64°C. Os resultados demonstram um nível crescente onde as maiores concentrações de fumonisinas ocorreram nos locais que tiveram maiores temperaturas.

Verificou-se que a proporção da concentração de FB1 foi de 3 a 4 vezes maior do que a concentração de FB2 (Tabela 3). Este fato foi constatado em praticamente todas as amostras dos locais analisados. Nas análises de correlação geral obteve-se correlação positiva significativa (0,99), entre FB1 e FB2, demonstrando que apesar da diferença na concentração, estes tipos de fumonisinas são produzidas associadas, de modo que quando uma aumenta, a outra também.

Tabela 3. Resultados das severidades (escala diagramática de 1 a 9), das massas de mil grãos (gramas) e concentrações de fumonisinas B1 e B2 (µg/g) dos dez híbridos comerciais de milho plantados em Gurupi - TO, Itumbiara - GO, Planaltina - DF e Toledo - PR.

Gurupi - TO								
Híbrido	SEV		MMG		Fum. B1	Fum. B2	Fum. B1 Test.	Fum. B2 Test.
DKB310PRO2	2,56	a	338,00	a	2,69	0,65	0,40	0,13
DKB390PRO2	2,78	a	258,33	b	12,99	2,89	1,29	0,45
P3340YHR	3,44	a	258,56	b	5,62	1,16	2,76	0,86
P3630H	3,78	a	295,22	ab	86,70	30,45	9,33	3,44
P4285H	3,89	a	296,56	ab	9,13	3,46	1,15	0,39
P3250	4,00	a	296,33	ab	32,40	11,43	5,03	1,39
DKB240PRO2	4,11	ab	258,56	b	16,17	4,41	2,74	0,41
30K75Y	4,11	ab	283,56	ab	16,17	4,77	6,45	1,54
DOW30A37PW	4,56	ab	254,56	b	1,68	0,49	9,44	5,21
32R48YH	6,56	c	319,89	ab	64,80	25,05	16,20	4,20
Média	3,98		285,96		24,84	8,48	5,48	1,80
Itumbiara - GO								
Híbrido	SEV		MMG		Fum. B1	Fum. B2	Fum. B1 Test.	Fum. B2 Test.
P4285H	2,89	a	279,89	a	0,57	0,00	12,78	5,49

Continua

Híbrido	SEV		MMG		Fum. B1	Fum. B2	Fum. B1 Test.	Fum. B2 Test.
DKB390PRO2	4,33	a	230,67	abc	1,11	0,32	4,41	1,61
32R48YH	4,67	ab	258,67	ab	0,32	0,00	0,00	0,00
P3630H	4,67	ab	246,44	ab	0,71	0,13	6,48	2,52
P3250	5,33	ab	217,44	abc	18,81	5,61	37,45	9,10
DOW30A37PW	5,44	b	190,11	bc	9,93	3,32	14,16	5,55
30K75Y	6,11	b	192,33	bc	12,00	4,11	32,40	8,31
DKB240PRO2	6,11	b	159,89	c	5,66	1,30	24,84	10,44
P3340YHR	6,22	b	233,44	ab	8,04	2,80	1,79	0,35
Média	5,03		228,09		6,58	1,98	13,78	4,46

Planaltina - DF

Híbrido	SEV		MMG (g)		Fum. B1	Fum. B2	Fum. B1 Test.	Fum. B2 Test.
P4285H	2,67	a	368,67	a	4,00	0,80	0,65	0,40
DKB310PRO2	2,78	a	352,33	ab	5,79	1,67	0,33	0,13
DKB240PRO2	3,00	a	285,00	b	3,11	0,76	1,60	0,52
P3630H	3,22	ab	312,89	ab	6,95	2,63	1,59	0,45
P3340YHR	3,33	ab	341,89	ab	3,29	0,90	2,59	0,96
P3250	3,44	ab	377,44	a	1,68	0,62	0,31	0,00
DKB390PRO2	3,67	ab	329,56	ab	1,79	0,47	0,30	0,16
DOW30A37PW	3,67	ab	313,44	ab	5,13	1,53	0,00	0,00
30K75Y	4,00	ab	325,44	ab	4,60	0,99	2,53	0,70
32R48YH	5,33	b	381,78	a	11,07	3,45	5,58	1,95
Média	3,51		338,84		4,74	1,38	1,55	0,53

Toledo - PR

Híbrido	SEV		MMG		Fum. B1	Fum. B2	Fum. B1 Test.	Fum. B2 Test.
DKB240PRO2	2,11*	a	302,67	ab	1,48	0,30	0,00	0,00
DKB390PRO2	2,44	a	267,33	ab	4,45	2,12	0,27	0,00
30K75Y	2,56	a	301,00	ab	2,39	0,47	0,00	0,00
P4285H	2,78	a	321,22	a	4,56	1,34	0,00	0,00
DOW30A37PW	2,89	a	290,89	ab	6,87	2,02	0,00	0,00
P3630H	3,00	a	307,00	ab	7,57	2,27	0,00	0,00
DKB310PRO2	3,11	a	288,56	ab	2,30	0,80	0,27	0,00
P3340YHR	3,33	a	271,33	ab	0,00	0,00	0,00	0,00
32R48YH	3,56	a	240,56	b	0,20	0,00	0,00	0,00
P3250	3,78	a	288,33	ab	4,01	1,09	0,00	0,00
Média	2,96		287,89		33,83	1,04	0,055	0,00

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Influência dos genótipos sobre a massa de grãos, severidade da doença e concentrações de fumonisinas:

No município de Gurupi - TO durante o período de condução do experimento obteve-se a temperatura mínima média de 19,9°C e máxima de 34,9°C (Figura 2). Neste ambiente, conforme apresentado na Tabela 04, o híbrido DKB310PRO2 apresentou o menor nível de severidade, sendo de 2,56 (5,82% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo), a maior massa de mil grãos (338g), e também um dos menores teores de Fumonisina FB1 (2,69µg/g) do experimento.

As análises de correlações de híbridos (Tabela Suplementar 2) demonstraram correlação negativa entre massa de mil grãos e severidade de -0,68 para o híbrido DKB310PRO2, em que quanto maior a massa de mil grãos, menor foi a severidade. Houve correlação positiva de 0,75 entre severidade e fumonisinas FB1 e FB2. Assim, pode-se afirmar que níveis baixos de severidade, resultaram em baixos valores de fumonisinas para este híbrido. Resultados semelhantes foram encontrados por Afolabi *et al.* (2007), que verificaram que menores níveis de severidades, resultaram em baixos valores de fumonisinas.

O híbrido 32R48YH apresentou alta severidade, de 6,56 (75,6% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo) e alta massa de mil grãos (319,89 g). Neste híbrido também foi evidenciado o segundo maior teor de fumonisina do experimento, de 64,8 µg/g, o que corresponde a quase 65 vezes maior que o limite tolerado desta toxina para alguns derivados de milho (ANVISA, 2011). Este híbrido apresentou a maior severidade da doença e o segundo maior teor de fumonisina nas plantas. Na análise de correlações (Tabela Suplementar

2) obteve-se o valor de 0,73, em que quanto maior foi a severidade, maior foi o teor da micotoxina. Ambos análogos, FB1 e FB2 apresentaram correlação positiva quando correlacionados com altas temperaturas. Assim, à medida que a temperatura aumentou, maior foi a concentração da micotoxina, observando-se os valores de 0,70 para FB1 e de 0,66 para FB2. Resultados semelhantes foram encontrados por Afolabi *et al.* (2007) em que relatam que a concentração de fumonisinas apresentou correlação significativa com a severidade de podridão da espiga e com a incidência de grãos sintomáticos. O mesmo ocorreu em estudos realizados por Desjardins *et al.* (1998) e por Kleinschmidt *et al.* (2005), na Nigéria e em diferentes estados Americanos.

O híbrido DOW30A37PW apresentou uma das maiores severidades e a menor massa de mil grãos (254,56g) do experimento, o que pode ter sido influenciado pela infecção nas espigas e conseqüentemente resultando em menor massa de grãos. Verificou-se correlação negativa de -0,6, onde, quanto maior a severidade, menor a massa de mil grãos. Neste híbrido também se encontrou o menor teor de fumonisina B1 (1,68µg/g) do experimento, podendo levantar a hipótese de que teores de fumonisina podem ser influenciados pelo genótipo, já que para este híbrido, severidade relativamente alta não expressaram altos teores de fumonisina, como foi observado no híbrido 32R48YH. Segundo Sánchez-Rangel *et al.* (2005), esses resultados podem estar relacionados à duas hipóteses: (i) parte dos sintomas causados na espiga foi provocado por isolados diferentes dos inoculados de *F. verticillioides* não produtores de fumonisinas ou que produzem níveis abaixo do limite detectável e (ii) a baixa relação entre intensidade da doença e níveis de fumonisinas seja fator inerente desse patossistema. Essa última hipótese pode ser reforçada por outros trabalhos, como o de Afolabi *et al.* (2007) em que sugerem que fatores genéticos que afetam a infecção no grão podem atuar de forma independente daqueles que afetam a produção de fumonisinas, ou por Munkvold & Desjardins (1997), sendo explicado em parte, pela natureza quantitativa dessas duas características.

O híbrido P3630H apresentou baixa a intermediária severidade, de 3,78 (25,56% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo) e massa de mil grãos de 295,22 g, sendo o maior teor de FB1 encontrado em Gurupi - TO, com teor de 86,7 µg/g. Houve correlação positiva da alta concentração de fumonisina neste híbrido com altas temperaturas (Tabela Suplementar 2). A baixa severidade da doença e uma produção de altos teores de fumonisina também já foi verificado por Saunders *et al.* (2001), o qual comentaram que geralmente não há nenhuma diferença na aparência visual de milho com baixas ou altas concentrações de fumonisinas em relação aos níveis de severidade. Por outro lado, podemos comparar ao outro híbrido, como 32R48YH, onde a alta severidade nas espigas correlacionou com altos teores desta micotoxina (correlação de 0,73). O híbrido P3630H demonstrou que, além do nível de severidade, outras variáveis podem estar relacionadas com a produção de micotoxinas, dentre elas, a genética pode influenciar.

Os híbridos P3630H e 32R48YH tiveram os maiores índices de fumonisina do local (Figura 4). Efeito possivelmente relacionado à genética de cada genótipo também foi verificado no híbrido P3250, o qual se observou que mesmo com valores medianos de severidade, foram encontrados altos teores de fumonisina (mais de 30 vezes acima do limite de tolerância determinado pela ANVISA). Assim, este resultado nos leva a crer que o teor de fumonisina nem sempre esteja associado a alta severidade da podridão da espiga.

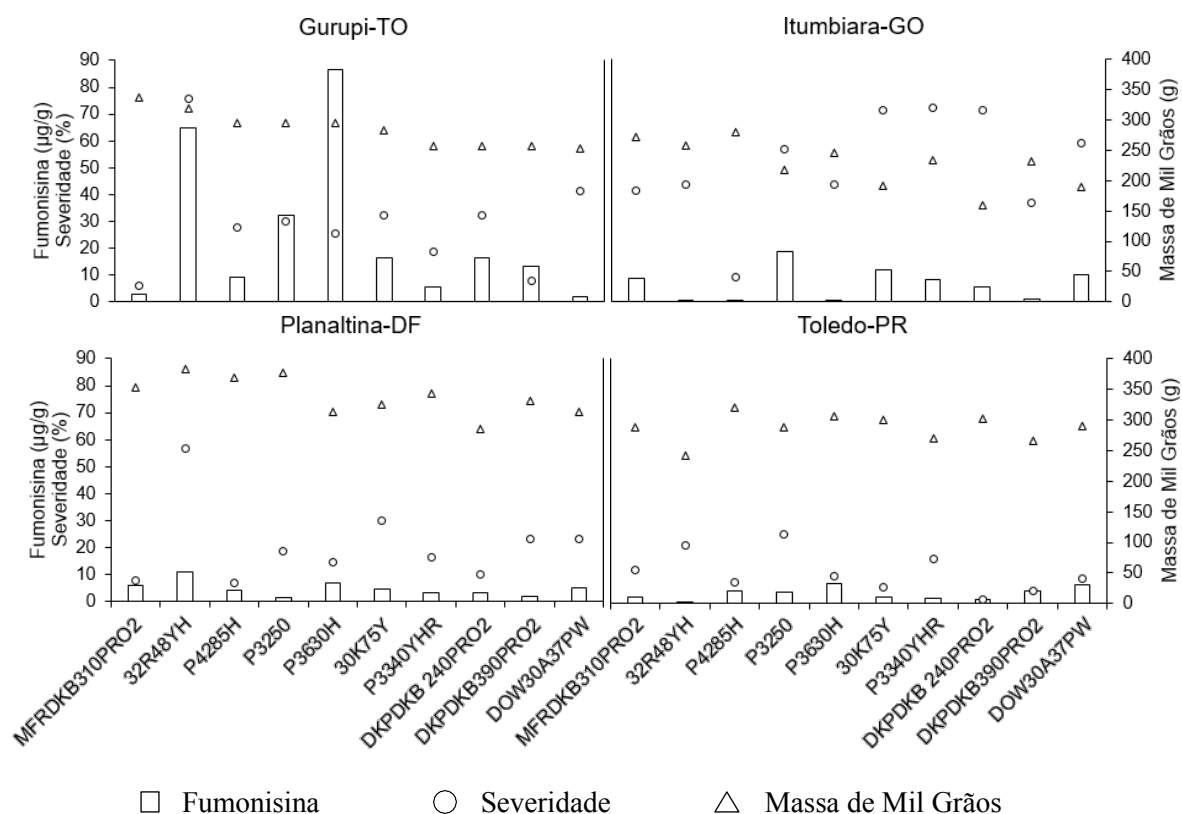


Figura 4. Valores de concentração de fumonisina ($\mu\text{g/g}$), severidade (%) e de massa de mil grãos (g) de híbridos de milho no município de Gurupi, Tocantins (TO); Itumbiara, Goiás (GO); Planaltina, Distrito Federal (DF); Toledo, Paraná (PR).

No presente trabalho, híbridos como P3630H e P3250 tiveram níveis medianos de severidade da doença nas espigas, massa de mil grãos semelhantes e altos teores de fumonisinas. Por outro lado, o híbrido DOW30A37PW, que possuiu mediana a alta severidade (a segunda maior severidade do experimento), apresentou índices bem baixos de FB1 (o menor teor de FB1 do experimento). Estes resultados mais uma vez demonstram que altas severidades podem não resultar em altos índices de micotoxinas, mas também, ser uma característica intrínseca de cada híbrido, destacando-se à influência da genética de cada genótipo. Neste sentido, Eller *et al.* (2008) e Butrón *et al.* (2006), relatam que esforços devem ser direcionados na busca de material genético resistentes a ambos os parâmetros, uma vez que nem sempre há correlação entre infecção de grãos e níveis de fumonisinas. Ainda, conforme descrito por Munhoz *et al.* (2015) foi observado que grãos assintomáticos à podridão da espiga, não garantem a ausência de contaminação por fumonisinas ou níveis abaixo dos limites máximos de tolerância. Segundo Afolabi *et al.* (2007), Desjardins *et al.* (1998) e Picot *et al.* (2010), neste modelo de patossistema, há pelo menos três interações possíveis entre sintomas e toxinas: (i) presença de

sintomas nos grãos acompanhados de elevados teores de fumonisinas; (ii) presença de sintomas nos grãos com baixos teores de fumonisinas e (iii) produção de toxinas em grãos sem sintomas visíveis de infecção.

No município de Itumbiara - GO, durante o período de condução do experimento, registrou-se a temperatura mínima média de 18,30 °C e máxima de 27,85 °C (Figura 2). Neste ambiente, o híbrido P4285H apresentou a menor severidade da doença e a maior massa de mil grãos, de 279,89 g, e ainda, a segunda menor concentração de fumonisina, de 0,568 µg/g (Tabela 3). O híbrido DKB310PRO2 apresentou intermediária severidade da doença e a segunda maior massa de mil grãos, de 272 g, e intermediária concentração de fumonisina (8,67 µg/g) quando comparado com outras concentrações dos outros híbridos. No entanto, este valor representa cerca de nove vezes acima do limite de tolerância determinado pela ANVISA (2011), caso o grão fosse destinado à produção de amido de milho.

O híbrido P3250 apresentou alta severidade da doença, de 5,33 (56,5% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo), intermediária massa de mil grãos, de 217,44 g, e ainda, a maior concentração de fumonisina do experimento, que correspondeu a 18,81 µg/g (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados para o híbrido 30K75Y o qual também apresentou alta severidade, de 6,11 (71,1% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo) e o segundo maior nível de fumonisina do experimento (12 µg/g). Estudos desenvolvidos por Eller *et al.* (2008), em diferentes estados americanos, revelaram que as altas concentrações de fumonisinas correlacionaram-se com a presença de grãos sintomáticos e com as altas severidades de podridão de espiga. Os híbridos P3250H e 30K75 possuíram os maiores índices de fumonisina do local avaliado (Figura 5).

O híbrido DKB240PRO2 (Tabela 3) apresentou alta severidade da doença, de 6,11 (71,1% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo) e baixa massa de mil grãos (159,89 g), e ainda, uma concentração de FB1 quase 6 vezes maior que o limite de tolerância determinado pela ANVISA (2011) (5,66 µg/g). Conforme evidenciado no Tabela Suplementar 2, na análise de correlação, houve correlação negativa (-0,81), entre a severidade e a massa de grãos, assim, quanto maior foi a severidade, menor foi a massa de mil grãos.

O híbrido P3340YHR apresentou a maior severidade do experimento, intermediária massa de mil grãos e concentração de fumonisina de 8,04 µg/g, que correspondem a 8 vezes maior que o limite de tolerância indicado pela ANVISA (2011). Apesar da severidade da doença neste híbrido ter sido maior (6,22) do que no híbrido P3250, a maior concentração da micotoxina foi encontrada neste último, sendo respectivamente de 8,04 µg/g e 18,81 µg/g. Com

isso, mais uma vez, pôde ser observado que nem sempre altas severidades representam as maiores concentrações de fumonisinas nos híbridos de milho.

No município de Planaltina - DF, durante o período de condução do experimento, obteve-se a temperatura mínima média de 17,72 °C e máxima de 26,54 °C (Figura 2). Neste ambiente, o híbrido 32R48H apresentou o maior nível de severidade da doença, de 5,33 (56,6% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo), o maior teor de fumonisina (11,07 µg/g), e ainda, a maior massa de mil grãos (381,78 g). Foi verificada uma correlação de 0,73 entre a severidade e a concentração de fumonisina para este híbrido (Tabela Suplementar 2). Ambos análogos, FB1 e FB2, também apresentaram correlação positiva quando correlacionados com altas temperaturas. Assim, para este híbrido, à medida que a temperatura aumenta, maior a concentração da micotoxina, evidenciado pelos valores de 0,70 para FB1 e de 0,66 para FB2. Performance similar deste híbrido foi verificado no experimento em Gurupi - TO em que severidade da doença relativamente alta e índices elevados de fumonisina, apresentaram estar associados neste híbrido. O híbrido 32R48YH apresentou o maior índice de fumonisina do local e pode ser melhor observado na Figura 4.

O híbrido P3250 apresentou baixa severidade da doença, de 3,44 (18,8% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo) e a menor concentração de fumonisina do experimento (1,68 µg/g). Verificou-se que para este genótipo, neste local, a baixa severidade refletiu em baixo teor de fumonisina. Resultado semelhante foi encontrado por Afolabi *et al.* (2006), em estudos na Nigéria, relatam que a concentração de fumonisinas apresentou correlação significativa com a severidade de podridão da espiga e com a incidência de grãos sintomáticos.

O híbrido P3630H, em Planaltina - DF, também teve resultados semelhantes ao encontrado em Gurupi - TO, severidade intermediária da doença e altos teores de fumonisinas, sendo o segundo maior teor desta micotoxina (6,95 µg/g). Estes valores estão em quase sete vezes acima do limite de tolerância de fumonisina estabelecido pela ANVISA (2011), caso os grãos fossem destinados à produção de amido de milho. Correlacionando severidade com concentração de fumonisina, percebe-se a correlação positiva igual a 0,60 (Tabela Suplementar 2); ou seja, neste local, para este híbrido, existe uma tendência de altas concentrações da micotoxina estar associado a altas severidades.

