

FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA

PREVALÊNCIA DE *Fusarium verticillioides* E MANEJO DE GRÃOS
ARDIDOS E FUMONISINAS EM MILHO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

L297p
2013

Lanza, Fabrício Eustáquio, 1983-

Prevalência de *Fusarium verticillioides* e manejo de grãos
ardidos e fumonisinas em milho / Fabrício Eustáquio Lanza. –
Viçosa, MG, 2013.

xi, 64 f. : il. ; 29 cm.

Texto em português e inglês..

Orientador: Laércio Zambolim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fusarium - Controle. 2. Zea mays - Época de colheita.
3. Micotoxinas. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.4677

FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA

PREVALÊNCIA DE *Fusarium verticillioides* E MANEJO DE
GRÃOS ARDIDOS E FUMONISINAS EM MILHO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de Julho de 2013



Dr. Rodrigo Veras da Costa
(Co-orientador)



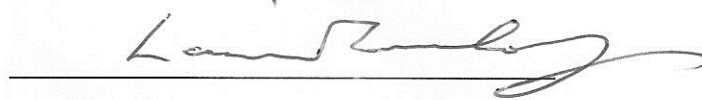
Dr. Lauro José Moreira Guimarães



Prof. Dr. Silamar Ferraz



Dr. Trazilbo José de Paula Junior



Prof. Dr. Laércio Zambolim
(Orientador)

'Quem decidir se colocar como juiz da Verdade e do Conhecimento é naufragado pela gargalhada dos deuses'

(Albert Einstein)

Aos meus amados pais, Luciene e José Eustáquio.

Aos meus queridos irmãos, Henrique e Juliane.

A minha querida Fernanda.

dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a dádiva da vida e por ter colocado pessoas tão especiais em minha caminhada.

Aos meus pais Luciene e José Eustáquio pelo carinho, amor, preocupação, ensinamentos, orações e por sacrificarem seus sonhos em favor dos meus. Aos meus queridos irmãos Henrique e Juliane, pela amizade, exemplo, força e dedicação.

A toda minha família, que mesmo distante sempre foi importante em todos os momentos da minha caminhada me dando muito carinho e força. Agradeço também a compreensão pelos momentos em que estive ausente das reuniões familiares e pelo orgulho das minhas conquistas.

A minha amada Fernanda pelo inquestionável exemplo pessoal e profissional. Obrigado, também, por suportar os momentos em que a distância nos separou e estar sempre me esperando. Não se esqueça, com você ao meu lado a caminhada é mais feliz.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade em realizar este curso.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Laércio Zambolim, pela orientação, confiança e conhecimentos transmitidos.

Aos meus co-orientadores Dr. Rodrigo Veras da Costa e Luciano Viana Cota, por acreditar em meu potencial, pela oportunidade, pela valiosa ajuda, pelos conhecimentos transmitidos e, especialmente, pela alegre convivência.

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo Dr. José Edson Fontes Figueiredo, Dra. Dagma Dionísia da Silva, Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz e Dr. Lauro José Moreira Guimarães que muito contribuíram para a realização dos trabalhos, redação científica e ensinamentos sobre a cultura do milho, além da amizade, companheirismo e alegre convívio.

Ao Dr. Ubiraci Lana, pela ajuda e esclarecimentos quanto às análises moleculares.

Aos meus amigos do laboratório da Embrapa Milho e Sorgo: Douglas, Alessandro, Lorena, Mariele, Talita e Gabriela, que me ajudaram na condução dos experimentos, gerando novas ideias. Agradeço também pela amizade, companheirismo e alegre convívio.

Aos meus amigos e funcionários da Embrapa Milho e Sorgo: Clovis (técnico do laboratório de fitopatologia), Osni (técnico do laboratório de patologia de sementes), Rafael (técnico do laboratório de segurança alimentar), Reinaldo (técnico campos experimentais), Dênio, Marquinhos, Luciano e Catirraia, que foram essenciais, competentes e altamente profissionais na condução dos experimentos, agradeço também pelo companheirismo, amizade e convívio.