No município de Toledo-PR, durante o período de condução do experimento, obteve-se a temperatura mínima média de 9,03°C e máxima de 18,25°C (Figura 2). Neste município, os híbridos P4285H, DOW30A37PW e P3630H, apresentaram comportamentos similares, em que as severidades da doença foram medianas seguidos das maiores concentrações de

fumonisina do local, sendo respectivamente, 4,56 µg/g, 6,87 µg/g e 7,57 µg/g. Valores que corresponderam de 4,5 a 7,5 vezes maior que o limite de tolerância determinado pela ANVISA (2011), caso os grãos fossem destinados à produção de amido de milho. Características de baixa severidade da doença e poucos sintomas visíveis foram encontradas nas hipóteses de Afolabi *et al.* (2007), Desjardins *et al.* (1998) e Picot *et al.* (2010), que relatam poucos sintomas visíveis nos genótipos testados, porém, com alto teores de fumonisina. Os híbridos P4285H, DOW30A37PW e P3630H possuíram os maiores índices de fumonisina do local e podem ser melhor observados na Figura 4.

O híbrido P3630H repetiu o resultado encontrado nos municípios de Gurupi - TO e Planaltina - DF. Em Toledo - PR, mais uma vez, apresentou baixa a intermediária severidade da doença, de 3,0 (10% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção pelo fungo) e o maior teor de fumonisina do local (7,57 µg/g).

Já com relação ao híbrido 32R48YH, diferentemente dos resultados obtidos nos outros locais, apresentou baixíssima concentração de fumonisina B1 (0,2 µg/g), possivelmente influenciado pelo clima temperado do local, onde se registrou temperatura amena de 13,64°C. A correlação entre os teores de fumonisina e temperatura foi positiva, de 0,70. Provavelmente, este fator tenha influenciado na baixa concentração da micotoxina neste híbrido. Situação semelhante foi relatada por Herrera *et al.* (2010) e Munkvold & Desjardins (1997), em que as condições ambientais como baixas temperaturas e umidade relativa contribuem para o menor desenvolvimento da doença e possivelmente resultando no baixo acúmulo de fumonisinas. Em outro trabalho, Blandino *et al.* (2008), afirmam que baixas temperaturas reduzem o ataque de insetos que culmina na redução da infecção de *F. verticillioides* e níveis de fumonisinas.

1.6 CONCLUSÃO

Não foi possível assegurar que grãos sintomáticos e assintomáticos quanto à infecção de *Fusarium verticillioides*, estejam livres de contaminação por fumonisinas e os métodos de inoculação por aspersão e o inoculado no centro da espiga não influenciaram em diferentes concentrações de fumonisinas.

A produção de fumonisinas nos grãos de milho é potencializada por condições ambientais de temperatura elevada e pela susceptibilidade do genótipo e alta severidade de *F. verticillioides* tende a proporcionar maiores teores de fumonisinas para a maioria dos genótipos avaliados.

Os híbridos de P4285, DKB390PRO2 e DKB310PRO2 foram os mais resistentes à podridão da espiga, nos quatro ambientes, enquanto que o híbrido P3630H, 32R48 e P3250 apresentaram a maior severidade da doença. Os híbridos P3630H, 32R48 e P3250 apresentaram na maioria dos locais com as maiores concentrações de fumonisinas.

A produtividade de grãos é reduzida pela incidência de *F. verticillioides*. Programas de melhoramento devem ser direcionados na busca de genótipos resistentes à infecção do patógeno e à produção de fumonisinas independente da severidade nos grãos.

1.7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AFOLABI, C. G.; BANDYOPADHYAY, R.; LESLIE, J.; EKPO, E. J. A. Effect of Sorting on Incident and Occurrence of Fumonisins and *Fusarium verticillioides* on Maize from Nigeria. **Journal of Food Protection**. v. 69, n 8, p. 2019-2023, 2006.

AFOLABI, C. G.; OJIAMBO, P. S.; EKPO, E. J. A.; MENKIR, A.; BANDYOPADHYAY, R. Evaluation of maize inbred lines for resistance to Fusarium ear rot and fumonisin accumulation in grain in tropical Africa. **Plant Disease**, v. 91, n. 3, p. 279-286, 2007.

AGROCERES - **Guia de Sanidade Agroceres**. São Paulo. v. 2 p. 34-36, 1996.

ALIZADEH, M.A.; ROSHANDEL, G.; ROUDBARMOHAMMADI, S.; ROUDBARY, M.; SOHANAKI, H.; GHIASIAN, S.A.; TAHERKHANI, A.; SEMNANI, S.; AGHASI, M. 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.2625-2628, 2012.

ALMEIDA, A.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; DIREITO, G.M.; ORTEGA, E.M.; CORRÊA, B. Mycoflora and Fumonisin Contamination in Brazilian Corn from Sowing to Harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.13, p. 3877-3882, 2002.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos** - Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília-DF. Nº 46 – 09/03/11 – Seção 1 – p.66. Resolução nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011.

BITTENCOURT, A.B.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v.16, n.2, p.117-120, 2005.

BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F.; PASCALE, M.; HAIDUKOWSKI, M.; SAPO-RITI, M. Effect of sowing date and insecticide application against European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on fumonisin contamination in maize kernels. **Crop Protection**, v.27, n.11, p. 1432–1436, 2008.

BORDIN, K.; ROSIM, R.E.; NEEFF, D.V.; ROTTINGHAUS, G.E.; OLIVEIRA, C.A. Assessment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. **Food Chemistry** v.155, p.174-178, 2014.

BUTRÓN, A.; SANTIAGO, R.; MANSILLA, P.; PINTOS-VARELLA, C.; ORDÁS, A.; MALVAR, R.A. Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.16, p.6113-6117, 2006.

CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa., n.139, 2003, 191p.

CHU, F.S.; LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in mouldy corn collected from the Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.3, p.847-852, 1994.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. 2017. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2016/2017**: agosto de 2017. V. 4, n. 11, 2017.

DESJARDINS, A.E.; PLATTENER, R.D.; LU, M.; CLAFLIN, L.E. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisins production. **Plant Disease**, v. 82, n.8, p.953-958, 1998.

DESJARDINS, A.E. **Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2006. 268 p.

DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M.. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur J Plnat Pthol* 109:755-68, 2003.

DOMIJAN, A.M. Fumonisin B1: a neurotoxic mycotoxin? **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v.63, n.4, p.531-544, 2012.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

ELLER, M.S., HOLLAND, J.B., PAYNE, G.A. Breeding for improved resistance to fumonisin contamination in maize. **Toxin Reviews**, v.27, p.371–389, 2008.

HERRERA, M.; CONCHELLO, P.; JUAN, T.; ESTOPANAN, G.; HERRERA, A.; ARINO, A. Fumonisin concentrations in maize as affected by physico-chemical, environmental and agronomical conditions. **Maydica**, v.55, n.1, p.121–126, 2010.

HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.2, p.173-183, 1996.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v.82, p.171-274, 2002.

KLEINSCHMIDT, C.E.; CLEMENTS, M.J.; MARAGOS, C.M.; PATAKY, J.K.; WHITE, D.G. Evaluation of food-grade dent corn hybrids for severity of *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in grain. **Plant Disease**, v.89, n.3, p. 291-297, 2005.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e mitotoxicose em suínos**. 1ª ed. Santa Maria: Editora Palotti, 2007. 240p.

MENEZES, V. O.; PEDROSO, C. D.; PIVETA, G; MUNIZ, M. F. B.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D. C.; ETHUR, L. Z.; SANTOS, R. F. S.; TUNES, L. M. Detecção de influência de *Fusarium spp.* na qualidade fisiológica de sementes de pepino. **Cienc. Rural**. v.41 no.2 Santa Maria Feb. 2011 Epub Feb 11, 2011

MULÈ, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MORETTI, A. A species-specific assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 2004;110:495–502.

MUNHOZ, A.T.; CARVALHO, R.V.; QUERALES, P.J., GONÇALVES, F.P., CAMARGO, L.E.A. Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho à podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinas provocadas por *Fusarium verticillioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 144-148, 2015.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POZZI, R.C.; SCHAMMASS, E.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v.36, p.75-87, 2000

PICOT, A.; BARREAU, C.; PINSON-GADAIS, L.; CARON, D.; LANNOU, C.; RICHARD-FORGET, F. Factors of the *Fusarium verticillioides* - maize environment modulating fumonisin production. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, p. 221-231, 2010.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v.82, p.353-357, 1992.

ROSS, P.F.; RICE, L.G.; OSWEILER, G.D.; NELSON, P.E.; RICHARD, J.L.; WILSON, T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, v.117, n.1, p.109–114,1992.

SAMPIETRO, D.A.; VATTUONE, M.A.; PRESELLO, D.A. FAUGUEL, C.M.; CATALA, C.A.N. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. **Crop Protection**, v. 28, n.2, p.196–200, 2009.

SÁNCHEZ-RANGEL D.; SANJUAN-BADILLO A.; PLASENCIA J. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a

polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.22, p.8565–8571, 2005.

SAUNDERS, S.D.; MEREDITH, F. I.; VOSS, K. S. Control of Fumonisin: Effects of Processing. **Environ Health Perspect.** v.10, p.333-336, 2001.

SOLFRIZZO, M.; CHULZE, S.N.; MALLMANN, C.; VICONTI, A.; GIROLAMO, A.; ROJO, F.; TORRES A. Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. **Food Additives & Contaminants**, v.21, n.11, p.1090-1095, 2004.

TAPIA, C.; AMARO, J. Género *Fusarium*. Rev. chil. infectol. v.31 no.1 Santiago feb. 2014.

WESTHUIZEN, L.; SHEPARD, G.S.; SCUSSEL, V.M.; COSTA, L.L.F.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.18, p.5574-5578, 2003.

WHO – World Health Organization. **Evaluation of certain mycotoxins in food.** Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain mycotoxins in food. Geneva: World Health Organization, 2002. World Health Organ Tech Rep Ser. 2002

YOCHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; CHOKETHAWORN, N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. **Food Additives Contaminants**, v.13 n.2, p.163-168, 1996

1.8 TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela Suplementar 1: Análise de variância conjunta para massa de mil grãos e severidade considerando dois métodos de inoculação de *Fusarium verticillioides* em 10 híbridos comerciais de milho plantados em quatro locais diferentes no Brasil.

FV	GL	MMG				Severidade			
		QM	Fc	Ftab	*	QM	Fc	Ftab	
BLOCO/AMBIENTE	8	753,64	205,67	1,98	*	0,13	1,13	1,98	ns
INOCULAÇÃO	2	13290,95	4,98	3,03	*	121,97	41,25	3,10	*
GENÓTIPO	9	16437,67	6,16	1,92	*	12,18	4,12	1,99	*
INOCULAÇÃO*GENÓTIPO	18	863,66	0,32	1,65	Ns	1,76	0,60	1,72	ns
AMBIENTE	3	184416,19	53,91	2,72	*	69,90	22,72	2,70	*
AMBIENTE*TRATAMENTO ¹	87	2667,55	727,97	1,33	*	2,96	26,72	1,33	*
ERRO MÉDIO	232	3,66				0,11			
Média: 285,2		CV: 19,82				Média: 6,13	CV: 5,43		

*Significativa ao nível de 5%, pelo Teste F.

¹ Tratamento: Combinação dos níveis dos fatores: inoculação e genótipos.

Tabela Suplementar 2. Correlações linear de Pearson abaixo da diagonal principal e p-valor de teste T para correlação acima da diagonal principal entre as variáveis Fumonisina B1 (FB1), Fumonisina B2 (FB2), massa de mil grãos (MMG), severidade (SEV), temperatura máxima (°C Max) e temperatura mínima (°C Min) de híbridos de milho.

30K75Y	FB1	FB2	MMG	SEV.	°C Max	°C Min	Media
FB1	1	0	0	0,017	0,001	0,001	0,001
FB2	0,99*	1	0	0,003	0	0	0
MMG	-0,56*	-0,63 ^{NS}	1	0	0,228	0,118	0,169
SEV.	0,40*	0,49*	-0,61*	1	0,029	0,004	0,012
°C Max	0,52*	0,56*	-0,21 ^{NS}	0,36*	1	0	0
°C Min	0,54*	0,58*	-0,27 ^{NS}	0,47*	0,95*	1	0
Media	0,54	0,57	-0,23	0,42	0,990195745	0,981625806	1
32R48YH							
FB1	1	0	0,098	0	0	0,002	0
FB2	0,99*	1	0,14	0	0	0,004	0
MMG	0,28 ^{NS}	0,25 ^{NS}	1	0,003	0,013	0,002	0,005
SEV.	0,73*	0,71*	0,47*	1	0,00	0	0
°C Max	0,70*	0,66*	0,41*	0,75*	1	0	0
°C Min	0,50*	0,47*	0,50*	0,68*	0,95*	1	0
Media	0,61	0,59	0,45	0,728	0,99	0,982	1
DKPDKB240PRO2							
FB1	1	0	0,056	0,066	0,001	0,002	0,001
FB2	0,969	1	0,118	0,193	0,016	0,015	0,014
MMG	-0,32 ^{NS}	-0,27 ^{NS}	1	0	0,04	0,006	0,017
SEV.	0,31 ^{NS}	0,222 ^{NS}	-0,81*	1	0,005	0,001	0,002
°C Max	0,54*	0,40*	-0,35*	0,46*	1	0	0
°C Min	0,51*	0,40*	-0,45*	0,53*	0,95*	1	0
Media	0,54	0,41	-0,394	0,498	0,99	0,982	1
DKPDKB390PRO2							
FB1	1	0	0,227	0,372	0,006	0,144	0,026
FB2	0,919*	1	0,287	0,158	0,289	0,903	0,572
MMG	-0,21 ^{NS}	-0,18 ^{NS}	1	0,654	0,511	0,889	0,658
SEV.	-0,15 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	-0,08 ^{NS}	1	0,301	0,032	0,13
°C Max	0,45*	0,18 ^{NS}	-0,11 ^{NS}	0,18 ^{NS}	1	0	0
°C Min	0,25 ^{NS}	-0,02 ^{NS}	-0,02 ^{NS}	0,36*	0,96*	1	0
Media	0,37	0,10	-0,076	0,257	0,99	0,982	1
DOW30A37P							
W							
FB1	1	0	0	0,002	0,731	0,382	0,565
FB2	0,95*	1	0	0,016	0,222	0,138	0,177

Continua

<i>DOW30A37PW</i>	FB1	FB2	MMG	SEV.	°C Max	°C Min	Media
MMG	-0,67*	-0,63*	1	0	0,039	0,029	0,032
SEV.	0,51*	0,399*	-0,60*	1	0,004	0,002	0,003
°C Max	0,06 ^{NS}	0,21 ^{NS}	-0,35*	0,463*	1	0	0
°C Min	0,15 ^{NS}	0,25 ^{NS}	-0,36*	0,508*	0,945*	1	0
Media	0,10	0,23	-0,358	0,489	0,99	0,982	1
<i>MFRDKB310PRO2</i>							
FB1	1	0	0,022	0	0,463	0,06	0,22
FB2	0,988*	1	0,013	0	0,712	0,112	0,373
MMG	-0,38*	-0,41*	1	0	0,067	0,082	0,069
SEV.	0,75*	0,755*	-0,68*	1	0,607	0,909	0,801
°C Max	0,126 ^{NS}	0,064 ^{NS}	0,309 ^{NS}	-0,09 ^{NS}	1	0	0
°C Min	0,317 ^{NS}	0,27 ^{NS}	0,294 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,945 ^{NS}	1	0
Media	0,21	0,153	0,307	-0,043	0,99	0,982	1
<i>P3250</i>							
FB1	1	0	0,003	0,048	0	0,001	0
FB2	0,976*	1	0,009	0,043	0	0,001	0
MMG	-0,49*	-0,43*	1	0,003	0,884	0,944	0,956
SEV.	0,332*	0,339*	-0,48*	1	0,581	0,461	0,523
°C Max	0,582*	0,637*	-0,03 ^{NS}	0,095 ^{NS}	1	0	0
°C Min	0,52*	0,541*	0,012 ^{NS}	0,127 ^{NS}	0,945*	1	0
Media	0,563	0,604	-0,009	0,11	0,99	0,982	1
<i>P3340YHR</i>							
FB1	1	0	0,063	0	0	0	0
FB2	0,954	1	0,098	0	0,003	0	0,001
MMG	-0,31 ^{NS}	-0,28 ^{NS}	1	0	0,472	0,88	0,628
SEV.	0,606*	0,66*	-0,55*	1	0,53	0,206	0,364
°C Max	0,66*	0,49*	-0,12 ^{NS}	0,108 ^{NS}	1	0	0
°C Min	0,76*	0,60*	-0,03 ^{NS}	0,216 ^{NS}	0,945*	1	0
Media	0,697	0,544	-0,084	0,156	0,99	0,982	1
<i>P3630H</i>							
FB1	1	0	0,727	0,949	0	0,019	0,001
FB2	1	1	0,718	0,943	0	0,015	0,001
MMG	0,06 ^{NS}	0,06 ^{NS}	1	0,001	0,373	0,234	0,303
SEV.	0,01 ^{NS}	0,01 ^{NS}	-0,52*	1	0,06	0,026	0,038
°C Max	0,60*	0,603*	-0,15 ^{NS}	0,32 ^{NS}	1	0	0
°C Min	0,391*	0,402*	-0,24 ^{NS}	0,37*	0,96*	1	0
Media	0,514	0,525	-0,177	0,347	0,99	0,982	1

Continua

<i>P4285H</i>	FB1	FB2	MMG	SEV.	°C Max	°C Min	Media
FB1	1	0	0,06	0,008	0,07	0,167	0,099
FB2	0,98*	1	0,023	0,041	0,05	0,13	0,071
MMG	-0,32 ^{NS}	-0,38*	1	0,026	0,102	0,33	0,171
SEV.	0,44*	0,342*	-0,37*	1	0,017	0,121	0,04
°C Max	0,305*	0,332*	-0,28 ^{NS}	0,394*	1	0	0
°C Min	0,235 ^{NS}	0,26 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	0,26 ^{NS}	0,945*	1	0
Media	0,279	0,305	-0,233	0,344	0,99	0,982	1

Capítulo 2:

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO NA AVALIAÇÃO DE HÍBRIDOS DE MILHO À PODRIDÃO DE ESPIGAS CAUSADA POR *Fusarium verticillioides* EM DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS

2.1 RESUMO

Dentre os principais danos na cultura do milho estão as podridões de espiga, principalmente as causadas pela espécie *Fusarium verticillioides*. Um dos mais importantes métodos para evitar o ataque deste fungo é a utilização de plantas resistentes ao patógeno. Desta forma, um dos passos essenciais para o desenvolvimento de híbridos pelos programas de melhoramento é a identificação de fontes de resistência através de métodos de inoculação eficazes para uma boa caracterização de genótipos. Apesar de outros autores terem avaliado alguns métodos de inoculação, não foi realizado nenhum ensaio avaliando locais com climas diferentes, em condições de campo e utilizando diferentes genótipos. Devido às carências de informações obtidas em áreas tropicais relacionando a inoculação com severidade e produtividade desses genótipos, o objetivo deste trabalho foi comparar métodos de inoculação artificial e natural de *F. verticillioides* em espigas de milho pela quantificação da severidade da doença e avaliar o seu efeito na produtividade de grãos. Os experimentos foram conduzidos na safra agrícola de 2015/2016, em lavouras experimentais de milho, localizados em áreas distintas do Norte, Centro Oeste e do Sul do Brasil, nos municípios de Gurupi, Estado do Tocantins, Itumbiara, Goiás, Planaltina, Distrito Federal e Toledo, Paraná. O delineamento experimental foi igualmente realizado nos quatro locais estudados, sendo o de blocos ao acaso, em fatorial de 10 x 3, com três repetições, sendo 10 genótipos de milho e três métodos de inoculação. Para comprovar a espécie do patógeno, após a coleta de amostras de espigas com o fungo, realizou-se análises de extração de DNA com primer específico de *F. verticillioides*. Em condições de campo, cada unidade experimental dos genótipos foi composta por 2 linhas de 4,5 metros e 30 plantas por cada linha. Cada método de inoculação (spray, injetável e natural) foi composto por duas linhas. Nos tratamentos com inoculação todas as plantas das linhas foram inoculadas, exceto as duas primeiras e as duas últimas plantas. A avaliação ocorreu quando as espigas apresentaram umidade de 13%, e então, as mesmas foram dispostas uma ao lado da outra para a avaliação de severidade. Para quantificação da massa de mil grãos, as espigas de todas as repetições, foram debulhadas para a pesagem em balança digital. Os dados de todos os locais foram submetidos à análise de variância e posterior análise de variância conjunta de todos os locais, e em seguida, ao teste de Tukey para a comparação de médias e desdobramentos de interações significativas. Conclui-se que o método de inoculação artificial através de aspersão no estilo-estigma e o injetável no centro da espiga apresentaram resposta consistente à intensidade de *Fusarium* permitindo diferenciar do método natural. Em Planaltina verificou-se que o método de inoculação por aspersão resultou em maior severidade de *F. verticillioides*. Os híbridos P4285, DKB390PRO2 e DKB310PRO2 foram os mais resistentes nos quatro ambientes, enquanto que o híbrido 32R48YH apresentou a maior severidade. O método de inoculação artificial foi mais eficiente em ambientes de climas amenos e pode ser uma importante ferramenta na seleção e caracterização de genótipos de milho em programas de melhoramento.

Palavras chave: *Zea mays*, infecção, podridão de espigas, sanidade.

2.2 ABSTRACT

Among the main damages of the corn crop are spike rot, especially those caused by the species *Fusarium verticillioides*. One of the most important methods to avoid the attack of this fungus is the use of plants resistant to pathogen, therefore, one of the essential steps for the development of hybrids by breeding programs is the identification of resistance sources through effective inoculation methods for a good characterization of genotypes. Although other authors evaluated some inoculation methods, no test was performed evaluating sites with different climates under field conditions and using different genotypes. Due to the lack of information obtained in tropical areas relating the inoculation with severity and productivity of these genotypes, the objective of this work was to compare methods of artificial and natural inoculation of *F. verticillioides* in ears of corn by quantifying the severity of the disease and to evaluate its effect in grain yield. The experiments were conducted in the 2015/2016 crop, in maize experimental farms located in distinct areas of North, Midwest and Southern Brazil, in the county of Gurupi, Tocantins state, Itumbiara, Goias state, Planaltina, Federal District state and Toledo, Parana state. The experimental design was also carried out at the four sites studied, with a randomized block design, in a 10 x 3 factorial scheme, with three replicates, being 10 corn genotypes and three methods of inoculation. To verify the species of the pathogen, after the collection of ear samples with the fungus, DNA extraction analyzes with specific primer of

F. verticillioides were performed. Under field conditions, each experimental unit of the genotypes consisted of 2 rows of 4.5 meters and 30 plants per row. Each method of inoculation (spray, injectable and natural) was composed of two lines. In the treatments with inoculation all the plants of the lines were inoculated, except the first two and the last two plants. The evaluation occurred when the ears had a moisture content of 13%, and then they were arranged side by side for severity evaluation, then each treatment line, for all replicates, was threshed for the thousand grains and weighing. To quantify the mass of thousand grains, the ears of all replicates were threshed for weighing in a digital scale. The data of all locations were submitted to analysis of variance for each site and subsequent analysis of joint variance of all sites, and then to the Tukey test for the comparison of means for the factors and unfolding of significant interactions. It was concluded that the artificial inoculation method through stilo-stigma and the injectable method in the center of the cob showed a consistent response to the intensity of *Fusarium*, allowing to differentiate from the natural method. In Planaltina, it was verified that the spray inoculation method resulted in a higher severity of *Fusarium verticillioides*. The hybrids P4285, DKB390PRO2 and DKB310PRO2 were the most resistant of the four environments, while the hybrid 32R48YH showed the highest severity. The artificial inoculation method was more efficient in environments with mild climates and can be an important tool for selection and characterization of maize genotypes in breeding programs.

Keywords: *Zea mays*, infection, rot ear, sanity.

2.3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é plantado em todas as regiões do Brasil e do mundo, sendo cultivado sob uma ampla gama de clima e condições de cultivo. A produção brasileira é de cerca de 80 milhões de toneladas de grãos por ano, classificando o país como um dos maiores produtores mundiais e exportadores deste cereal (FAO, 2017). Este cereal tem destacada importância também na alimentação humana, na produção de combustível etanol principalmente nos Estados Unidos, além de ser matéria prima para a fabricação dos mais variados produtos (EMBRAPA, 2011; EMYGDIO et al., 2013).

No campo, o milho muitas vezes tem seu potencial produtivo comprometido pela ocorrência de doenças que provocam danos em várias partes da planta causando muitos prejuízos, por isso, vários fatores devem ser levados em consideração de forma a garantir as melhores condições para o desenvolvimento do híbrido.

Dentre as doenças mais importantes e de difícil controle, estão as podridões de espiga que reduzem a quantidade e qualidade dos grãos (WHITE, 1999; REID et al., 1999; PRESELLO et al., 2008). As principais doenças associadas ao milho, no Brasil, são causadas por fungos, sendo representado principalmente pelo gênero *Fusarium*, que além de atacarem as raízes e colmo da planta, são os grandes causadores de grãos ardidos (Chagas et al., 2018) que comprometem a produção e na maioria dos casos são identificados apenas nos centros de processamentos.

As principais vias de infecção desse patógeno em espigas de milho são através do estilo-estigma e por ferimentos nos grãos (REID et al., 1996). Estes patógenos podem ainda produzir micotoxinas, que são substâncias tóxicas capazes de causar intoxicações agudas ou crônicas nos homens e animais, sendo a fumonisina, a principal micotoxina encontrada em grãos de milho.

Um dos mais importantes métodos para evitar o ataque deste fungo é a utilização de plantas resistentes ao patógeno, desta forma, um dos passos essenciais para o desenvolvimento de híbridos pelos programas de melhoramento é a identificação de fontes de resistência (SCHAAFSMA et al., 1997) através de métodos de inoculação eficazes para uma boa caracterização de genótipos. Para esta caracterização, diversas técnicas de inoculação artificial foram descritas, dentre elas podem ser citadas pulverizações de suspensão de conídios sobre os estilo-estigmas (WARREN, 1978; GULYA et al., 1980); injeção de esporos dentro do canal do estilo-estigma através da palha (REID et al., 1992a); inserção de palitos colonizados pelo patógeno e colocados entre os estilo-estigmas (SUTTON & BALIKO, 1981); grãos infectados

através de ferimentos com pinos de aço imersos em suspensão macronidial; ou infectados através de injeção de inóculo dentro dos grãos (REID & HAMILTON, 1996). No Brasil, NASCIMENTO et al. (2010) testou 12 métodos de inoculação artificial que demonstraram haver diferenças estatísticas significativas entre os métodos para alguns dos híbridos avaliados.

Foi verificado na literatura que apesar de outros autores terem avaliado alguns métodos de inoculação, não foi feito nenhum ensaio avaliando locais com climas diferentes, em condições de campo e utilizando diferentes genótipos. Portanto, existem carências dessas informações devido poucos trabalhos terem sido desenvolvidos em áreas tropicais relacionando a inoculação em regiões diferentes e os efeitos sobre a severidade e produtividade desses genótipos.

Desta forma, o objetivo geral do trabalho foi comparar em locais diferentes métodos de inoculação artificial e natural de *F. verticillioides* em diferentes genótipos de milho pela quantificação da severidade da doença e produtividade.

2.4 MATERIAI E MÉTODOS

Isolamento do patógeno, produção de inóculo e Postulados de Koch:

Para o isolamento do patógeno, sementes sintomáticas foram analisadas quanto à presença de *F. verticillioides*. Em seguida, procedeu-se a repicagem do fungo para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200g batata, 20g de dextrose, 20g de ágar e 1000mL de água destilada). Os isolados foram identificados com base em sua morfologia típica, que se caracterizou pela presença de longas cadeias de microconídios produzidos em monofiáides (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Na purificação das colônias dos isolados, foi utilizada a técnica da cultura monospórica (FERNANDEZ, 1993), em que uma suspensão de conídios do fungo foi colocada em 5mL de água destilada e esterilizada, em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar (AA: 20g de ágar e 1000mL de água destilada). Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, foi realizado a observação dos conídios germinados, em microscópio ótico. Os conídios que germinaram, isoladamente foram repicados para tubos de experimento e placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para posteriores trabalhos de inoculações. Os Postulados de Koch foram feitos em plantas sadias do híbrido 32R48YH, em estágio fenológico R1, com inoculações da suspensão do fungo nos estilo-estigmas contendo 5×10^5 conídios.mL⁻¹.

Decorridos 25 dias da inoculação, todas as espigas foram colhidas para plaqueamento e identificação do patógeno presente nos grãos.

Identificação molecular dos isolados e amplificação do DNA por PCR:

O DNA de *F. verticillioides* foi extraído no laboratório de Fitopatologia da DuPont Pioneer S.A., situada na cidade de Porto Nacional-TO, de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Para a amplificação do DNA por PCR, os pares de primers usados na reação foram os iniciadores VER-1 (5'-CTT CCT GCG ATG TTT CTCC-3') e VER-2 (5'-AAT TGG CCA TTG GTA TTA TAT ATCTA-3') para amplificar o gene específico calmodulina de isolados de *F. verticillioides*.

Isolados da mesma amostra submetida à análise de PCR foram enviados para o Laboratório Agrônomo, credenciado pelo Ministério da Agricultura para uma segunda análise de PCR e confirmação por meio de sequenciamento.

Locais dos experimentos:

Os experimentos foram conduzidos na safra agrícola de 2015/2016, em lavouras experimentais de milho, localizados em áreas distintas do Norte, Centro Oeste e do Sul do Brasil, nos municípios de Gurupi, no Tocantins (TO), Toledo, no Paraná (PR), Planaltina, no Distrito Federal (DF) e Itumbiara, em Goiás (GO). O município de Gurupi, no estado do Tocantins, Brasil, está inserida no Bioma Cerrado e segundo a classificação de Köppen-Geiger, 1928, o clima da região é Aw, definido como tropical quente e úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno e altitude de 278. O período de instalação e condução do experimento foi de 20 de fevereiro a 15 de Junho de 2016. O município de Toledo, no estado do Paraná, está inserido no Bioma Mata Atlântica e altitude de 550 m. O clima da região é Cfa, definido como clima subtropical, com verões quentes, geadas pouco frequentes, sem estação seca definida. O período de instalação e condução do experimento foi de 19 de fevereiro a 25 de julho de 2016. O município de Planaltina, no estado do Distrito Federal, está inserido no Bioma Cerrado e tem altitude de 1175 m. O clima da região é Aw, definido como tropical quente e úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. O período de condução foi de 23 de dezembro 2015 a 29 de abril 2016. O município de Itumbiara, no estado do Goiás, está inserido no Bioma Cerrado e Mata Atlântica e tem altitude de 448m; o clima da região é Aw, definido como tropical quente

e úmido com estação chuvosa no verão. O período de instalação deste experimento foi de 14 de dezembro de 2015 a 16 de abril de 2016.

Foram avaliadas as temperaturas máximas e mínimas (°C) e precipitações (mm) dos quatro locais durante o período compreendido entre a inoculação do patógeno até a colheita dos grãos.

Delineamento experimental e tratamentos:

Genótipos:

O delineamento experimental foi igualmente realizado nos quatro locais estudados, sendo o de blocos ao acaso, em esquema fatorial de 10 x 3, com três repetições, sendo 10 genótipos de milho tratados com os fungicidas Metalaxil-M (10g/L) e Fludioxonil (25g/L) e três métodos de inoculação. Os dez híbridos de milho utilizados, foram: P30K75Y, P32R48YH, P3250, P3340YHR, P3630H, P4285H, DKB240PRO2, DKB390PRO2, DKB310PRO2 e DOW30A37PW.

Em condições de campo, cada parcela experimental foi composta por 2 linhas de 4,5 metros, sendo 30 plantas por cada linha. Em cada método de inoculação foram utilizadas duas linhas. Nos tratamentos com inoculação artificial, todas as plantas das linhas foram inoculadas, exceto as duas primeiras e duas últimas plantas. Duas linhas foram destinadas à inoculação da suspensão de conídios de *F. verticillioides*, na forma injetável, no centro da espiga, e outras duas linhas, na forma de aspersão. Deixou-se também duas linhas destinadas à testemunha (infecção natural), onde não houve inoculação artificial, sendo as plantas molhadas apenas com água da irrigação. Nenhum tipo de fungicida foi aplicado nas plantas dos experimentos.

Métodos de inoculação:

Para inoculação de *F. verticillioides* nas espigas, uma suspensão desse fungo foi obtida a partir do seu cultivo em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar). Os micélios do fungo, em meio de cultura com idade de 15 dias, foram triturados em liquidificador, posteriormente, esse triturado foi peneirado para a remoção das partículas grosseiras do meio de cultura. Então, calibrrou-se a suspensão do inóculo com auxílio de um hemocitômetro, com uma concentração ajustada para 5×10^5 conídios.mL⁻¹. Em ambos os métodos de inoculação artificial, realizou-se a inoculação de 2mL desta suspensão por espiga quando as plantas estavam em estágio fenológico R1, caracterizado como "florescimento e polinização", com os estilo-estigmas

começando a escurecer, aproximadamente entre o sétimo e o décimo dia após o início do florescimento, período de maior susceptibilidade a infecção (MUNKVOLD et al, 1997).

Foram utilizados os seguintes métodos: Método injetável da suspensão de conídios no centro da espiga: Realizou-se a inoculação da suspensão de conídio de *F. verticillioides* com o auxílio de uma seringa dosadora com alimentação automática, o qual o inóculo foi injetado no centro da espiga. O método injetável simula a infecção das espigas de milho pelo fungo a partir de danos físicos ocasionados nas espigas, em sua maioria, causados por insetos. Método por aspersão da suspensão de conídios no estilo estilo-estigma: A inoculação da suspensão de conídio de *F. verticillioides* foi realizada com o auxílio de um borrifador de água devidamente esterilizado, o qual o inóculo foi depositado sob os estilo-estigmas da espiga na forma de aspersão (borrifado). O método de aspersão na forma de spray simula a disseminação natural dos esporos que chegam até os estigmas das espigas. Método natural: Infecção realizada naturalmente, onde não houve nenhum tipo de inoculação artificial (testemunha).

Após as inoculações, um saco de papel (volume de 2 litros) foi utilizado para cobrir cada espiga com o objetivo de proporcionar um melhor ambiente para o desenvolvimento do patógeno, bem como, servindo de barreira para evitar interferência de outras parcelas e ataques de pássaros.

Estrutura para gerenciar microclima no ambiente:

Nos quatro locais plantados realizou-se a implantação de uma mini-estação meteorológica capaz de registrar as variáveis climáticas e proporcionar um microclima favorável ao desenvolvimento da doença nas espigas. A instalação foi iniciada a partir da inoculação, indo do florescimento até a colheita. Esta estrutura foi composta por uma bomba elétrica acoplada a um sistema de irrigação conectada a micro aspersores de nebulização. Um “timer” controlou o acionamento de todo o sistema. A programação da nebulização nas plantas foi a mesma em todos os locais dos experimentos, sendo um total de doze por dia, com duração de 5 minutos cada, iniciando-se às 8:00h até às 20:00h.

Colheita das espigas e Avaliação dos experimentos:

Quando os genótipos estavam na fase fenológica R6, caracterizada como "maturação fisiológica", iniciou-se o monitoramento da umidade dos grãos até atingir o nível de 17%. Em seguida, foi colhido um total de 150 espigas, sendo coletadas 50 espigas por cada tratamento

de inoculação. Posteriormente, as espigas foram dispostas no secador automatizado para que os grãos atingissem umidade de 13%, para em seguida, proceder-se a debulha. Antes da debulha, as espigas foram dispostas uma ao lado da outra para a avaliação de severidade da doença, e na sequência, foram debulhadas.

Avaliação de Severidade:

A avaliação da severidade da doença foi realizada momentos antes da debulha dos grãos, quando estes se encontravam colhidos. A avaliação foi feita de forma visual e comparativa onde foi atribuída uma nota visual de acordo com os aspectos das espigas. A severidade foi avaliada por meio da seguinte escala diagramática que estima a porcentagem da área da espiga com sintomas de podridão, caracterizada pela cobertura com micélio de coloração branco a róseo e pela presença de grãos escurecidos e/ou com estrias brancas no pericarpo, sendo Grau 1 = 0% (sadia), 2 = 0,5%, 3 = 10%, 4 = 30%, 5 = 50%, 6 = 70%, 7 = 80%, 8 = 90% e 9 = 100% da área da espiga exibindo sintomas visíveis da doença (AGROCERES, 1996).

Os híbridos que receberam notas de 1 a 3 foram classificados como de alta a mediana resistência à podridão da espiga. Os que receberam notas de 4 a 6 foram classificados como de mediana susceptibilidade e os híbridos que receberam notas de 7 a 9, foram classificados como de mediano a altamente susceptíveis.

Massa de mil grãos:

A avaliação da massa de mil grãos, em gramas, foi realizada logo após a debulha das espigas, contabilizando mil grãos de cada linha do tratamento, para todas as repetições e pesado em balança calibrada por empresa certificadora com controle de qualidade amparada na norma NBR ISO IEC17025:2005 (NBR: Norma Brasileira; ISO: *International Organization of Standardization*; IEC: *International Electrotechnical Commission*). A norma 17025:2005 é uma norma para sistema de gestão de qualidade para laboratórios.

Análise estatística:

Anteriormente à realização da análise de variância, os dados foram verificados quanto ao atendimento dos pressupostos do modelo matemático de normalidade dos erros, pelo teste

de Shapiro-Wilk (Shapiro-Wilk, 1967) e homogeneidade de variância dos erros, pelo teste de Batlett (Batlet, 1937). Quando os dados não atenderam algum destes pressupostos, foram transformados pela metodologia de Box-Cox. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância para cada local e posterior análise de variância conjunta de todos os locais, e em seguida, ao teste de Tukey para a comparação de medias para os fatores e desdobramentos de interações significativas.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação dos isolados:

Na Figura 01, pode-se observar o peso molecular das amostras de DNA dos isolados fúngicos obtidos de espigas com podridão, contendo sementes sintomáticas. A amostra resultou em 658 e 986 nucleotídeos para região EF e RPB2, respectivamente. Esta sequência apresentou 99% de identidade com *F. verticillioides* (Acesso nº FN179338.1) e (Acesso nº FN552106.1), respectivamente, cobrindo 99% da sequência (Query cover), de acordo com consulta ao BLAST (NCBI), Icl/Query_25443 e Icl/Query_10149, conforme laudo de Sanidade Vegetal 3162/2017- AGR.