À Embrapa Milho e Sorgo, pelo material cedido, espaço físico e recursos humanos, possibilitando a realização deste trabalho.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos amigos do laboratório de proteção de plantas UFV, Henrique da Silva Silveira Duarte, Alexandre Capucho, Sérgio Milagres, Ueder Lopes e José Cláudio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização destes trabalhos.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA, filho de Luciene Maria de Sousa Lanza e José Eustáquio Lanza, nasceu em Sete Lagoas, Minas Gerais, em 23 de Janeiro de 1983.

Em julho de 2002, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Estadual de Montes Claros, graduando-se em 13 de julho de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou no Programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 27 de Julho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o Programa de Pós-graduação, em nível de Doutorado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 29 de Julho de 2013.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
ARTIGO 1 – PREVALÊNCIA DE ESPÉCIES DE <i>FUSARIUM</i> PRODUTORAS DE FUMONISINAS ASSOCIADAS A GRÃOS DE MILHO NO BRASIL.....	5
1. INTRODUCTION.....	6
2. MATERIALS AND METHODS.....	7
2.1. Sampling and isolation of <i>Fusarium</i> spp.	8
2.2. Morphological identification.....	9
2.3. Molecular identification.....	9
2.4. Production of fumonisins by <i>Fusarium verticillioides</i>	10
3. RESULTS.....	11
4. DISCUSSION.....	14
5. REFERENCES.....	17
ARTIGO 2 - INCIDÊNCIA DE GRÃO ARDIDOS E FUMONISINAS TOTAIS EM MILHO COLHIDO TARDIAMENTE.....	21
1. INTRODUCTION.....	22
2. MATERIALS AND METHODS.....	24
2.1. Experimental conditions.....	24

2.2. Determination of kernels with rot symptoms and fungal species.....	24
2.3. Determination of total fumonisin levels in grains.....	25
2.4. Statistical Analyses.....	25
3. RESULTS.....	25
4. DISCUSSION.....	34
5. REFERENCES.....	38

ARTIGO 3 - CONTROLE QUÍMICO DE GRÃOS ARDIDOS E FUMONISINAS TOTAIS EM MILHO.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1. ENSAIO 1 – Luís Eduardo Magalhães/BA.....	46
2.2. ENSAIO 2 – Sete Lagoas/MG.....	47
2.3. Avaliação dos ensaios.....	49
2.4. Quantificação de grãos ardidos.....	49
2.5. Incidência de fungos associados aos grãos.....	49
2.6. Quantificação de fumonisinias.....	50
2.7. Rendimento de grãos.....	50
2.8. Análise estatística.....	51
3. RESULTADOS.....	51
3.1. Incidência de grãos ardidos.....	51
3.2. Fungos fitopatogênicos associados aos grãos.....	52
3.3. Teores de fumonisinias.....	53
3.4. Rendimento de grãos.....	54
4. DISCUSSÃO.....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
CONCLUSÕES GERAIS.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

LANZA, Fabrício Eustáquio. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Prevalência de *Fusarium verticillioides* e manejo de grãos ardidos e fumonisinas em milho.** Orientador: Laércio Zambolim. Co-orientadores: Rodrigo Veras da Costa e Luciano Viana Cota.

Nos últimos anos, os requisitos comerciais relativos à saúde e qualidade de grãos, não só para a exportação, mas também para consumo doméstico tem-se tornado cada vez mais rigorosos, particularmente para a contaminação por micotoxinas. Espécies de fungos produtores de micotoxinas do gênero *Fusarium* são a principal causa de grãos de baixa qualidade, devido a produção de grãos ardidos e efeitos tóxicos das micotoxinas para a saúde humana e animal. De acordo com estas considerações, o presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência e a distribuição geográfica das espécies de *Fusarium* associados com grãos de milho no Brasil, o potencial de produção de fumonisinas de isolados de *Fusarium* em diferentes áreas de plantio de milho e avaliar estratégias de manejo para reduzir a incidência de grãos ardidos e níveis de fumonisinas totais em milho. Para estudar a prevalência de espécies de *Fusarium* responsáveis por podridões de espigas de milho, foram coletadas espigas em 15 áreas de plantio das principais regiões produtoras brasileiras. A identificação de 230 isolados de *Fusarium* para o nível de espécie foi baseada em características morfológicas e método molecular por PCR com primers espécie-específicos. A quantificação de fumonisinas totais produzidas por cinquenta isolados de diferentes regiões, foi realizada por colunas de imunoafinidade. Uma série de experimentos com diferentes datas de colheita, número e período de aplicação de fungicidas foram realizadas a fim de determinar uma técnica confiável de manejo para reduzir a incidência de