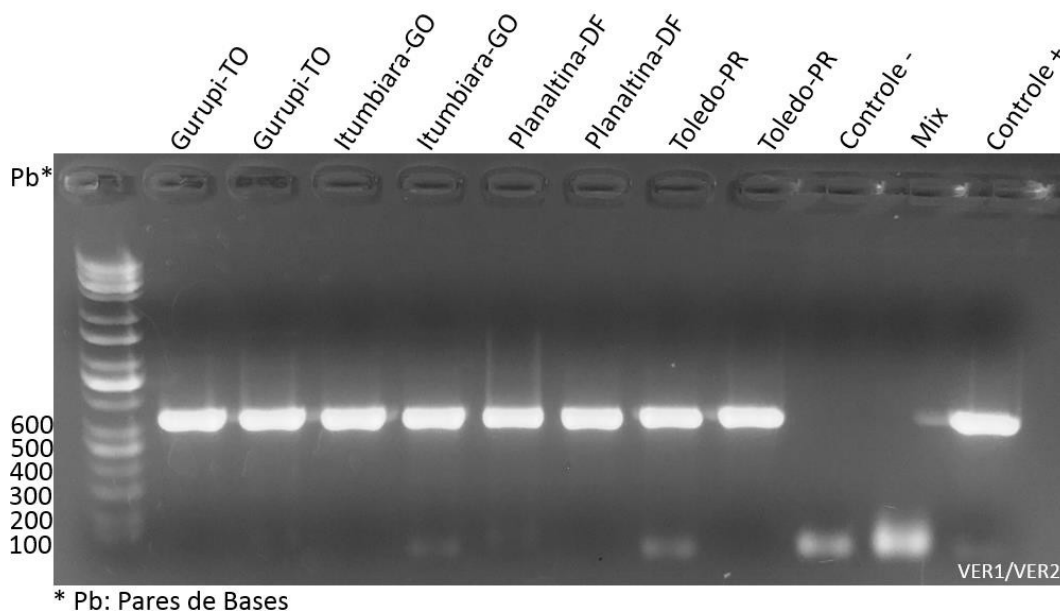


Figura 01: Peso molecular de amostras de isolados fúngicos obtidos de milho (A), sendo: isolados 01 e 02: procedentes de Gurupi-TO; isolados 03 e 04: procedentes de Itumbiara-GO; isolados 05 e 06: procedentes de Planaltina-DF; isolados 07 e 08: procedentes de Toledo-PR; Controle negativo (Controle -): Folha de milho sadia; Mix: Controle relativo, sem adição de DNA; Controle positivo (Controle +): Isolado de *Fusarium verticillioides*.

Postulados de Koch:

Verificou-se a reprodução dos sintomas de *Fusarium* em espigas de milho após a inoculação, bem como, foi verificado através do reisolamento do patógeno, as mesmas características morfológicas das culturas observadas anteriormente.

Análise de variância:

De acordo com a análise de variância (tabela 01), observou-se que a interação entre os métodos de inoculação e genótipo não foi significativa para severidade e massa de mil grãos, desta forma, não foram realizadas análises específicas considerando-se os genótipos em cada local, pois o padrão de resposta dos materiais foi semelhante para todos as inoculações.

Embora a interação entre genótipos e inoculação não tenha sido significativa, o efeito isolado de cada um dos métodos de inoculação foi significativo.

Tabela 01: Análise de variância conjunta para massa de mil grãos (MMG) e severidade (SEV) considerando três métodos de inoculação de *Fusarium verticillioides* em 10 híbridos comerciais de milho plantados em quatro locais diferentes no Brasil.

	MMG					Severidade			
	GL	QM	Fc	Ftab		QM	Fc	Ftab	
BLOCO/AMBIENTE	8	753,64	205,67	1,98	*	0,13	1,13	1,98	ns
INOCULAÇÃO	2	13290,95	4,98	3,03	*	121,97	41,25	3,10	*
GENÓTIPO	9	16437,67	6,16	1,92	*	12,18	4,12	1,99	*
INOCULAÇÃO*GENÓTIPO	18	863,66	0,32	1,65	ns	1,76	0,60	1,72	ns
AMBIENTE	3	184416,19	53,91	2,72	*	69,90	22,72	2,70	*
AMBIENTE*TRATAMENTO ¹	87	2667,55	727,97	1,33	*	2,96	26,72	1,33	*
ERRO MÉDIO	232	3,66				0,11			
		Média: 285,2	CV: 19,82			Média: 6,13	CV: 5,43		

*Significativa ao nível de 5%, pelo Teste F.

¹ Tratamento: Combinação dos níveis dos fatores: inoculação e materiais.

A temperatura média extraída dos locais durante a permanência dos experimentos foram: Gurupi-TO: 28,43°C; Itumbiara-GO: 23,1°C; Planaltina-DF: 22,13 e em Toledo-PR: 13,64°C. Nenhum dos quatro locais apresentaram diferenças para a variável massa de mil grãos, porém, para os experimentos instalados nos locais de Toledo e Planaltina, verificou-se diferenças significativas ($P < 0.05$) para a severidade da doença entre os métodos de inoculação estudados (Tabela 02).

Tabela 02: Médias da Massa de mil grãos (MMG) e severidade (SEV) da Podridão de espigas de milho em função de três métodos de inoculação de *Fusarium verticillioides* em quatro diferentes ambientes.

Média de massa de mil grãos e severidade de <i>Fusarium</i>				
Gurupi-TO				
Tipo de Inoculação	MMG		SEV	
Testemunha	294,10	a	3,40	a
Aspersão	289,27	a	4,30	a
Injetável	274,50	a	4,23	a
Média	285,96		3,98	
Temperatura média:	28,43°C			
Itumbiara-GO				
Testemunha	253,57	a	3,90	a
Injetável	218,33	a	5,60	a
Aspersão	212,37	a	5,60	a
Média	228,09		5,03	
Temperatura média:	23,01°C			
Planaltina-GO				
Testemunha	345,73	a	2,03	a
Injetável	339,97	a	3,47	ab
Aspersão	330,83	a	5,03	b
Média	338,84		3,51	
Temperatura média:	22,13°C			
Toledo-PR				
Testemunha	295,60	a	1,63	a
Injetável	289,17	a	3,43	b
Aspersão	278,90	a	3,80	b
Média	287,89		2,96	
Temperatura média:	13,64°C			

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os híbridos cultivados nos municípios de Gurupi e Itumbiara não apresentaram nenhuma diferença entre os três métodos de inoculação para a variável severidade, diferentemente dos locais de Planaltina e Toledo, que apresentaram maior severidade quando os híbridos foram inoculados pelos dois métodos artificiais. Para a variável de massa de mil grãos, nenhum dos quatro locais apresentaram diferenças significativas.

Pode-se verificar que os híbridos plantados no município de Toledo-PR, que foram inoculados pelos dois métodos de inoculação artificial apresentaram maior severidade do que a testemunha (Figura 02). Também observou-se que os híbridos cultivados em Planaltina-DF, os quais foram inoculados por aspersão da suspensão do conídio no stilo-estigma, apresentaram maior severidade, quando comparados com os genótipos que receberam inoculação de forma injetável e a inoculação natural (testemunha), porém estes métodos artificiais não diferiram entre si (Fig. 02). O método de aspersão no estilo-estigma permitiu simular a infecção natural e foi capaz de proporcionar maiores severidades nos híbridos testados. Os autores CHUNGU et al. (1996), REID et al. (1996) e SCHAAFSMA et al. (1993). REID et al. (1992a) verificaram que o método de inoculação depositando o inóculo no estilo-estigma foi eficiente, permitindo diferenciar genótipos resistentes de suscetíveis.

A severidade média da doença encontrada entre os três métodos de inoculação artificial, pode ser influenciado pelo ambiente, e neste caso, sugere-se que pode haver envolvimento de mecanismos que inibem a infecção e a colonização de *F. verticillioides*. Em ambos os locais, nos municípios de Toledo-PR e Planaltina-DF, apresentaram um clima mais ameno do que nos outros municípios (Figura 02). O clima ameno poderá influenciar positivamente na maior taxa de infecção do fungo, consequentemente, maior nível de severidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Reid et al (1996), quando verificou altas severidades em diferentes híbridos quando testados em ambientes mais amenos.

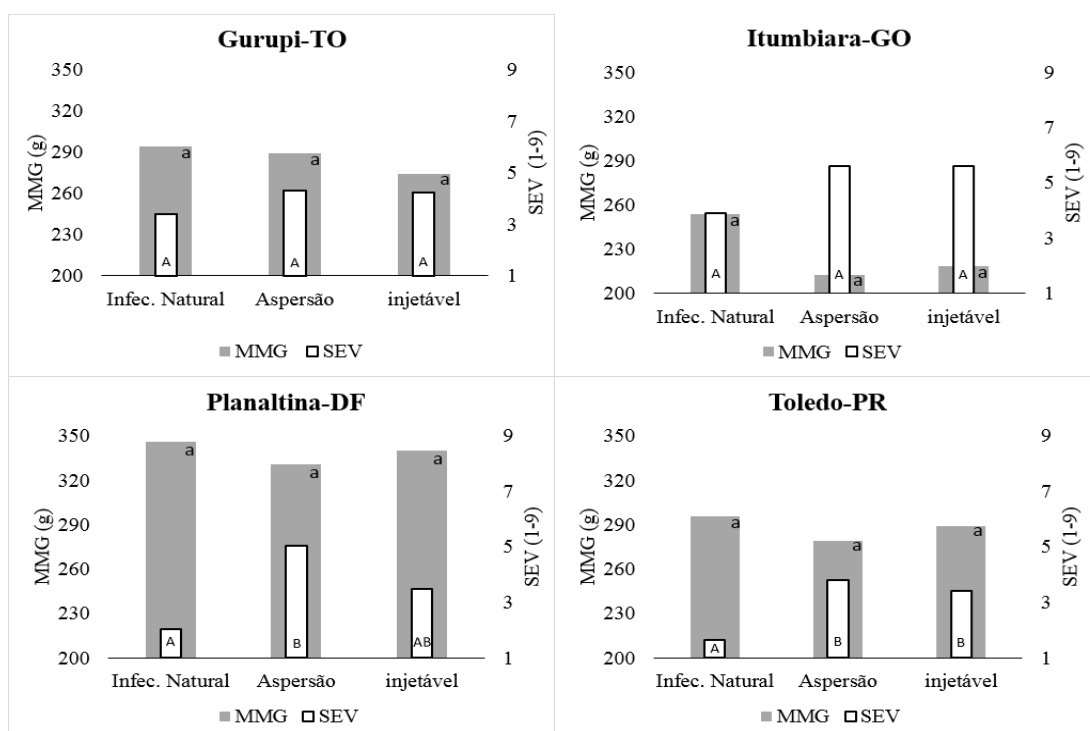


Figura 02: Massa de mil grãos (a) e Severidade da podridão de espiga (A) de milho causado por *Fusarium verticillioides* em função de diferentes métodos de inoculação e temperaturas. Temperaturas: Gurupi 28, 43 °C, Itumbiara 23,01 °C , Planaltina 22,13 °C e Toledo 13,64 °C .

Em Planaltina, os híbridos P4285H, DKB310PRO2 e DKB240PRO2, inoculados pelo método de aspersão, apresentaram o maior nível de resistentes do experimento. Já o híbrido 32R48YH apresentou a maior severidade, de 5,33, enquanto que para o local de Toledo, não houve diferença para as severidades entre os híbridos avaliados (Tabela 3).

Tabela 03: Severidade (SEV) da Podridão de espigas de milho inoculados por *Fusarium verticillioides* em quatro diferentes ambientes.

Gurupi		Itumbiara-GO		Planaltina-GO		Toledo-PR	
Genótipo	SEV	Genótipo	SEV	Genótipo	SEV	Genótipo	SEV
DKB310PRO2	2,56 a	P4285H	2,89 a	P4285H	2,67 a	DKB 240PRO2	2,11 a
DKB390PRO2	2,78 a	DKB390PRO2	4,33 a	DKB310PRO2	2,78 a	DKB390PRO2	2,44 a
P3340YHR	3,44 a	DKB310PRO2	4,56 ab	DKB240PRO2	3,00 a	30K75Y	2,56 a
P3630H	3,78 a	32R48YH	4,67 ab	P3630H	3,22 ab	P4285H	2,78 a
P4285H	3,89 a	P3630H	4,67 ab	P3340YHR	3,33 ab	DOW30A37PW	2,89 a
P3250	4,00 a	P3250	5,33 ab	P3250	3,44 ab	P3630H	3,00 a
30K75Y	4,11 ab	DOW30A37PW	5,44 b	DKB390PRO2	3,67 ab	DKB310PRO2	3,11 a
DKB 240PRO2	4,11 ab	30K75Y	6,11 b	DOW30A37PW	3,67 ab	P3340YHR	3,33 a
DOW30A37PW	4,56 ab	DKB 240PRO2	6,11 b	30K75Y	4,00 ab	32R48YH	3,56 a
32R48YH	6,56 c	P3340YHR	6,22 b	32R48YH	5,33 b	P3250	3,78 a
Média	3,98	Média	5,03	Média	3,51	Média	2,96

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em Gurupi, o híbrido 32R48YH, assim como em Planaltina e em Toledo, também apresentou a maior severidade do local. Diferentemente de Itumbiara o qual este mesmo híbrido apresentou severidade intermediária em relação aos demais, possivelmente devido ao fator temperatura influenciar de forma positiva no desempenho do patógenos neste genótipo.

Ainda em Itumbiara verificou-se que os híbridos P4285, DKB390PRO2 e DKB310PRO2 apresentaram os maiores níveis de resistência do ensaio. Este resultado repetiu- se em quase todos os locais.

Híbridos de milho podem expressar diferentes performances quando estabelecidos em ambientes diferentes, onde o clima é fator importante para o crescimento da planta, influencia no desenvolvimento da doença bem como nas suas interações.

ALI et al. (2005) relataram a existência de dois mecanismos de resistência distintos que impedem a podridão de *Fusarium*. O primeiro refere-se à resistência do estilo-estigma que é a capacidade do genótipo em prevenir a infecção e colonização do fungo para o interior do canal do estilo-estigma, porém, este mecanismo não é totalmente compreendido, e pode ser

mais complexo do que uma barreira física (REID Et al., 1992b; REID et al., 1994). O segundo refere-se à resistência do grão, que retarda a colonização do patógeno na espiga, uma vez que este tenha crescido para o interior do canal do estilo-estigma ou tenha sido introduzido por ferimento (REID Et al., 1992b; REID et al., 1994). MESTERHÁZY et al. (2012) afirmam que a resistência aos dois modos principais de infecção do fungo na espiga, por meio do estilo-estigma ou através de ferimentos dos grãos, não se correlacionam em todos os genótipos.

No Brasil, NASCIMENTO et al. (2010), comparou 12 métodos de inoculação artificial simulando a infecção via estilo-estigma e danos causados por insetos. Os resultados desse estudo mostraram não haver diferenças estatísticas significativas entre os métodos para a maioria dos híbridos avaliados, porém, observou uma leve tendência a maiores severidades nas espigas de híbridos quando se fez inoculação pela via estilo-estigma, com posterior câmara úmida por 48 horas.

SCHAAFSMA et al. (1993) concluíram que métodos de inoculação artificial que utilizam injúrias nos grãos e aplicações de inóculo dentro das brácteas resultam em maior severidade de podridões de espiga, porém, neste estudo, não foi relatado nenhuma forma de cobertura realizada nas espigas após a inoculação, o que contradiz os resultados encontrados no município de Planaltina, onde a inoculação por aspersão apresentou maior severidade.

Entre os métodos de inoculação avaliados, ambos métodos artificiais demonstraram eficácia na indução da doença quando comparados com a testemunha, principalmente nos ensaios conduzidos em Planaltina-DF e em Toledo-PR. Possivelmente o clima mais ameno desses locais pode ter influenciado no desenvolvimento do patógeno quando inoculados naturalmente. Acredita-se que, diferentemente da inoculação natural, onde normalmente ocorre dispersão ao acaso do patógeno, o método artificial foi capaz de proporcionar maiores chances do fungo infectar e colonizar as espigas de maneira mais uniforme.

2.6 CONCLUSÃO

O método de inoculação artificial através de aspersão no estilo-estigma e o injetável no centro da espiga apresentaram resposta mais consistente à intensidade da doença, possibilitando diferenciar do método natural.

Em Planaltina, verificou-se que o método de inoculação por aspersão resultou em maior severidade da doença, causada por *Fusarium verticillioides* do que o método de inoculação injetável no centro da espiga.

Os híbridos de milho P4285, DKB390PRO2 e DKB310PRO2 foram os mais resistentes à podridão da espiga, nos quatro ambientes, enquanto que o híbrido 32R48YH apresentou a maior severidade da doença.

O método de inoculação artificial foi o mais eficiente em ambientes de climas amenos e pode ser uma importante ferramenta na seleção e caracterização de genótipos de milho em programas de melhoramento.

2.7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGROCERES - Guia de Sanidade Agroceres. São Paulo. v. 2 p. 34-36, 1996.

ALI, M. L.; TAYLOR, J. H.; JIE, L.; SUN, G.; WILLIAM, M.; KASHA, K. J.; REID, L. M.; PAULS, K. P. Molecular mapping of QTLs for resistance to Gibberella ear rot, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. *Genome*, v. 48, p. 521–533, 2005.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society, Series A*, v.160, p.268–282, 1937.

CHAGAS, J.F.; COSTA, R.V.; SANTOS, G.R. Sanitary analysis of asymptomatic and damaged grains of maize in Tocantins, Brazil. *Brazilian Journal of Agriculture*, 93 (1): 33-46, 2018.

CHUNGU C.; MATHER D. E.; REID L. M.; HAMILTON R. I. Comparison of techniques for inoculating maize silk, kernel, and cob tissues with *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 80, p. 81-84, 1996.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.

EMBRAPA Milho e Sorgo – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Cultivo do milho*, 2011.

EMYGDIO B. M.; ROSA A. P. S. A.; TEIXEIRA M. C. C. Indicações técnicas para o cultivo de milho e de sorgo no Rio Grande do Sul safras 2013/2014 e 2014/2015. Embrapa, Brasília, DF. 2013. 124p.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em 03 nov. 2017.

FERNANDEZ, M. R. Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p.

GULYA, T. J., JR., C. A. MARTINSON; P. J. LOESCH, J. R. Evaluation of inoculation techniques and rating dates for *Fusarium moniliforme* ear rot of *opaque-2* maize. *Phytopathology*, Iowa, v. 70, p. 1116-1118, 1980.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. Klimate der Erde. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928. Wall-map 150cmx200cm.

LESLIE JF; SUMMERELL BA. The *Fusarium* laboratory manual, 1st ed. Blackwell Publishing Ltd; Oxford, London: 2006.

MESTERHÁZY, Á.; LEMMENS, M.; REID, L. M. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize - a review. *Plant Breeding*, v. 131, p. 1-19, 2012.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Disease*, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.

NASCIMENTO, J. P. Avaliação de métodos de inoculação de *Gibberella zeae* em espigas de milho. 37 p. (Dissertação Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2010.

PRESELLO, D. A.; BOTTA, G.; IGLESIAS, J.; EYHÉRABIDE, G. H. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Crop Protection*, v. 27, p. 572-576, 2008.

REID, L. M., HAMILTON, R. I., MATHER, D. E. Screening maize for resistance to gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON. Technical Bulletin 1996-5E. 1996.

REID, L. M., MATHER, D. E., BOLTON, A. T., HAMILTON R. I. Evidence for a gene for silk resistance to *Fusarium graminearum* Schwabe ear rot of maize. *Journal of Heredity*, v. 85, p. 118-121, 1994.

REID, L. M.; BOLTON, A. T.; HAMILTON, R. I.; WOLDEMARIAN, T.; MATHER, D. E. Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 14, p. 293-298, 1992a.

REID, L. M.; BOLTON, A. T.; HAMILTON, R. I.; WOLDEMARIAN, T.; MATHER, D. E. Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 14, p. 293-298, 1992a.

REID, L. M.; HAMILTON, R. I. Effects of inoculation position, timing, macroconidial concentration and irrigation on resistance of maize to *Fusarium graminearum* infection through kernels. *Can. J. Plant Pathology*, v. 18, p. 279-285, 1996.

REID, L. M.; MATHER, D. E.; HAMILTON, R. I. Observation of silk resistance to *Fusarium graminearum* in germplasm with resistance to *Aspergillus flavus* and *Heliothis zea*. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, v. 66, p. 85-86, 1992b.

REID, L. M.; NICOL, R.W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J. D.; YOUNG, J. C.; STEWART, D. W.; SCHAAFSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology*, Iowa, v. 89, p. 1028-1037, 1999.

SCHAAFSMA, A. W.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E.; EWING, R. J. Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid, and species of *Fusarium*. *Canadian Journal Plant Pathology*, v. 15, p. 185-192, 1993.

SCHAAFSMA, A. W.; NICOL, R. W.; REID, L. M.; Evaluating commercial maize hybrids for resistance to *Gibberella* ear rot. *European Journal Plant Pathology*, v. 103, p. 737-746, 1997.

SHAPIRO, S. S. e M. B. WILK (1965) An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika Trust, London*, v. 52, p. 591-609. 3/4 (Dec., 1965).

SUTTON, J. C.; BALIKO, W.: Methods for quantifying resistance to *Gibberella zeae* in maize ears. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 3, p. 26-32, 1981.

WARREN, H. L. Comparison of normal and high-lysine maize inbreds for resistance to kernel rot caused by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology, Iowa*, v. 68, p. 1331-1335, 1978.

WHITE, D. G. Compendium of corn diseases. 3th Ed. The American Phytopathological Society. APS Press. 1999.

Capítulo 3:

TRANSMISSÃO E INCIDÊNCIA de *Fusarium verticillioides* EM SEMENTES DE GENÓTIPOS DE MILHO EM FUNÇÃO DO MÉTODO DE INOCULAÇÃO NAS ESPIGAS

3.1 RESUMO

A semente é o principal insumo, uma vez que transporta para o campo o potencial genético da espécie, desta forma, é necessário que possua elevado potencial fisiológico e ausência de patógenos. A maioria dos fitopatógenos consegue ser transmitida das plantas para as sementes e destas também para as áreas de cultivo reiniciando as epidemias no campo. Na cultura do milho, a espécie *Fusarium verticillioides*, possui a capacidade de transmissão das sementes para as espigas de forma sistêmica. Verificou-se escassez de trabalhos relacionando o método de inoculação de *F. verticillioides* nas espigas com a qualidade sanitária de sementes e transmissão para as plantas. Desta forma, este trabalho teve por objetivo avaliar a transmissão e incidência de *F. verticillioides* em sementes de milho oriundas de espigas inoculadas com diferentes métodos. O experimento foi conduzido na safra agrícola de 2015/2016, em lavoura experimental de milho, localizado no município de Toledo, no Paraná. O delineamento experimental a campo foi o em Blocos Casualizados, em esquema fatorial de 10x3, com quatro repetições, sendo 10 híbridos de milho e três métodos de inoculação (spray, injetável e natural). Após as coletas das espigas foram feitas análises das sementes em laboratório no delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 10 (sementes de 10 genótipos de milho) x 3 (métodos de inoculação) e quatro repetições. Cada repetição consistiu de um *Gerbox* contendo 25 sementes. Avaliou-se a qualidade sanitária das sementes de milho através do método Blotter test, percentual de germinação das sementes, emergência das plântulas e transmissão do patógeno das sementes para as plântulas. Para comprovar a transmissibilidade do patógeno das sementes para as plantas, após as coletas dos tecidos de folhas e caules foram feitas análises de extração de DNA com primer específico de *F. verticillioides*. Também foi possível identificar a sensibilidade das técnicas de PCR, que amplificaram as concentrações de DNA testadas. A técnica de PCR utilizada foi capaz de detectar até 1% de infecção nas sementes. Concluiu-se que as inoculações feitas nas espigas das plantas com spray resultaram em maior incidência do patógeno nas sementes quando comparada aos demais tratamentos, apresentando ser o método mais eficiente. Os híbridos 32R48YH e o DKB240PRO2 tiveram o maior nível de infecção por *F. verticillioides* pois apresentaram a maior incidência do fungo. Enquanto que os híbridos P3630H e P4285H demonstraram ser os mais resistentes, pois demonstraram os menores níveis de incidência do patógeno.

Palavras chave: Transmissibilidade, sanidade, *Zea mays*.

3.2 ABSTRACT

The seed is the main input, since it carries to the field the whole genetic potential of the species, and for this way, it is necessary that the seed has high physiological potential and absence of pathogens. Most of the plant pathogens can be transmitted from the plants to the seeds and from these also to the crop areas, restarting the epidemics in the field. In the corn crop, the *Fusarium*

verticillioides species, can transmit the seeds to the spikes in a systemic way. There was a shortage of papers related to the method of inoculation of *F. verticillioides* in the ear of corn with the sanitary quality of seeds and transmission to the plants. Thus, this work had the objective of evaluating the transmission and incidence of *F. verticillioides* in corn seeds from spikes inoculated with different methods. The experiment was conducted in the agricultural crop of 2015/2016, in experimental maize crop, located in the municipality of Toledo, Paraná. The experimental design was randomized blocks, in a 10x3 factorial scheme, with four replicates, being 10 corn hybrids and three methods of inoculation (spray, injectable and natural). After the collection of the ears, seed analyze on the seeds were performed in laboratory through of completely randomized experimental design, in a factorial scheme of 10 (corn seed of ten genotypes) x 3 (inoculation methods) and four replications. Each replicate consisted of a Gerbox containing 25 seeds. The sanitary quality of corn seeds was evaluated through the filter paper method or Blotter test, percentage of seed germination, seedling emergence and seed pathogen transmission to seedlings in different organs. To verify the transmissibility of the seed pathogen to the plants, after extractions of leaf and stem tissues, DNA extraction analyzes with specific primer of *F. verticillioides* were made. It was also possible to identify the sensitivity of the PCR techniques, which amplified the DNA concentrations tested. The PCR technique used was able to detect up to 1% of infection. It was concluded that the artificial inoculations performed on the ears through spray, resulted in a higher incidence of the pathogen in the seeds when compared to the other treatments, being the most efficient method. Hybrids 32R48YH and DKB240PRO2 had the highest level of infection by *F. verticillioides* because they had the highest incidence of the fungus. While the hybrids P3630H and P4285H proved to be the most resistant because they demonstrated the lower levels of incidence of the pathogen.

Keywords: Transmissibility, sanity, *Zea mays*.

3.3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é cultivado em todas as regiões do Brasil sob diferentes condições de clima e de cultivo. A produção brasileira é de cerca de 80 milhões de toneladas de grãos por ano, classificando o país como um dos maiores produtores mundiais e exportadores deste cereal (FAO, 2017). Devido à importância econômica desta cultura e adoção de tecnologias pelos produtores, a demanda por sementes de milho de alta qualidade aumentou, fazendo com que as empresas de sementes adotem muitas vezes padrões de qualidade mais restritos do que os estabelecidos somente pelo sistema de certificação (FANTAZZINI et al, 2016).

A semente é o principal insumo agrícola, uma vez que transporta para o campo todo o potencial genético da espécie, sendo necessário dentre outros fatores, elevado potencial fisiológico e ausência de patógenos. Sementes de milho são susceptíveis a diversos microrganismos prejudiciais, dos quais os fungos do gênero *Fusarium* são de grande relevância fitossanitária (TORRE-HERNÁNDEZ et al., 2014), uma vez que podem ser responsáveis por perdas consideráveis na produtividade e sanidade dos grãos. O fungo

Fusarium verticillioides (Sacc) Nirenberg possui destaque, devido ter ampla dispersão e distribuição geográfica, sendo

também a espécie de maior incidência em lavouras de milho e em outras culturas por todo o mundo (CAO et al., 2014; DEEPA et al., 2016). Este fungo também se destaca por possuir um rápido crescimento de micelios aéreos pálidos, coloridos e ramificados (MACIEL et al., 2012; FRIAS et al., 2014).

A semente representa uma das vias mais eficientes de transporte de fitopatógenos, e por consequência, a transmissão de doenças. Do ponto de vista sanitário, a semente ideal seria aquela livre de qualquer microrganismo indesejável. Porém, isso nem sempre é possível, uma vez que a sua qualidade é altamente influenciada pelas condições climáticas sob as quais são produzidas e armazenadas.

É sabido que *F. verticillioides* tem a capacidade de transmissão das sementes para as espigas de forma sistêmica (WILKE et al., 2007). Seu potencial de dano é extremamente alto e compromete a qualidade das sementes e grãos das plantas, também podendo produzir micotoxinas prejudiciais à saúde de animais e do homem.

Apesar de existirem estudos sobre a transmissão de *F. verticillioides* das sementes para as plantas, poucos abordaram a transmissão à campo das plantas para as sementes, por diferentes genótipos e métodos de inoculação.

A inoculação pode representar a certeza de que todas as plantas do genótipo, receberam num mesmo tempo, a mesma quantidade de suspensão do patógeno, e através do método de inoculação controlado, é possível selecionar genótipos resistentes e indicar a melhor forma de manejo das doenças. Com isso, este trabalho teve por objetivo realizar um levantamento da população de *F. verticillioides* através de análise sanitária e transmissão do fungo à campo das plantas para as sementes e das sementes para as plântulas inoculados com diferentes métodos de inoculação.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento do patógeno, produção do inóculo e Postulados de Koch:

Para o isolamento do patógeno, sementes sintomáticas de milho, foram colhidas e levadas ao laboratório para análise da presença de *F. verticillioides*. As sementes, sem assepsia, foram colocadas em placas de petri, contendo meio BDA. Em seguida, procedeu-se a repicagem do fungo para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (200g batata, 20g de dextrose, 20g de ágar e 1000 ml de água destilada). Os isolados foram identificados com base em sua

morfologia típica, que se caracterizou pela presença de longas cadeias de microconídios produzidos em monofíalides (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Na purificação das colônias dos isolados, foi utilizada a técnica da cultura monospórica (FERNANDEZ, 1993), em que uma suspensão de conídios do fungo foi colocada em 5 mL de água destilada e esterilizada, em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar (AA: 20g de ágar e 1000mL de água destilada). Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a observação dos conídios germinados, em microscópio ótico. Os conídios que germinaram, isoladamente foram repicados para tubos de ensaio e placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para posteriores trabalhos de inoculações. Os Postulados de Koch foram feitos com inoculações da suspensão do fungo contendo 5×10^5 conídios.mL⁻¹ em plantas saudias do híbrido 32R48YH. As inoculações foram realizadas tanto em plantas jovens, com 20 dias após a emergência, como também na fase reprodutiva de duas formas, uma nos estilo-estigmas e a outra no centro da espiga, quando as plantas estavam em estágio fenológico R1. Após a inoculação nas plântulas ficaram em câmara úmida por 48 h, e em seguida os tecidos da folha e caule foram cortados e após assepsia foram plaqueados em meio de cultura BDA. Para a inoculação na fase R1, decorridos 25 dias da inoculação, todas as espigas foram colhidas para a degrana e as sementes incubadas em Placas de petri com meio BDA. Posteriormente, após 5 dias de incubação, foi efetuada a identificação do patógeno presente nos grãos.

Identificação molecular do isolado e amplificação do DNA por PCR:

O DNA de *F. verticillioides* foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Para a amplificação do DNA por PCR, os pares de primers usados na reação foram os iniciadores VER-1 (5'-CTT CCT GCG ATG TTT CTCC-3') e VER-2 (5'-AAT TGG CCA TTG GTA TTA TAT ATCTA-3') para amplificar o gene específico calmodulina de isolados de *F. verticillioides*.

Isolados da mesma amostra submetida a análise de PCR foram enviados para o Laboratório Agrônomo, credenciado pelo Ministério da Agricultura para uma segunda análise de PCR e sequenciamento para confirmação.

Delineamento experimental em campo:

O experimento foi conduzido na safra agrícola de 2015/2016, em lavoura experimental de milho, localizado no município de Toledo, no Paraná. O delineamento experimental foi em

Blocos Casualizados, em esquema fatorial de 10x3, com quatro repetições, sendo 10 híbridos de milho tratados com Metalaxil-M (10g/L) e Fludioxonil (25g/L) e três métodos de inoculação. O período de instalação e condução do experimento foi de 19 de fevereiro a 25 de julho de 2016, no município de Toledo, no estado do Paraná. Os dez híbridos de milho utilizados, foram: P30K75Y, P32R48YH, P3250, P3340YHR, P3630H, P4285H, DKB240PRO2, DKB390PRO2, DKB310PRO2 e DOW30A37PW.

Em condições de campo, cada unidade experimental (parcela) foi composta por 2 linhas de 4,5 metros e 30 plantas por cada linha. Nos tratamentos com inoculação todas as plantas das linhas foram avaliadas, exceto as duas primeiras e duas últimas plantas. Em ambos os métodos artificiais, realizou-se a inoculação de 2 mL da suspensão por espiga quando as plantas estavam em estágio fenológico R1 (florescimento e polinização), período de maior susceptibilidade a infecção (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). Parcelas de igual tamanho foram destinadas à testemunhas (infecção natural).

Preparo do inóculo e estágio de inoculação:

Para inoculação de *F. verticillioides* nas espigas, uma suspensão desse fungo foi obtida a partir do seu cultivo em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar). Para cada local, utilizaram-se isolados da espécie de sua própria região. Os micélios do fungo, em meio de cultura com idade de 15 dias, foram triturados em liquidificador, posteriormente, esse triturado foi peneirado para a remoção das partículas grosseiras do meio de cultura. Então, calibrou-se a suspensão do inóculo com auxílio de um hematocítômetro, com uma concentração ajustada para 5×10^5 conídios.mL⁻¹.

Em ambos os métodos de inoculação artificial, realizou-se a inoculação de 2mL desta suspensão por espiga, quando as plantas estavam em estágio fenológico R1, caracterizado como "florescimento e polinização", com os estilo-estigmas começando a escurecer, aproximadamente entre o sétimo e o décimo dia após o início do florescimento, período de maior susceptibilidade a infecção (MUNKVOLD et al, 1997). Nenhum tipo de fungicida foi aplicado nos experimentos.

Descrição dos métodos de inoculação:

Método injetável da suspensão de conídios no centro da espiga: Realizou-se a inoculação da suspensão de conídio de *F. verticillioides* com o auxílio de uma seringa dosadora com

alimentação automática, o qual o inóculo foi injetado no centro da espiga. O método injetável simula a infecção das espigas de milho pelo fungo a partir de danos físicos ocasionados nas espigas, em sua maioria, causados por insetos.

Método por aspersão da suspensão de conídios no estilo estilo-estigma: A inoculação da suspensão de conídio de *F. verticillioides* foi realizada com o auxílio de um borrifador de água devidamente esterilizado, o qual o inóculo foi depositado sob os estilo-estigmas da espiga na forma de aspersão (borrifado). O método de aspersão na forma de spray simula a disseminação natural dos esporos que chegam até os estigmas das espigas.

Método natural: Infecção realizada naturalmente, onde não houve nenhum tipo de inoculação artificial (testemunha).

Após as inoculações, um pacote de papel foi utilizado para cobrir a espiga com o objetivo de proporcionar um melhor ambiente para o desenvolvimento do patógeno, bem como, servindo de barreiramento para evitar interferência de outras parcelas.

Estrutura para gerenciar microclima no ambiente:

No local do experimento, realizou-se a implantação de uma mini-estação meteorológica capaz de registrar as variáveis climáticas e proporcionar um microclima favorável ao desenvolvimento da doença nas espigas, sendo a sua instalação iniciada a partir da inoculação, indo do florescimento até a colheita. Esta estrutura foi composta por uma bomba elétrica acoplada a um sistema de irrigação conectada a micro aspersores de nebulização. Um “timer” controlou o acionamento de todo o sistema. A programação da nebulização nas plantas foi a mesma em todos os locais dos experimentos, sendo um total de doze por dia, com duração de 5 minutos cada, iniciando-se às 8:00 h até às 20:00h.

Colheita das espigas e Avaliação do experimento:

Quando os genótipos estavam na fase fenológica R6, caracterizada como "maturação fisiológica", iniciou-se o monitoramento da umidade dos grãos até atingir o nível de 17%. Em seguida, foi colhido um total de 150 espigas, sendo coletadas 50 espigas por cada tratamento de inoculação. Posteriormente, as espigas foram dispostas no secador automatizado para que os grãos atingissem umidade de 12-14%, para em seguida, proceder-se a debulha. Antes da

debulha, as espigas foram dispostas uma ao lado da outra para a avaliação de severidade da doença.

Utilização de PCR para detecção de *Fusarium verticillioides* em amostras de sementes com diferentes incidências fúngicas:

Diferentes níveis de infecção fúngica foram formulados, obtidas a partir da inoculação artificial com cinco concentrações diferentes do fungo, sendo estas com uma variação de 100, 20, 10, 2, e 1% de incidência de *F. verticillioides* nas sementes, além de um controle negativo, usando sementes livres sadias com 0% de incidência.

As amostras de sementes sadias, e as amostras de sementes com diferentes níveis de infecção, foram trituradas em um moinho refrigerado até se obter um pó bem fino. Aproximadamente 1g de cada amostra foi pulverizado com auxílio de nitrogênio líquido e submetido a extração do DNA fúngico, para posterior análise molecular pela técnica de PCR. Tanto o procedimento de extração, quanto à amplificação foram conduzidos sobre as mesmas condições aplicadas durante a extração e amplificação do DNA dos isolados, descritos anteriormente na Seção 2.2.

Transmissão planta-semente de *Fusarium verticillioides* em diferentes genótipos e métodos de inoculação:

Os experimentos tiveram o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 10 (genótipos de milho) x 3 (métodos de inoculação) e quatro repetições. Utilizou-se as sementes provenientes dos híbridos que foram inoculados pelos três métodos de inoculação (natural, spray e injetável). Os híbridos utilizados foram: P30K75Y, P32R48YH, P3250, P3340YHR, P3630H, P4285H, DKB240PRO2, DKB390PRO2, DKB310PRO2, DOW30A37PW.

O levantamento da população fúngica associada às sementes de milho, provenientes das plantas inoculados com *F. verticillioides*, foi realizado por meio do método do papel de filtro ou *blotter test* (BRASIL, 2009). Para isso, utilizou-se caixa acrílica tipo *gerbox*, desinfestada com álcool 70%, contendo em seu interior duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com 50 mL de água destilada estéril.

Cada repetição consistiu de um *Gerbox* contendo 25 sementes. As sementes provenientes de cada lote foram submetidas à assepsia. As desinfestações foram realizadas emergindo-se as sementes em uma sequência de solução de álcool 50%, por 30 segundos,

hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos e posteriormente, duas sequências de lavagens em água destilada esterilizada.

As sementes foram dispostas individualmente e, posteriormente, acondicionadas em uma sala de incubação, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 24 horas. Em seguida, foram colocadas em congelador (-20°C) por 24 horas para inibir por completo o processo de germinação das sementes. Posteriormente, os *gerboxes* foram colocados novamente em câmara de incubação por cinco dias com fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram até a avaliação. A análise sanitária das sementes foi feita individualmente em cada *gerbox*, com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico. Para identificação dos fungos lâminas foram preparadas e visualizadas em microscópio ótico, anotando-se a incidência (%) de todos os gêneros encontrados. Foram utilizadas na identificação literaturas especializadas como Barnett e Hunter (1998) e Watanabe (2010). Os fungos foram isolados e cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

Teste de emergência e transmissão de *Fusarium verticillioides* das sementes para as plântulas, em diferentes órgãos de plantas de milho:

O ensaio foi realizado em local isolado e distante de lavouras comerciais. Para cada tratamento foram semeadas 200 sementes não desinfestadas, divididas em quatro repetições de 50 sementes cada, em delineamento inteiramente casualizado. A semeadura foi realizada em bandejas de 10 cm de largura por 30 cm de comprimento, contendo areia estéril. Foi mantida diariamente a umidade do substrato por meio de irrigação manual. Aos sete dias após a semeadura, foi avaliada a emergência de plântulas.

Ao final de 35 dias da semeadura foram coletadas 30 plantas, sendo dez plantas de cada tratamento. As plantas foram coletadas separadamente, depois realizou-se processo de assepsia com desinfestação em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 40 segundos e tríplice lavagem em água destilada estéril. Após desinfestação foram separados os órgãos das plantas: raiz, caule e folhas. Foram acondicionadas em placas contendo meio de cultura BDA devidamente identificadas, posteriormente levadas para sala de incubação, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante cinco dias.