fungos patogênicos e, conseqüentemente grãos ardidos e fumonisinas em milho. Neste estudo verificou-se que a espécie *Fusarium verticillioides* foi o principal patógeno associado a grãos de milho no Brasil, com prevalência de 99%. Outra espécie produtora de fumonisina identificadas foi *F. proliferatum* ocorrendo em baixa frequência (1%). A espécie *F. subglutinans* identificada em lavouras de milho em muitos países, não estava presente entre os duzentos e trinta isolados. Todos os 50 isolados de *F. verticillioides* selecionados são produtores de fumonisinas e o potencial de produção foi muito variável e não está relacionado com a região geográfica de origem dos isolados. Em relação às diferentes épocas de colheita de milho, observou-se que a incidência de grãos ardidos e o total de fumonisinas podem aumentar gradualmente de acordo com o atraso na colheita. *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella* spp. foram as espécies fúngicas mais frequentes identificadas em diferentes épocas de plantio. Tanto para a incidência de grãos ardidos quanto para grãos assintomáticos a infecção por *F. verticillioides* foi elevada e prevalente em todas as safras, e sua frequência de incidência varia de acordo com genótipos de milho. A incidência de *Stenocarpella* spp. também variou de acordo com os genótipos de milho e foi predominantemente associada à grãos ardidos. Aplicações foliares de fungicidas estrobilurinas e triazóis, em diferentes números e épocas de aplicações, foram ineficazes em reduzir a incidência de grãos ardidos, fungos fitopatogênicos associados aos grãos e fumonisinas totais em milho.

ABSTRACT

LANZA, Fabrício Eustáquio. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Prevalence of *Fusarium verticillioides* and management of kernels rot and total fumonisin in maize.** Adviser: Laércio Zambolim. Co-Advisers: Rodrigo Veras da Costa and Luciano Viana Cota.

In recent years, trade requirements concerning the health and quality of grains, not only for export but also for domestic consumption have becoming increasingly strict, for particularly those related to mycotoxins contamination. Mycotoxin-producing species of the genus *Fusarium* are the major cause of low-quality grains due to toxic effects of mycotoxins to animal and human health and rotting grains. According to these considerations, the present study aimed to evaluate the prevalence and geographic distribution of *Fusarium* species associated with corn grains in Brazil; the fumonisins production potential of *Fusarium* strains isolated from different corn-planting areas, and to evaluate management strategies for reducing the kernel rot incidence and the levels of fumonisins in corn. To study the prevalence of *Fusarium* species causing maize kernel rot, corn ears were sampled in fifteen planting areas representative of the main important Brazilian producing regions. The identification of two hundred thirty *Fusarium* isolates to the species level was based on morphological characteristics and molecular method by PCR with species-specific primers. The quantification of total fumonisins produced by fifty selected isolates was performed by immunoaffinity columns. A number of experiments with different harvest dates, and number and period of fungicides application were accomplished in order to ascertain a reliable management technique for reducing the incidence of pathogenic fungi, and consequently, kernel rot and fumonisins in corn grains. In this study we found that the fungal species