Ao final do período de incubação realizou-se a avaliação para constatação da presença de *F. verticillioides* nos diferentes órgãos das plantas, com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico.

Análises estatística:

Após a realização da análise de variância, o agrupamento das médias foi feita pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2014).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises de variância:

Para a emergência plântulas de plântulas provenientes de genótipos de milho inoculados com *Fusarium verticillioides* inoculados por diferentes métodos em plantas de milho em estágio reprodutivo R1 (florescimento e pendramento) em função do genótipo, nota-se que houve significância ($P \leq 0,05$) para as variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 01: Análise de variância conjunta para emergência de plântulas provenientes de genótipos de milho inoculados com *Fusarium verticillioides* utilizando três diferentes métodos de inoculação.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
INOCULAC	2	51,8000	25,9000	5,37	0,0063*
GENOTIPO	9	303,4667	33,7185	6,99	0,0000*
INOCULAC*GENOTIPO	18	511,5333	28,4185	5,89	0,0000*
erro	90	434,0000	4,8222		
Média: 2,2800			CV: 96,4		

* $P \leq 0,05$

Identificação molecular do isolado:

Baseado na identificação molecular realizada (figura 01), o isolado trata-se de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (1976). A amostra resultou em 658 e 986 nucleotídeos para região EF e RPB2, respectivamente. Esta sequência apresentou 99% de identidade com *Fusarium verticillioides* (Accession nº FN179338.1) e (Accession nº FN552106.1), respectivamente, cobrindo 99,9% da sequência (Query cover), de acordo com consulta ao Blast (NCBI), Icl/Query_25443 e Icl/Query_10149, conforme laudo de sanidade vegetal 3162/2017- AGR.

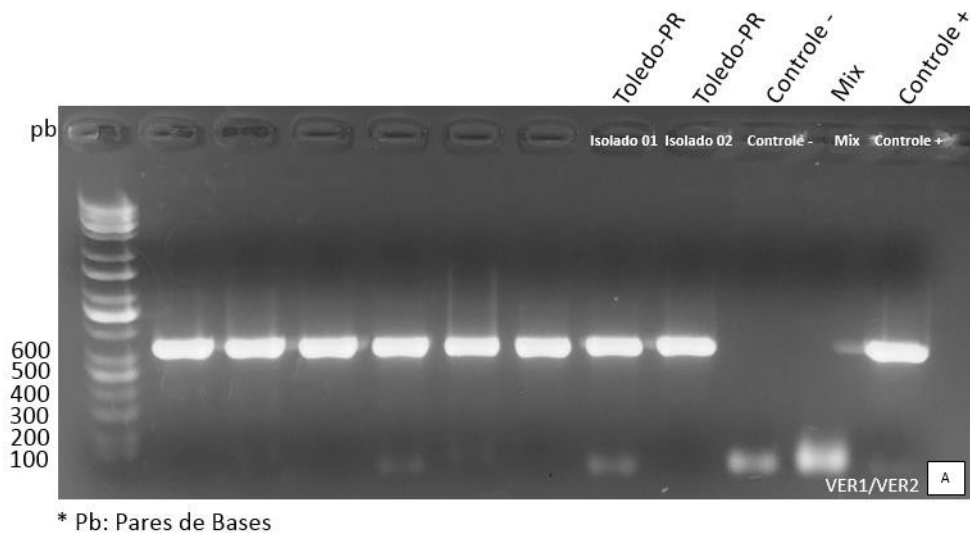


Figura 01: A) Peso molecular de amostras de isolados fúngicos obtidos de milho (A), sendo: isolados 01 e 02: procedentes de Toledo-PR; Controle negativo (Controle -): Folha de milho sadia; Mix: Controle relativo, sem adição de DNA; Controle positivo (Controle +): Isolado de *Fusarium verticillioides*. B) Estruturas morfológicas de *Fusarium verticillioides* produzidas em monofiáides. C) Conidióforos com microconídios em cadeia. Fotos: Oelton R. Jr.

Sensibilidade da técnica de PCR na detecção de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho com diferentes níveis de infecção:

Com a metodologia adotada, a técnica de PCR foi capaz de revelar até o menor nível de incidência de *F. verticillioides* produzida, sendo capaz de detectar em até 1% de infecção em sementes de milho, dentre o DNA extraído (Figura 2), os primers foram sensíveis ao ponto de revelar quantidades mínimas do material genético do patógeno.

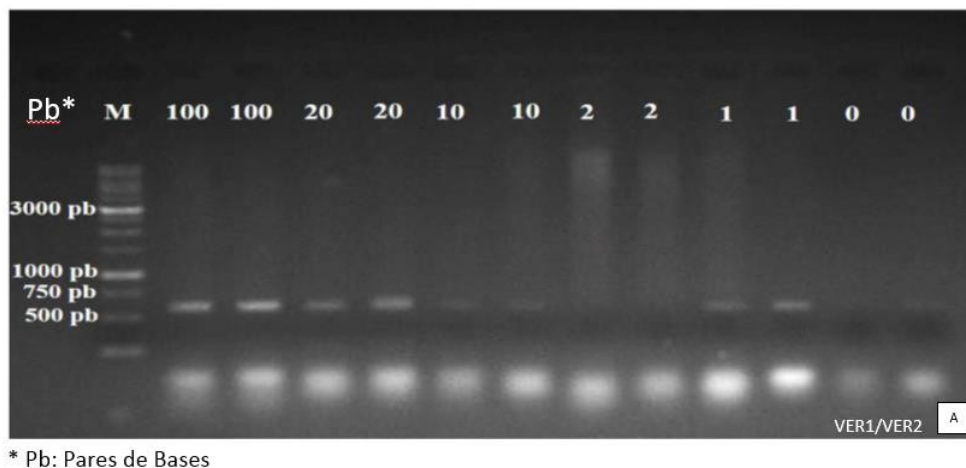


Figura 02: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da região VER-1 e VER-2 do produto da extração de DNA de sementes de milho com diferentes incidências de *F. verticillioides* presentes nas sementes nas respectivas percentagens de 100%, 20%, 10%, 2%, 1% e 0%. Marcador (M) 1 kb (KASVI).

Resultados semelhantes foram encontrados por Barrocas et al. (2012), ao utilizarem a técnica de PCR na detecção de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho artificialmente infectadas, onde obteve uma sensibilidade de até 2% de incidência fúngica nas sementes utilizando primers específicos. Segundo Magculia e Cumagun (2011), o uso de primers específicos para detecção de *F. verticillioides* aplicada à técnica de PCR, sempre foi uma excelente ferramenta para a classificação morfológica quando usado para sua identificação em grãos armazenados de arroz e milho.

Transmissão planta-semente de *Fusarium verticillioides* em diferentes genótipos e métodos de inoculação:

Como é possível observar na Tabela 01, os híbridos inoculados de forma natural apresentaram menor incidência de *F. verticillioides* (21,2%) em relação aos demais métodos de inoculação estudados, na forma injetável (39,2%) e spray (50,9%). Corroborando com esses resultados, MENDES et al. (2011), realizou a inoculação de uma suspensão de conídios de *F. verticillioides* por aspersão nos estilo-estigmas de cada planta e também de forma injetada no centro da espiga com o auxílio de uma seringa. As espigas de cada tratamento foram colhidas e submetidas ao teste de sanidade, sendo que as que foram inoculados pelo método de aspersão, via estilo-estigma, apresentaram maior incidência do fungo.

Tabela 1. Transmissão planta-semente, avaliada pela Incidência (%) de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho em função do genótipo e do método de inoculação em Toledo, estado do Paraná.

Híbridos	Natural	Injetável	Spray	Média
30K75Y	27 bC	45 bB	59 aA	43,7
32R48YH	43 aA	50 aA	52 aA	48,3
DKB240PRO2	18 cB	53 aA	52 aA	41
DKB390PRO2	26 bC	44 bB	59 aA	43
DOW30A37PW	11 cC	42 bB	56 aA	36,3
DKB310PRO2	15 cC	35 bB	47 bA	32,3
P3250	16 cB	44 bA	41 bA	33,7
P3340YHR	21 cB	51 aA	47 bA	39,7
P3630H	14 cB	12 cB	56 aA	27,3
P4285H	21 cB	16 cB	40 bA	25,7
Média	21,2	39,2	50,9	37,1

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro.

Foi evidenciado na inoculação de *F. verticillioides* através do método natural, que o híbrido 32R48YH apresentou a maior incidência do fungo (43%), enquanto que, na inoculação do fungo através do método injetável, os híbridos que apresentaram incidência acima de 50% foram DKB240PRO2, P3340YHR e 32R48. Na inoculação realizada pelo método de spray, verificou-se que seis dos dez híbridos apresentaram incidência igual ou acima de 52%, (30K75Y, 32R48YH, DKB240PRO2, DKB390PRO2, DOW30A37PW e P3630H), enquanto os demais híbridos testados não diferiram estatisticamente.

Para os três métodos de inoculação realizados (natural, spray e injetado), o híbrido 32R48YH apresentou as maiores incidências do fungo, enquanto que DKB240PRO2 apresentou a maior incidência apenas nos métodos de inoculação injetável e Spray. Por outro lado, o híbrido P3630H apresentou a menor incidência do fungo nas sementes nos métodos de inoculação Natural e Injetável. Já o híbrido P4285H apresentou a menor incidência nos três métodos de inoculação. As cultivares de milho apresentam características e diferenças com relação à resistência aos fungos que causam podridão de espigas. Estas diferenças podem estar relacionadas com algumas características anatômicas ou morfológicas das espigas, como p.ex. o nível de empalhamento e o ângulo de decumbência da espiga. Costa et al. (2011) observaram elevada variabilidade quanto à reação dos genótipos de milho à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. A resistência genética e as condições ambientais interferem diretamente na ocorrência de grãos ardidos em milho (COSTA et al., 2010a).

Verificou-se que a porcentagem da incidência nos grãos com *F. verticillioides* oriundos de plantas inoculadas com spray foi maior em praticamente todos os híbridos (Figura 2) quando se comparou com os grãos dos híbridos inoculados pelo método injetável e pelo método natural. Esses resultados demonstram que a inoculação por spray foi o método que mais potencializou a incidência do fungo em sementes de milho, evidenciando ser a forma mais eficaz de inoculação. Os grãos dos híbridos inoculados na forma injetável apresentaram maior incidência do patógeno do que a testemunha, porém os híbridos P3630H e P4285H não apresentaram esta mesma tendência. Os autores CHUNGU et al. (1996), REID et al. (1996) e SCHAAF SMA et al. (1993). REID et al. (1992a) verificaram que o método de inoculação depositando o inóculo no estilo-estigma foi eficiente, permitindo diferenciar genótipos resistentes de suscetíveis.

Teste de patogenicidade:

A partir da inoculação nas folhas da suspensão de conídios de *F. verticillioides* pode-se verificar sintomas leves e quase imperceptíveis de descoloração no caule e minúsculos pontos de coloração avermelhada no colmo das plantas próximas à bainha das folhas mais jovens. A partir dos tecidos de folhas e caules das plântulas de milho previamente inoculadas com *F. verticillioides*, observou-se crescimento de micélio do fungo no meio BDA, comprovando-se, desta forma, a presença do patógeno em todas as partes da planta, mesmo nos tecidos sem sintomas aparentes. Este fato pode estar relacionado ao fungo possuir inicialmente, modo de infecção latente ou quiescente, ou seja, mesmo estando presente internamente na planta, pode se expressar apenas na fase reprodutiva.

Segundo Pereira et al. (2005), em plantas atacadas por *F. verticillioides* pode-se observar crescimento cotonoso de coloração branca, constituído de micélio e conídios. McGee (1990), e segundo Chen et al., (2012), às medidas químicas e agronômicas para o controle de *F. verticillioides* não são muito eficazes, pois a espécie por ser endofítica, coloniza as plantas sem demonstrar qualquer sintoma externo demonstrando a infecção da planta (CHEN et al., 2012).

Teste de emergência e transmissão de *Fusarium verticillioides* das sementes para as plântulas, em diferentes órgãos de plantas de milho:

Apesar de não ter sido observado sintomas típicos nas plântulas de milho, houve transmissibilidade de *F. verticillioides* das sementes para as plântulas, porém, não demonstraram nenhum sintoma da doença, pois a avaliação foi feita apenas na fase vegetativa das plantas. A transmissibilidade foi comprovada por meio das análises dos tecidos em BDA, onde o fungo cresceu nas placas e também por meio das análises de DNA com primer específico (VER-1 e VER-2), onde se comprovou a presença de *F. verticillioides* nos tecidos avaliados. Em relação aos fungos do gênero *Fusarium* sp. é sabido que este patógeno causa doenças diversas como podridão radicular, morte de plântulas, podridão de espiga e do colmo, podendo levar a reduções na produtividade e qualidade de grãos (Munkvold, 2003). Reid et al. (1999) consideram *Fusarium* sp. como um fungo endofítico e onipresente na cultura, contudo, nem sempre patogênico.

Pode-se observar que os métodos de inoculação do fungo *F. verticillioides* pouco interferiram na emergência das plântulas de milho, pois a maioria dos genótipos apresentaram

porcentagem média de emergência semelhantes (Tabela 2), segundo o teste de agrupamento Scott Knott a 5% de probabilidade de erro. Isso pode ser explicado pelo fato do fungo atuar como um microrganismo de infecção latente e cujos sintomas se expressam apenas na fase reprodutiva, ocasionando maiores perdas nas espigas nesta fase.

Tabela 2: Emergência de plântulas provenientes de genótipos de milho inoculados com *Fusarium verticillioides* utilizando três diferentes métodos de inoculação.

Híbridos	Natural	Injetável	Spray	Média
DKPDB390PRO2	100,0 a	99,5 a	97,5 a	99
MFRDKB310PRO2	99,5 a	96,5 a	96,5 a	98
DOW30A37PW	99,5 a	96,0 a	92,0 b	96
P4285H	99,0 a	98,0 a	92,0 b	96
DKPDB240PRO2	97,0 a	99,0 a	99,0 a	98
30K75Y	97,0 a	93,0 b	92,0 b	94
P3630H	96,5 a	96,5 a	99,5 a	98
P3250	96,5 a	91,5 b	98,0 a	95
32R48YH	95,0 a	92,0 b	95,5 a	94
P3340YHR	93,0 b	95,5 a	99,5 a	96
Média	97,3	95,8	96,2	96,4

Média seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott- Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Foi observado que os híbridos P3250, 32R48YH e 30K75Y apresentaram menor porcentagem de emergência quando a inoculação foi realizada pelo método injetável, enquanto que para o método de inoculação por spray, os híbridos que apresentaram menor porcentagem de emergência foram P4285H, 30K75Y e DOW30A37PW. Os híbridos inoculados pelo método natural, apenas P3340YHR apresentou diferente dos demais, com a menor porcentagem de emergência. Verificou-se que cada híbrido pode responder de forma diferente a cada modelo de inoculação do patógeno. Acredita-se que vários fatores podem influenciar na infecção, tais como formas de empalhamento da espiga e sua espessura, espaçamento entre as fileiras dos grãos, espessura do pericarpo, ou ativação de mecanismos bioquímicos de defesa da planta.

Casa et al. (2006) relatam que quanto maior for a incidência do fungo na semente, maior será a eficiência da transmissão. Segundo Glenn et al. (2008) e Yates et al. (2003), quando se utiliza a inoculação de uma suspensão de esporos de *F. verticillioides* aplicada diretamente na folha de milho, observou-se sintoma de redução de crescimento, e quando se utiliza a embebição prévia da semente em suspensão de conídios, observou a morte de plântulas.

Na Figura 3, pode-se observar que os dois métodos de inoculação artificial nas espigas proporcionaram a mesma percentagem de sementes não germinadas. A inoculação por aspersão pode ser comparada com a disseminação do patógeno por fatores climáticos, como por exemplo, água e vento que são as formas de dispersão dos conídios do fungo mais comuns no campo e retratam uma forma menos invasiva de realizar a inoculação, como é a forma injetável.

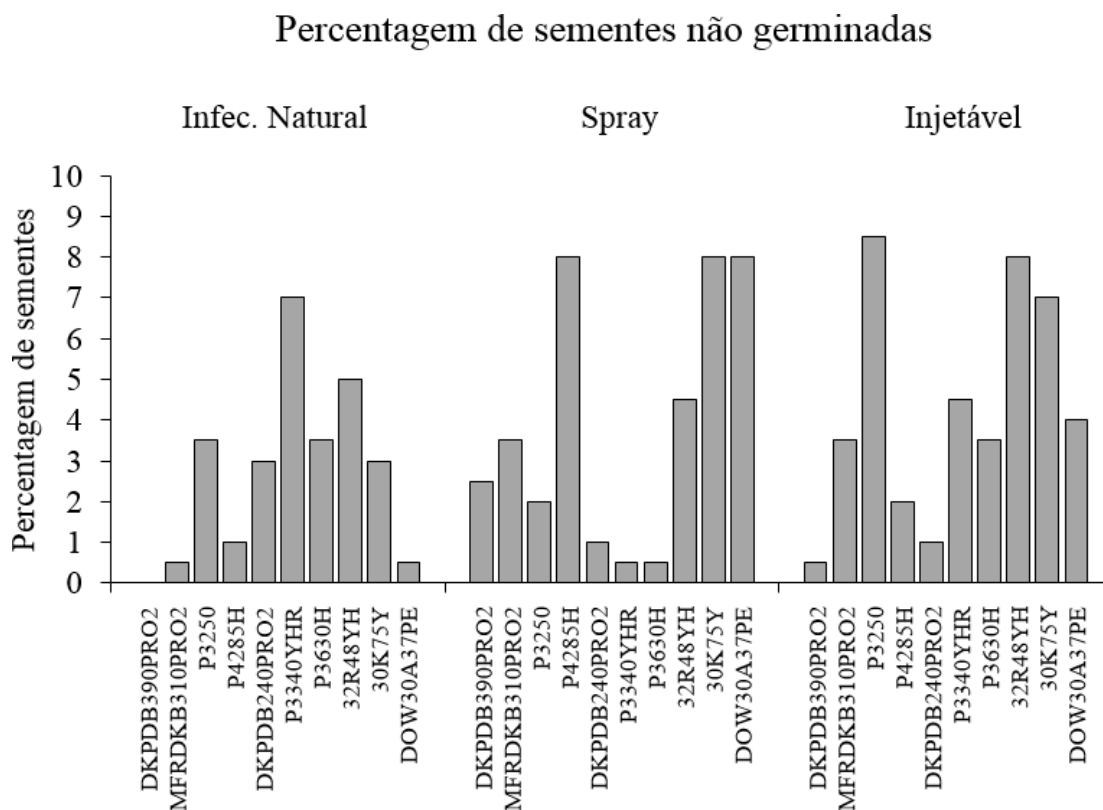


Figura 3: Percentagem de sementes de milho não germinadas procedentes de espigas inoculadas por *Fusarium verticillioides* através do método natural, spray e injetável.

No tratamento testemunha, onde houve inoculação natural do fungo, ocorreu menor número de sementes não germinadas, apresentando-se híbrido, como o DKPDB390PRO2, com 100% de germinação e emergência (Figura 3). Em um estudo semelhante realizado por Kuhnem-Júnior et al., (2013), trabalhando com isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *F. verticillioides* em sementes e plântulas de milho, observaram resultados diferentes dos encontrados neste trabalho, pois o mesmo verificou que nas sementes inoculadas com *F. verticillioides* houve uma redução na germinação em 69, 57%. Porém, Munkvold e O'Mara (2002), relataram que *Fusarium* spp. não afeta necessariamente a germinação das sementes, mas pode causar deterioração e compromete o desenvolvimento radicular da plântula.

No presente trabalho, a menor porcentagem de emergência foi de 92%, indicando que, mesmo o fungo estando presente nas sementes, não conseguiu influenciar na germinação e emergência das plântulas. Foi possível verificar que nas sementes inoculadas de forma artificial, houve uma leve diminuição na emergência, associada a uma maior quantidade de sementes não-germinadas, comparando-se com o método de inoculação natural. Pode ser observado também que em 100% das sementes não germinadas, de todos os tratamentos, tiveram presença de *F. verticillioides*.

3.6 CONCLUSÃO

As sementes oriundas de espigas inoculadas com spray apresentaram maior grau de incidência do patógeno, sendo este, o método mais eficiente de inoculação artificial de *F. verticillioides* na fase R1 para a avaliação de emergência de sementes.

Os híbridos 32R48YH e o DKB240PRO2 tiveram o maior nível de infecção por *F. verticillioides* pois obtiveram a maior incidência do fungo. Enquanto que os híbridos P3630H e P4285H demonstraram ser os mais resistentes, pois obtiveram as menores incidência do patógeno.

Os híbridos P3250, 32R48YH e 30K75Y apresentaram menor porcentagem de emergência quando a inoculação foi realizada pelo método injetável enquanto que os híbridos P4285H, 30K75Y e DOW30A37PW apresentaram menor porcentagem de emergência quando a inoculação foi realizada pelo método spray. O híbrido P3340 apresentou a menor porcentagem de emergência quando foi naturalmente inoculado.

A transmissão da semente para a planta foi confirmada pela análise molecular, apesar das plantas não terem apresentado sintomas visíveis, pode-se afirmar que houve infecção latente.

A técnica de PCR foi capaz de revelar a presença do patógeno nas sementes de milho em menor nível de incidência avaliado (1%).

3.7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BARNETT, H.; HUNTER, B. **Illustrated genera of fungi imperfect.** 4 ed., 1998, 218 p.

BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. da C.; ALMEIDA, M. F. de.; BOTELHO, L. S.; VON PINHO, É. V. de R. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 218-224, 2012.

BARROS, F. C.; JULIATTI, F. C. Levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de 2001-2008. *Bioscience Journal*, v.28, n.1, p.77-78, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 399p.

CAO, A.; SANTIAGO, R.; RAMOS, A. J.; SOUTO, X. C.; AGUÍN, O.; MALVAR, R. A. BUTRÓN, A. Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. *International Journal of Food Microbiology*, v. 177, p. 63-71, 2014.

CASA, R.T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. *Fitopatologia brasileira*, v. 31, n. 5, p. 427-439, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000500001>

CHEN, Y.; HUANG, T. T.; CHEN, C. J.; HOU, Y. P.; ZHANG, A. F.; WANG, W. X.; GAO, T. C.; ZHOU, M. G. Sensitivity of *Fusarium verticillioides* isolates from rice to a novel cyanoacrylate fungicide. *Crop Protection*, v. 39, p. 106-109, 2012.

CHUNGU C.; MATHER D. E.; REID L. M.; HAMILTON R. I. Comparison of techniques for inoculating maize silk, kernel, and cob tissues with *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 80, p. 81-84, 1996.

COSTA R. V.; COTA, L. V.; CRUZ, J. C.; SILVA, D. D.; QUEIROZ, V. A. V. de; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M. Recomendações para a redução da incidência de grãos ardidos em milho. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 38, Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, 22p., dez 2011.

COSTA R. V.; COTA, L. V.; ROCHA, L. M. P da; NOLASCO, A. A. R.; SILVA, D. D.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. Recomendação de Cultivares de Milho para a Resistência a grãos ardidos. *Circular Técnica* 154, Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, 8p., set. 2010a.

DEEPA, N.; NAGARAJA, H.; SREENIVASA, M. Y. Prevalence of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* associated with cereals grown in Karnataka (India). *Food Science and Human Wellness*, v. 5, p. 156–162, 2016.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.

FANTAZZINI, T. B.; GUIMARÃES, R. M.; CLEMENTE, A. da C. S.; CARVALHO, E. R.; MACHADO, J. da C.: *Fusarium verticillioides* INOCULUM POTENTIAL AND ITS RELATION WITH THE PHYSIOLOGICAL STORED CORN SEEDS QUALITY. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 32, n. 5, p. 1254-1262, Sept./Oct. 2016. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v32n5a2016-33056>

FAO. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em 03 nov. 2017.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciências e agrotecnologia**. v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FRIAS, A. G. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* e f.sp. lactucae obtidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface. Dissertação (Mestrado em Agronomia), **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Botucatu, São Paulo. p. 56, 2014.

GLENN, A. E.; ZITOMER, N. C.; ZIMERI, A. M.; WILLIAMS, L. D.; RILLEY, R. T. & PROCTOR, R. H. Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 21, n.1, p. 87-97, 2008.

KUHNEM-JÚNIOR, P. R.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v43n4/a11113cr2012-0864.pdf>

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. 1. ed. USA: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associados a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. Dissertação (Mestrando em Engenharia Florestal), Universidade de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. p. 94. 2012.

MAGCULIA, N.; CUMAGUN, C. J. R. Genetic diversity and PCR based identification of fumonisin producing isolates of *Fusarium verticillioides* in corn. **Tropical Plant Pathology**. v. 36, p. 225-232, 2011.

McGEE, D. C. **Maize diseases**. 2 ed. Minnesota: Apps Press, p. 150, 1990.

MENDES, M. C.; PINHO, R. G. V.; MACHADO, J. DA C., ALBUQUERQUE, C. J. B.; FALQUETE, J. C. F. Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos fungos causadores de podridões de espiga. **Ciência agrotecnologia**. v. 35, n. 5, p. 931-939, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000500010>

MUNKVOLD, G. P.; O'MARA, J. K. **Laboratório e avaliação da câmara de crescimento dos tratamentos fungicidas de sementes para a semente de milho provocada por espécies de *Fusarium***. Doença das plantas v. 86, p. 143-150, 2002.

MUNKVOLD, G.P. Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 705-713, 2003.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.

PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 477-488, 2005.

REID, L. M.; BOLTON, A. T.; HAMILTON, R. I.; WOLDEMARIAN, T.; MATHER, D. E. Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 14, p. 293-298, 1992a.

REID, L. M., HAMILTON, R. I., MATHER, D. E. Screening maize for resistance to gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON. **Technical Bulletin** 1996-5E. 1996.

REID, L. M.; NICOL, R. W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J. D.; YOUNG, J.C.; ATEWART, D. W.; SCHAAFSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 1028-1037, 1999.

SCHAAFSMA, A. W.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E.; EWING, R. J. Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid, and species of *Fusarium*. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 15, p. 185-192, 1993.

TORRE-HERNÁNDEZ, M. E. DE et al. Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. TIP Revista Especializada en **Ciencias Químico-Biológicas**, v. 17, n. 1, p. 77-91, 2014.

WILKE, A.L.; BRONSON, C. R. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v. 91, p. 1109-1115, 2007.

YATES, I. E.; ARNOLD J. W.; HINTON D. M.; BASINGER W.; WALCOTT, R. R. *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control. **Canadian Journal of Botany**, v. 81, p. 422-428, 2003.

Capítulo 4:

ESTUDO TOXICOLÓGICO E PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM FARELO DE MILHO CONTAMINADO COM FUMONISINA

4.1 RESUMO

Fumonisina é uma micotoxina produzida pelo fungo *Fusarium verticillioides* durante as principais etapas de produção e processamento da cultura do milho, podendo ser influenciada pelo clima da região produtora, cultivar e nível de infecção na espiga. Rações à base de grãos de milho podem apresentar risco de contaminação com *F. verticillioides*. Assim, durante a produção de aves, a alimentação com ração de milho contaminados pode provocar intoxicação alimentar, causando hiperplasia biliar, necrose multifocal hepática e muscular resultando em prejuízos à toda cadeia produtora de carnes e derivados avícolas, e principalmente, aos seres humanos. O presente trabalho teve por objetivo fazer o estudo toxicológico e parâmetros zootécnicos de frangos de corte alimentados com farelo de milho contaminado com fumonisina. Visando estabelecer níveis seguros de fumonisina, na safra de 2015/2016, foram instalados experimentos com híbridos comerciais de milho inoculados com *F. verticillioides*. Posteriormente, aves foram alimentadas com ração comercial e com ração contaminada com ração. Avaliou-se a concentração de fumonisina, parâmetros zootécnicos e alterações histológicas em fragmentos de fígado, coração e intestino delgado. Verificou-se que a concentração de 2,78µg/g de fumonisina determinada na ração das aves não provocou alterações nos parâmetros zootécnicos até o 21º dia de alimentação tampouco alterações histológicas. Assim as análises dos parâmetros zootécnicos e histopatológicos permitiram revelar concentrações mínimas e seguras de fumonisina que não provocaram danos toxicológicos em aves da linhagem COBB 500. Verificou-se que a concentração de 2,78µg/g de fumonisina determinada na ração não provocou alterações nos parâmetros zootécnicos (peso das aves e no consumo de ração) e histopatológico (tecidos do intestino, fígado e coração) de aves da linhagem COBB 500, alimentadas até o 21º dia. Este é um importante parâmetro que pode contribuir nas etapas de produção de carnes e de produtos avícolas.

Palavras chave: *Fusarium verticillioides*, fumonisina, farelo de milho, intoxicação alimentar.

4.2 ABSTRACT

Fumonisin is a mycotoxin produced by the fungus *Fusarium verticillioides* during the main stages of production and processing of the maize crop, and can be influenced by the climate of the producing region, cultivar and level of infection in the ear. Corn grain rations may present a risk of contamination with *F. verticillioides*. Thus, during the production of poultry, feeding with contaminated corn rations can lead to food poisoning, causing biliary hyperplasia, multifocal hepatic and muscular necrosis resulting in damages to the whole chain of poultry meat and poultry derivatives, and especially to humans. The present work had as objective to make the toxicological study and zootechnical parameters of broilers fed corn meal contaminated with fumonisin. To establish safe levels of fumonisin, in the harvest of 2015/2016, experiments were performed with commercial corn hybrids inoculated with *F. verticillioides*. Afterwards, the broiler chicks were fed commercial ration and ration contaminated with *F. verticillioides*. The concentration of fumonisin, zootechnical parameters and histological alterations in liver, heart and small intestine fragments were evaluated. It was verified that the concentration of 2.78µg/g of fumonisina determined in the rations of the broiler

chicks did not cause alterations in the zootechnical parameters or histological changes until the 21st day of feeding. The analyzes of the zootechnical and histopathological parameters allowed to reveal minimum and safe concentrations of fumonisin that did not cause toxicological damages in broiler chicks of the COBB 500 lineage. It was verified that the concentration of fumonisina of 2,78µg/g determined in the diet did not alter the zootechnical (poultry weight and feed intake) and histopathological parameters (intestinal, liver and heart tissues) of broiler chicks of COBB 500, fed until the 21st day. This is an important parameter that can contribute to the production stages of meat and poultry products.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, fumonisin, corn meal, food poisoning.

4.3 INTRODUÇÃO

A fumonisina é um metabólico tóxico secundário produzida principalmente por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (teleomorfo *Giberella fujikuroi* Sawada) (RHEEDER et al., 2002), fungo predominante na cultura milho (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; THIEL et al., 1992). Essa espécie é capaz de produzir níveis elevados de fumonisinas, possui ampla distribuição geográfica e ocorrência frequente em grãos de milho (RHEDDER; MARASAS; VISMER, 2002). Mais de 28 diferentes tipos de fumonisinas já foram isolados, sendo a toxina predominante a fumonisina B1 (FB1), que também apresenta maior toxicidade. A FB1 tem sido associada com baixo desempenho, aumento do peso relativo de vísceras e hepatite tóxica em aves domésticas (KUBENA et al., 1995). LEDOUX et al. (1992) observaram diarreia, diminuição do consumo de alimentos e do ganho de peso, aumento do peso do fígado, necrose hepática e hiperplasia hepatocelular em frango de corte de diversas raças alimentado com ração contendo de 1,0 a 4,0µg/g de FB1.

Brown et al (1992) e Mallmann et al (2010), descreveram que o efeito da fumonisina na alimentação animal provoca redução de peso corporal, menor consumo de ração, congestão e aumento do fígado e diarreia. Em cortes histológicos em frangos de corte, verificou a presença de necrose multifocal hepática, hiperplasia biliar e necrose muscular. Vários trabalhos ao redor do mundo têm demonstrado que as fumonisinas têm associação, principalmente, com redução no desempenho, mas podem causar severa imunossupressão, afetando células e órgãos do sistema imune, mas pouco se sabe sobre a concentração necessária a ser ingerida desta micotoxina para que ocorra tais danos.

Estima-se que no Brasil cerca de 70% a 80% do milho produzido é dirigido à alimentação animal, tal como a indústria de rações, 51% são direcionados ao setor avícola, 33% à suinocultura, 11% à pecuária, especialmente a leiteira, e 5% para outros animais (NUNES et

al, 2016). Os produtos base das rações, como os grãos, podem apresentar alto risco de contaminação por micotoxinas nos diferentes estágios da produção, como na colheita, processamento e armazenamento dos mesmos. Dependendo do nível de contaminação dos grãos e do período de exposição das aves, as micotoxinas podem afetar seriamente a saúde e o seu desempenho, causando significativas perdas econômicas na indústria avícola.

Estudos são focados na nutrição animal, visando um menor custo de produção com maior eficiência. Contudo, a demanda mundial de carne de frango está em constante aumento, cenário que obriga os produtores a melhorar os parâmetros de genética, manejo sanitário e alimentar de seus lotes, buscando produzir proteína animal de qualidade no menor tempo possível e a baixo custo. Essa realidade não é diferente para os produtores brasileiros, pois o Brasil participa, ativamente, no mercado mundial de frangos de corte, sendo o maior exportador, levando a ocupar o segundo lugar, superando a China e ficando atrás apenas dos Estados Unidos, que possui produção de 13.546,5 milhões de toneladas (ABPA, 2016).

No Brasil, a contaminação fúngica dos alimentos é bastante frequente, uma vez que as condições climáticas propiciam o desenvolvimento dos fungos e a produção de micotoxina. É fundamental concentrar-se na prevenção de possíveis fatores que possam afetar o desempenho e a produção avícola, tornando importante o estudo da fumonisina na cadeia de produção de aves. Ainda, por ser uma micotoxina persistente ao longo da cadeia alimentar, é muito importante poder garantir que alimentos com micotoxina não sejam ingeridos pela população podendo causar câncer.

Assim, visando estabelecer níveis seguros de fumonisina, nós avaliamos lavouras experimentais da safra de 2015/2016, contendo cultura de milho híbridos comerciais inoculados com *F. verticillioides* com o objetivo de realizar estudos histopatológico e de parâmetros zootécnicos em aves da linhagem COBB 500.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento para a obtenção dos grãos de milho contaminado por fumonisina:

Para a obtenção de milho contendo fumonisina, um experimento foi conduzido na safra de 2015/2016, em lavouras experimentais de milho, localizado no município de Gurupi, no estado do Tocantins, o qual foi submetido a inoculação do fungo *Fusarium verticillioides*. O período de instalação deste experimento ocorreu de 20 de Fevereiro a 15 de Junho. O experimento foi composto por dez diferentes híbridos comerciais, sendo eles: P30K75Y,

P32R48YH, P3250, P3340YHR, P3630H, P4285H, DKB240PRO2, DKB390PRO2, DKB310PRO2 e DOW30A37PW.

Isolamento do patógeno, produção do inóculo e Postulados de Koch:

A produção de inóculo foi realizado pelo isolamento do patógeno, através de sementes sintomáticas de milho (grãos demonstrando descoloração, manchas brancas a escuras, grãos leves e ardidos, etc.), colhidas e levadas ao laboratório para análise da presença de *F. verticillioides*. As sementes, sem assepsia, foram colocadas em placas de petri, contendo meio BDA (200g batata, 20g de dextrose, 20g de ágar e 1000 ml de água destilada). Em seguida, procedeu-se a repicagem do fungo para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Os isolados foram identificados com base em sua morfologia típica, que se caracterizou pela presença de longas cadeias de microconídios produzidos em monofiálides (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Na purificação das colônias dos isolados, foi utilizada a técnica da cultura monospórica (FERNANDEZ, 1993), em que uma suspensão de conídios do fungo foi colocada em 5 mL de água destilada e esterilizada, em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar (AA: 20g de ágar e 1000mL de água destilada). Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a observação dos conídios germinados, em microscópio ótico. Os conídios que germinaram, isoladamente foram repicados para tubos de ensaio e placas de Petri contendo meio de cultura BDA, para posteriores trabalhos de inoculações. Os Postulados de Koch foram feitos com inoculações da suspensão do fungo contendo 5×10^5 conídios.mL⁻¹ em plantas de milho sadias do híbrido 32R48YH.

Identificação molecular do isolado e amplificação do DNA por PCR:

O DNA de *F. verticillioides* foi extraído, de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Para a amplificação do DNA por PCR, os pares de primers usados na reação foram os iniciadores VER-1 (5'-CTT CCT GCG ATG TTT CTCC-3') e VER-2 (5'-AAT TGG CCA TTG GTA TTA TAT ATCTA-3') para amplificar o gene específico calmodulina de isolados de *F. verticillioides*.

Isolados da mesma amostra submetida a análise de PCR foram enviados para o Laboratório Agrônômica, credenciado pelo Ministério da Agricultura para uma segunda análise de PCR e sequenciamento para confirmação.

Preparo do inóculo, estágio de inoculação e método de inoculação:

Para inoculação de *F. verticillioides* nas espigas, uma suspensão desse fungo foi obtida a partir do seu cultivo em meio de cultura com Batata + Dextrose + Ágar-ágar (BDA). Os micélios do fungo, em meio de cultura com idade de 15 dias, foram triturados em liquidificador. Posteriormente, esse triturado foi peneirado para a remoção das partículas grosseiras do meio de cultura. Então, calibrou-se a suspensão do inóculo com auxílio de um hemocitômetro, com uma concentração ajustada para 5×10^5 conídios/mL.

Realizou-se a inoculação de 2mL desta suspensão por espiga quando as plantas estavam em estágio fenológico R1, caracterizado como "florescimento e polinização", com os estilo-estigmas começando a escurecer, aproximadamente entre o sétimo e o décimo dia após o início do florescimento, período de maior susceptibilidade a infecção (MUNKVOLD et al, 1997).

A inoculação da suspensão de conídio de *F. verticillioides* foi realizada com o auxílio de um borrifador de água devidamente esterilizado, o qual o inóculo foi depositado sob os estilo-estigmas das espigas na forma de aspersão (borrifado). O método de aspersão na forma de spray simula a disseminação natural dos esporos que chegam até os estigmas das espigas.

Estrutura para gerenciar microclima no ambiente:

Foi implementado uma mini-estação no local do experimento capaz de proporcionar um microclima favorável ao desenvolvimento da doença nas espigas, sendo a sua instalação iniciada a partir da inoculação, indo do florescimento até a colheita. Esta estrutura foi composta por uma bomba elétrica acoplada a um sistema de irrigação conectada a microaspersores de nebulização. Um "timer" controlou o acionamento de todo o sistema. A programação da nebulização nas plantas foi a mesma em todos os locais dos experimentos, sendo um total de doze por dia, com duração de 5 minutos cada, iniciando-se às 8:00h até às 20:00h.

Colheita das espigas para a produção da ração contaminada:

Quando os genótipos estavam na fase fenológica R6, caracterizada como "maturação fisiológica", iniciou-se o monitoramento da umidade dos grãos até atingir o nível de 17%. Em seguida, foi colhido todas as espigas inoculadas. Posteriormente, as espigas foram dispostas no secador automatizado para que os grãos atingissem umidade de 13%, para em seguida,

proceder-se a debulha. Na sequência, os grãos inoculados por *F. verticillioides*, foram debulhados e triturados para a fabricação de ração contaminada pela micotoxina.

Aquisição da ração basal e análise do teor de fumonisina:

Uma ração basal foi obtida de milho triturado de local livre de fungo e de micotoxina, onde ambas as rações, basal e com a micotoxina (produzida através dos grãos inoculados artificialmente com *F. verticillioides*), foram igualmente formuladas com os níveis de proteínas necessárias.