Fusarium verticillioides was the main pathogen associated with corn grain in Brazil with 99% prevalence. Other fumonisins-producing species identified was *F. proliferatum* occurring at low frequency (1%). The species *F. subglutinans* identified in corn fields in many countries was not present among the two hundred thirty isolates. All fifty selected *F. verticillioides* isolates produced fumonisins and the potential of fumonisins production was high variable and not related with the geographic region of origin of isolates. In relation to different harvest times of corn, it was observed that the kernel rot incidence and total fumonisins increase gradually according to increased periods of delayed harvest. *Fusarium verticillioides* and *Stenocarpella* spp. were the most frequent fungal species identified in different planting seasons. In both kernel rot and asymptomatic grains the infection by *F. verticillioides* was high prevalent in all crop seasons and the frequency of its incidence varied according to maize genotypes. The incidence of *Stenocarpella* spp. also varied with the maize genotypes and was predominantly associated to kernel rot. Foliar applications of the fungicides strobilurin and triazoles in a different period of times and number of applications, were ineffective for reducing pathogenic fungi associated with corn grains, therefore the kernel rot incidence and fumonisins level in maize.

INTRODUÇÃO GERAL

O Milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais de maior importância para o Brasil, principalmente pela sua participação na cadeia alimentar humana e animal. Classificado como terceiro maior produtor mundial, o Brasil exporta anualmente 20% de sua produção e frequentemente enfrenta barreiras para comercialização do milho. Apesar de alcançar bons índices de produção, os produtores brasileiros de milho, ainda apresentam uma das produtividades mais baixas entre os países exportadores (AGRIANUAL, 2013). Dentre os fatores que limitam a produtividade e também a comercialização devido à baixa qualidade do produto tanto no Brasil quanto em outros países produtores, se destacam as doenças relacionadas aos grãos, provocadas principalmente por fungos do gênero *Fusarium* (PINTO, 2005; MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; SWEENEY & DOBSON, 1998).

As espécies de *Fusarium* estão entre os patógenos mais comumente associados à cultura do milho em todo mundo. Tais espécies são capazes de causar doenças em sementes, morte de plântulas, podridão de colmo, podridão de raiz, danos em grãos armazenados e principalmente podridão de espigas com consequente produção de grãos ardidos (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). Dentre as principais espécies de *Fusarium* classificadas dentro da seção *Liseola* proposta por Leslie e Summerell (2006), frequentemente associadas a doenças em grãos milho, se destacam: *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*. Estas espécies, embora capazes de causar danos em várias partes da planta, em muitos casos não estão diretamente relacionadas com perdas em produção, mas estão estreitamente relacionadas com problemas de baixa qualidade de grãos e sementes pela produção de micotoxinas, como as

fumonisin (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; SWEENEY & DOBSON, 1998; FIGUEIRA et al.; 2003).

Entre os fatores que ocasionam a perda da qualidade de grãos de milho, destacam-se as micotoxinas e os grãos ardidos. São denominados ardidos, aqueles grãos que apresentam pelo menos 25% de sua superfície com alterações das cores, cujo matiz pode variar de marrom-claro a roxo ou vermelho-claro a vermelho-intenso. Na maioria dos casos são também portadores de altos teores de micotoxinas (PINTO, 2005). Devido a este fato, nos últimos anos, como padrão de qualidade, as agroindústrias tem adotado uma tolerância máxima de 6% de grãos ardidos em lotes comerciais de milho (MENEZZO, 2000).

As micotoxinas, metabólitos fúngicos secundários presentes em grande parte dos alimentos, provocam elevadas perdas econômicas em toda a cadeia produtiva agrícola e representam risco potencial para o agronegócio brasileiro e para a saúde humana e animal. A FAO estima que, em todo o mundo, cerca de 25% dos alimentos estejam contaminados com micotoxinas. A preocupação crescente com a segurança alimentar tem exigido melhoria na qualidade sanitária dos alimentos e rações (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY, 2003).

O consumo de dieta contaminada com micotoxinas pode induzir a danos agudos e crônicos resultando em efeitos teratogênicos, carcinogênicos e imunossupressores (JACKSON & JABLONSKI, 2004; BINDERA et al., 2007). As perdas econômicas para os produtores resultam da recusa ao alimento por parte de animais portadores de micotoxicose, acarretando baixa conversão alimentar com diminuição do ganho de peso corporal, imunossupressão e interferência com a fertilidade (JOBIM *et al.*, 2001; WU, 2006). Desse modo, as indústrias que processam alimentos, juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, impõem limites de tolerância para micotoxinas em produtos derivados do milho (DOU, 2011).

Dentre as micotoxinas que ocorrem em grãos de milho, um grupo tem merecido importância prioritária, as fumonisin. As fumonisin, produzidas principalmente por espécies do gênero *Fusarium*, são reconhecidas como uma das micotoxinas de maior importância para os seres humanos e para aqueles animais que utilizam o milho em sua alimentação. Esta micotoxina está

relacionada com o surgimento de câncer de esôfago e anormalidades no tubo neural em seres humanos. Além disso, é também responsável pela ocorrência de encefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos e várias complicações em aves (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; SWEENEY & DOBSON, 1998; FIGUEIRA et al.; 2003). Portanto, a contaminação dos grãos pelas fumonisinas pode acarretar perdas substanciais à economia do país, devido aos custos relacionados à saúde pública, bem como as barreiras tarifárias ao comércio internacional destes produtos.

O crescimento fúngico, com conseqüente formação de grãos ardidos e produção de micotoxinas são dependentes de uma série de fatores, como umidade, temperatura, presença de oxigênio, tempo para o crescimento fúngico, características genéticas, lesões provocadas nos grãos por insetos ou dano mecânico/térmico, quantidade de inóculo fúngico, interação/competição entre as linhagens fúngicas, época de colheita, sistemas de secagem e armazenagem (PICOT et al., 2010), sendo o milho, um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos. Estudos realizados no Brasil e no exterior têm demonstrado a ocorrência de elevados níveis de micotoxinas tanto em grãos de milho quanto em produtos derivados (ROCHA ET AL., 2011; JACKSON & JABLONSKI, 2004). A falta de monitoramento desses fatores proporciona elevada prevalência de micotoxinas nos grãos produzidos no Brasil e em países de clima semelhante.

Sendo assim, considerando o elevado custo e a dificuldade para a detoxificação de alimentos contaminados por micotoxinas e manejo visando melhoria da qualidade dos grãos, torna-se necessária a implementação de medidas que visem prevenir e/ou reduzir a formação de grãos ardidos e fumonisinas em milho. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos estudar a prevalência de espécies de *Fusarium* toxigênicas e práticas culturais relacionadas ao cultivo de milho, visando à prevenção ou a redução da ocorrência de grãos ardidos e micotoxinas.

Especificamente pretende-se:

- Identificar as espécies de *Fusarium* da seção *Liseola* associadas a grãos de milho no Brasil; Determinar as espécies predominantes em grãos de milho nas diferentes regiões geográficas do Brasil; Caracterizar o potencial

de produção de fumonisinas de isolados de *Fusarium* spp. coletados em diferentes regiões Brasileiras.

- Avaliar o efeito da colheita tardia sobre a incidência de grãos ardidos, incidência de fungos fitopatogênicos e fumonisinas totais em grãos de milho.
- Avaliar a eficiência de diferentes fungicidas, épocas e número de aplicações, no controle de grãos ardidos, incidência de fungos fitopatogênicos e fumonisinas totais em grãos de milho.