Em seguida realizou-se a retirada de duas amostras, uma da ração contaminada por *F. verticillioides* e outra da ração basal. Ambas foram enviadas para o Laboratório de Micotoxologia das Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC), para a realização das análises do teor de fumonisinas B1 e B2.

Delineamento experimental:

O experimento com os pintos foi conduzido no aviário experimental da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, no campus de Araguaína-TO, no período de 21 dias, de 19 de Junho a 10 de Julho de 2017, e possuiu as coordenadas geográficas: latitude de 07°11'28''S e Longitude de 48°12'26''O.

Foram utilizados 160 pintos de um dia, da linhagem cobb 500, com peso médio de 38,7g criados em baterias de aço galvanizado até 21 dias. As aves foram criadas em baterias metálicas que apresentaram cinco andares com divisões de 0,80m x 1,00m x 0,40m e foram equipadas com comedouros e bebedouros tipo calha e bandejas metálicas colocadas sob as gaiolas para a retirada das excretas. Uma lâmpada de 60 watts para cada andar foi utilizada até o 7º dia de vida para o aquecimento das aves. Os animais foram alojados em galpão de alvenaria com laterais de tela de arame galvanizado e cortinas de PVC, manejadas de acordo com a temperatura e o comportamento das aves durante o período experimental.

As aves foram distribuídas em delineamento experimental inteiramente casualizado, com dois tratamentos (ração basal de milho com ausência de fumonisina e a ração de grãos de milho com fumonisina), com 10 repetições contendo 8 aves cada, totalizando 160 pintos. As rações experimentais foram submetidas a análise laboratorial realizada pelo Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC) para a determinação dos níveis de fumonisina.

As rações experimentais foram calculadas considerando-se a composição química dos ingredientes e as exigências nutricionais das aves de acordo com as recomendações de ROSTAGNO et al, 2011. Não houve adição de antibióticos, quimioterápicos e produtos de origem animal.

No 1º dia de idade as aves foram pesadas e distribuídas aleatoriamente nas gaiolas experimentais, recebendo as rações que foram testadas.

Verificação do desempenho zootécnico:

Os parâmetros de desempenho zootécnico foram obtidos para o período de 1 a 21 dias de idade. Avaliaram-se consumo de ração (CR), o ganho de peso (GP) e conversão alimentar (CA). O GP foi obtido pela diferença entre o peso final e o peso inicial do período. O consumo de ração foi calculado pela diferença entre o total de ração fornecida e as sobras do período. A conversão alimentar foi calculada pela razão entre o consumo total de ração e o ganho de peso no período, sendo corrigida pelo peso das aves mortas (SAKAMUA & ROSTAGNO, 2007).

Aos 21 dias as aves e as rações foram pesadas para determinação do consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar. Em seguida, duas aves de cada repetição foram submetidas a jejum alimentar por 12 horas, totalizando 40 aves, com peso corporal próximo a média da parcela (+-10%), individualmente identificadas e abatidas por deslocamento cervical, posteriormente sangradas e evisceradas para a avaliação visual e histológica dos órgãos internos.

Avaliação anatomopatológica e Histopatológica:

Para análise macroscópica das vísceras, realizou-se necropsia de 40 aves dos dois diferentes grupos. Após avaliação das vísceras, foram retirados fragmentos de 3 mm de espessura e estes foram acondicionados em recipientes contendo formol 10% tamponado por no mínimo 24 horas.

O fígado, coração e intestino delgado foram removidos por necropsia e fixados em formol tamponada a 10% para as análises histopatológicas. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 5 µm. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.), em seguida, realizou-se análise descritiva dos resultados obtidos. O fígado,

coração e intestino foram avaliados com base na histopatologia observada após o final do experimento.

Fragmentos de intestino, fígado e coração foram coletados, clivados e fixados em formol a 10% tamponado. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 5 μ m. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.). Em seguida, realizou-se análise descritiva dos resultados obtidos.

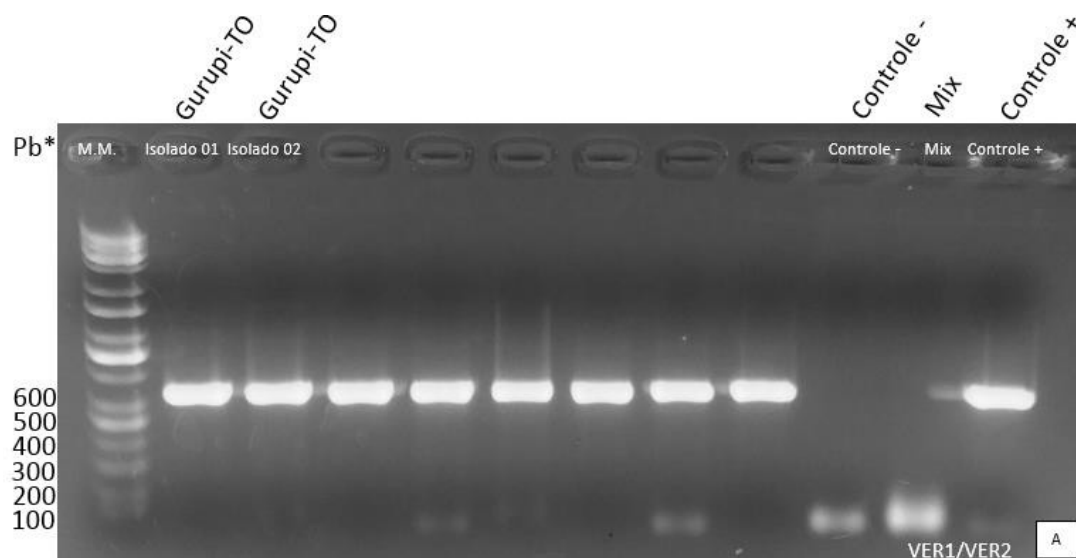
Análise estatística:

Os dados obtidos foram submetidos ao Teste Student Newman Keuls (SNK), considerando o nível de 5% de probabilidade para avaliar o efeito dos tratamentos. As análises foram realizadas utilizando o software Assistat 7.7.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação molecular do isolado:

Baseado na identificação molecular realizada (Figura 01), o isolado inoculado trata-se de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (1976). A amostra resultou em 658 e 986 nucleotídeos para região EF e RPB2, respectivamente. Esta sequência apresentou 99,9% de identidade com *Fusarium verticillioides* (Accession nº FN179338.1) e (Accession nº FN552106.1), respectivamente, cobrindo 99,9% da sequência (Query cover), de acordo com consulta ao Blast (NCBI), Icl/Query_25443 e Icl/Query_10149, conforme laudo de sanidade vegetal 3162/2017-AGR.



* Pb: Pares de Bases

Figura 01: A) Peso molecular de amostras de isolados fúngicos obtidos de milho (A), sendo: isolados 01 e 02: procedentes de Toledo-PR; Controle negativo (Controle -): Folha de milho sadia; Mix: Controle relativo, sem adição de DNA; Controle positivo (Controle +): Isolado de *Fusarium verticillioides*.

Postulados de Koch:

Verificou-se a reprodução dos sintomas de *Fusarium* em espigas de milho após a inoculação, bem como, foi verificado através do reisolamento do patógeno, as mesmas características morfológicas observadas anteriormente.

Análise de fumonisina presente nas rações:

A análise de micotoxina na ração basal revelou ausência de fumonisina, enquanto que na ração contaminada, apresentou a concentração de 2,78µg/g de fumonisina.

Avaliação zootécnica:

Conforme apresentado na tabela 01, não houve diferença significativa entre o consumo de ração aos 21 dias, sendo a média, por ave, de ração basal consumida de 1136,10g e de 1110,38g para ração contendo fumonisina, apesar do consumo ter sido levemente menor pelos frangos que se alimentaram da ração contaminada.

Tabela 1. Consumo de ração por ave (CR/ave), ganho de peso por ave na primeira semana (GP/ave 1 sem), ganho de peso por ave na segunda semana (GP/ave 2 sem), ganho de peso por ave final (GP/ave final), conversão alimentar (CA), peso da ave aos 21 dias.

Tratamento	Media do CR	Media do GP 1ª sem	Media do GP 2ª sem	Media do GP final	Media da CA	Media de peso aos 21 dias
Ração basal	1136,10a	108,45a	348,05a	746,14a	1,53a	805,02a
Ração contaminada	1110,38a	106,78a	336,60a	743,63a	1,50a	792,13a

As médias foram submetidos ao Teste Student Newman Keuls (SNK) a 5% de probabilidade de erro.

Li et al., (1998), ao analisar os frangos destinados a postura e para corte, não observou alterações no desempenho zootécnico quando alimentados com ração de farelo de milho contendo a concentração de 2µg/g de FB1, entretanto observaram diminuição na imunidade humoral e na supressão de linfócitos, causados pelas fumonisinas, porém, esses fatores não foram avaliados no presente trabalho. A conversão alimentar, das aves alimentadas pela ração livre de fumonisina foi de 1,53 enquanto que as aves que foram alimentadas com a ração contendo micotoxina foi semelhantes, de 1,50.

O ganho de peso final das aves que foram alimentadas com a ração basal se mostrou igual ao das aves que foram alimentadas com a ração contendo fumonisina. Já o peso final das aves, aos 21 dias, verificou-se a diferença de 12,89g a menos, para as aves alimentados com a ração contaminada. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, apesar de ver um resultado de peso final relativamente menor do que as aves alimentados com ração basal.

Weibking et al. (1993a) alimentaram frangos de corte de 1 dia durante 21 dias com rações que continham 1 a 5,25µg/g de fumonisina B1. As aves que receberam 4,5 e 5,25µg/g tiveram uma diminuição significativa no ganho de peso e conversão alimentar, aumento no peso dos rins, fígado e concentração de hemoglobina. As demais aves que receberam ração contaminada com concentrações inferiores de fumonisina, não apresentaram sintomas clínicos de intoxicação. Existem diversos resultados que apontam uma flutuação considerável quanto o nível de concentração de fumonisina capaz de causar danos em aves, sendo eles controversos ao limite determinado pela ANVISA que é de 5µg/g de FB1 (milho em grãos para posterior processamento), portanto, uma hipótese para tais diferenças, seria o uso de diferentes raças de aves em diferentes experimentos com fumonisina, pois a capacidade do organismo em reagir a agentes estranhos, denominada resposta imunológica, pode variar de linhagem para linhagem (KOUTSOS et al., 2001; MORGULIS et al., 2002). Vários fatores podem influenciar a resposta imunológica, incluindo as variações genéticas de isolados distintos de uma mesma espécie de patógeno e da genética da própria ave (MORRIS et al., 2004).

Weibking et al. (1993b) relataram ocorrência de diarreia, 19% de redução do peso corporal e 30% de aumento do peso do fígado de pintinhos (1 dia de idade) alimentados com ração contendo concentração superior a 3µg/g de FB1 durante duas semanas. Histologicamente, os animais apresentaram necrose multifocal hepática, hiperplasia biliar e necrose muscular. Já Kidd et al. (1997) verificaram que apenas as aves tratadas com 7,5µg/g apresentaram redução na biossíntese de esfingolipídeos, indicando possibilidade de toxidez para aves, apesar da ausência de sinais clínicos evidentes. Comparando-se aos controles, todas as aves que foram alimentadas com fumonisina B1 apresentaram níveis elevados de esfinganina e esfingosina (precursores dos esfingosídeos celulares) no soro sanguíneo. Já Henry & Wyatt (1994), trabalhando com a fumonisina B1 purificada, nas doses de 0; 0,2; 0,4; e 0,8µg/g em frangos de 1 até 21 dias de idade, observaram que, com esses níveis de toxina oferecidos às aves, não houve efeito adverso sobre ganho de peso, conversão alimentar ou consumo de água.

Percebe-se que existe um limite de tolerância de ingestão de fumonisina para que se expresse sintomas clínicos de intoxicação aparente bem como na avaliação anatomopatológica. Segundo Leeson et al., (1995), As fumonisinas são extremamente tóxicas para equídeos e suínos, porém a maioria das espécies de aves domésticas demonstra grande resistência frente a essas toxinas. Mas em frangos, segundo Norred & Voss, (1994), níveis de FB1 acima de 3µg/g ocasionam diarreia, diminuição do consumo de alimentos e ganho de peso, aumento do peso do fígado e rins e necrose hepática. Já Kubena et al. (1999) observaram poucos efeitos deletérios sobre o desempenho e a saúde de aves de postura adultas, quando submetidas à ração contendo 1 a 2µg/g de FB1 por período de tempo de até 420 dias.

Avaliação histopatológica:

Não foi evidenciado nenhum tipo de dano nos fígados das aves alimentadas com a ração contaminada (concentração de 2,78µg/g de FB1), não sendo possível associar qualquer alteração no metabolismo lipídico promovida pela fumonisina, já que nenhuma hiperplasia ou degeneração vacuolar do tecido hepático foi visualizada. As amostras de corações e intestinos também não apresentaram diferenças significativas. As amostras não apresentaram nenhum tipo de lesões aparentes.

Embora o mecanismo de ação de fumonisinas ainda não seja totalmente elucidado, a hipótese mais aceita para danos no organismo das aves, consiste na interferência no metabolismo dos esfingolipídeos, devido à inibição da enzima N-aciltransferase (WANG, 1991). STEVENS & TANG (1997), onde demonstraram que a concentração reduzida de

esfingolípídeos, ocasionada pela exposição à FB1, promove o bloqueio quase completo do transporte nos receptores folato, o que pode levar ao comprometimento de processos celulares dependentes dessa vitamina, com consequente redução do ganho de peso corpóreo e alterações significativas em órgãos de aves. Evidências que não foram observadas nas aves da linhagem COBB 500 alimentadas com a ração contaminada com fumonisina na concentração de 2,78µg/g de FB1.

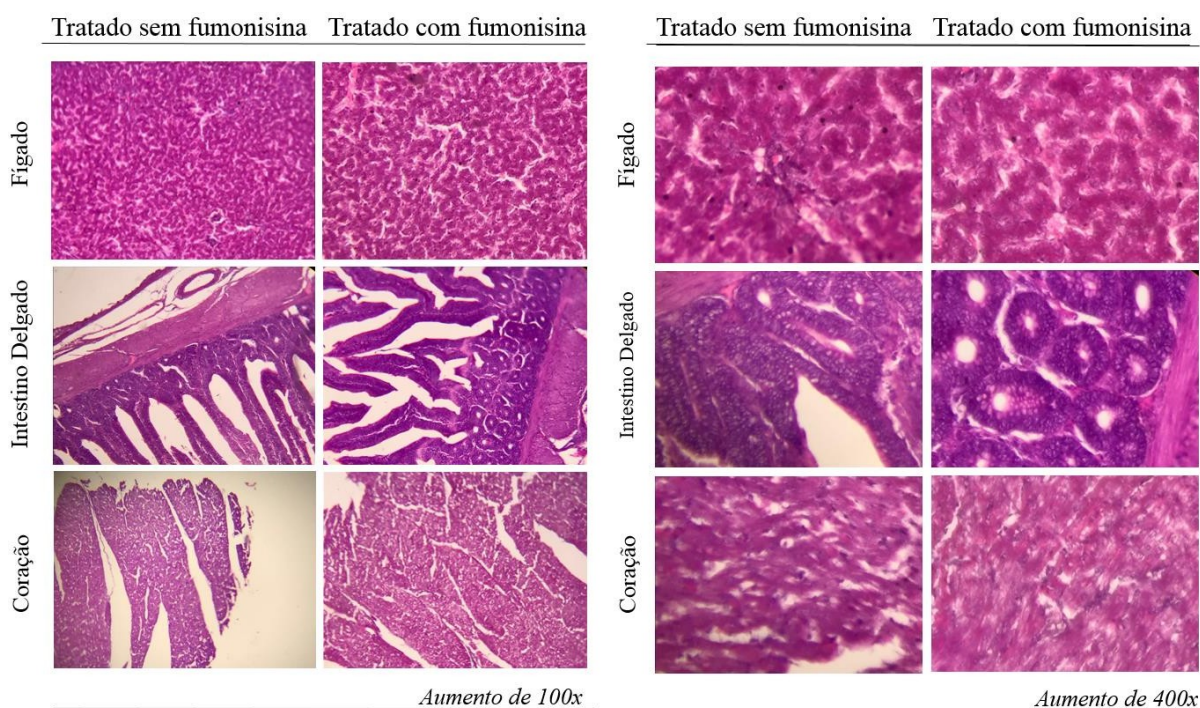


Figura 2: Fotomicrografia de corte histológico de fígado, intestino e coração de frango da raça Cobb alimentado com ração sem contaminação e com ração contaminada com fumonisina (2,78µg/g).

4.6 CONCLUSÃO

Verificou-se que a concentração de 2,78µg/g de fumonisina determinada na ração não foi suficiente para provocar alterações nos parâmetros zootécnicos (peso das aves e no consumo de ração) e histopatológico (tecidos do intestino, fígado e coração) de aves da linhagem COBB 500, alimentadas até o 21º dia.

As análises dos parâmetros zootécnicos e histopatológicos permitiram revelar concentrações mínimas e seguras de fumonisina que não provocaram danos toxicológicos em aves da linhagem COBB 500.

Este é um importante parâmetro que pode contribuir nas etapas de produção de carnes e de produtos avícolas.

4.7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Exportação de carne de frango do Brasil**. 2016

BROWN, T. P.; ROTTINGHAUS, G. E.; WILLIAMS, M. E. 1992. **Fumonisin mycotoxicoses in broilers: Performance and pathology**. Avian Dis. 36:450–454.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus, v.12, p.13-15, 1990.

FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p.

HENRY, M. H.; WYATT, R. D. **The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks**. Poultry Science 1994; 73 (Supplement 1): 100 (Abstract).

KIDD, M. T.; QURESHI M. A.; HAGLER, JR. W. M.; ALI, R. T-2 tetraol is cytotoxic to a chicken macrophage cell line. **Poultry Science**. 1997; 76(2): 311-13.

KOUTSOS, E. A.; KLASING, K. C. Interactions between the immune system, nutrition and productivity of animals. In: **Recent Advances in Animal Nutrition 2001**. Nottingham: University Press, 2001. p. 173-190.

KUBENA, L.F. et al. Effects of feeding Fusarium moniliforme culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey polts. **Poultry Science**, v.74, p.1295-1303, 1995.

KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B.; PHILLIPS, T.D.; FLETCHER, O.J. Influence of ochratoxin A and vanadium on various parameters in growing chicks. Poultry Science, 1986, 65: 1671-1678.

LEDOUX, D.R. et al. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p.330- 333, 1992.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. 1. ed. USA: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LEESON, S.; DIAZ, G.; SUMMERS, J.D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario.1995, 352p

LI, W.J.; NI, Y.Zh.; UMEMURA, H. Effective Microorganisms for Sustainable Animal Production in China. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON KYUSEI NATURE FARMING**, 4, Paris, 1995. Proceedings. Bellingham: INFRC/NFRDF, 1998. p.171-173.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L.; RAUBER, R.H. **Intoxicação experimental de frangos de corte com fumonisina B1**. 2005. Disponível em: http://www.lamic.ufsm.br/papers/Fumonisinina_em_frangos_de_corte.pdf. Acesso em: 02/02/2010.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 231-245.

MORRIS, B. C. et al. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 10, p. 1667-1674, 2004.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.

RHEEDER, J.P. et al. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.68. p.2101-2105, 2002.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F.; VISNER, H. F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**. 2002; 68, 2101 e 2105.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.M.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. 252p.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos**. Jaboticabal: FUNEP: 2007. 283p.

STEVENS, V.L.; TANG, J. Fumonisin B1 – induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.18020-18025, 1997.

THIEL, P.G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLUM, W. C. A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*. 1992;117:3–9.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.14486-14490, 1991.

WEIBKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; TURK, JR.; ROTTINGHAUS, G. E.; Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. **Poultry Science** 1993a; 72: 456-66.

WEIBKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BROWN, D. R., ROTTINGHAUS, G. E. Fumonisin toxicity in turkey poults. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 1993b; 5: 75-83.