ARTIGO 1

PREVALÊNCIA DE ESPÉCIES DE *FUSARIUM* PRODUTORAS DE FUMONISINAS ASSOCIADAS A GRÃOS DE MILHO NO BRASIL

RESUMO: Nos últimos anos, grande ênfase tem sido dada aos fitopatógenos que atacam os grãos de milho, principalmente pela sua capacidade de produção de micotoxinas. Fumonisinias são consideradas as micotoxinas mais importantes em milho, sendo produzidas em maior quantidade por fungos do gênero *Fusarium*, que contem espécies altamente complexas quanto a sua identificação. O estudo da distribuição geográfica de espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinias e seu potencial de produção dessa micotoxina é fundamental para o estabelecimento de estratégias de manejo visando a redução dos níveis de contaminação dos alimentos. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos: Identificar as espécies de *Fusarium* da seção *Liseola* associadas a grãos de milho no Brasil por métodos morfológicos e moleculares; Determinar as espécies predominantes em grãos de milho nas diferentes regiões geográficas do Brasil; Caracterizar o potencial de produção de fumonisinias de isolados de *Fusarium* spp. coletados em diferentes regiões brasileiras. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que: *F. verticillioides* é a espécie do gênero *Fusarium* predominantemente associada a grãos de milho no Brasil (99%); todos os 50 isolados selecionados foram capazes de produzir fumonisinias; verificou-se elevada variabilidade na produção de fumonisinias, com isolados produzindo desde 0,01 a 2,39 µg.g⁻¹, não sendo detectada correlação com a região geográfica de origem; *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são patógenos pouco frequentes em milho no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos toxigênicos, micotoxinas, *Zea mays*

PREVALENCE OF FUMONISINS-PRODUCING *FUSARIUM* SPECIES IN BRAZILIAN CORN GRAINS

ABSTRACT: Fumonisins produced by *Fusarium* species are the most important mycotoxins in maize grains. The geographic distribution of *Fusarium* species and the knowledge of their potential to produce fumonisins are essential for the adoption of management strategies to reduce contamination of maize grains. The present study aimed morphological and molecular characterization of *Fusarium* species within the *Liseola* section isolated from corn grains of different geographic regions in Brazil, and evaluate their potential for fumonisins production. The results showed that *F. verticillioides* is the predominant species (99%) associated with corn grains, and two other toxigenic species, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* are incidental in Brazilian corn. Although there was a high variability in the total fumonisin production among the isolates (0.01 to 2.39 $\mu\text{g.g}^{-1}$); all fifty isolates analysed were able to produce fumonisins. The level of total fumonisin production was not correlated with the geographic origin of the isolates.

KEY-WORDS: Toxigenic fungi, micotoxins, *Zea mays*

1. INTRODUCTION

Brazil is the third largest producer of corn in the world with an average production of 77 million tons in the crop year 2012/2013 (Agrianual, 2013; CONAB, 2013). However, the Brazilian average of corn yield is still low (4.77 tons per hectare) considering the high-yielding hybrids available on the market.

Diseases are a major factor limiting the increase of corn yield in the tropical humid climate in Brazil (Oliveira *et al.*, 2004). Among the most important pathogens of corn in Brazil, different species of the genus *Fusarium* are of great concern to technicians and producers (Oliveira *et al.*, 2004; Munkvold and Desjardins, 1997). Among the *Fusarium* species complex (teleomorph *Gibberella fujikuroi* included in *Liseola* section) which comprises more than 50 species, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* are the main species infecting corn kernels (Krska *et al.*, 2009; Leslie *et al.*, 2006). *Fusarium* spp. cause a variety of diseases in corn such as rot on roots, stems, ears and grains (Munkvold, 2003; Munkvold and Desjardins, 1997). In addition to yield damages caused by *Fusarium* spp., they also produce a variety of secondary

metabolites highly toxic to humans and other animals (Munkvold and Desjardins, 1997). Among the mycotoxins produced by *Fusarium* spp., fumonisins are considered the most significant problems due to their high incidence, levels of production, and toxicity (Völkel, *et al.*, 2011; Munkvold and Desjardins, 1997). Fumonisins are involved in the inhibition of sphingolipids with serious consequences to the cell structure of eukaryotic organisms (Marasas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1991). Fumonisins are mainly synthesized by *F. verticillioides*; the *Fusarium* species most commonly reported infecting corn grains (Madania *et al.*, 2013; Rahjoo *et al.*, 2008; Orsi *et al.*, 2000; Munkvold and Desjardins, 1997). The ingestion of fumonisin-contaminated corn provoke serious diseases in animals, such as horse leukoencephalomalacia (Marasas *et al.*, 1988; Giannitti, *et al.*, 2011), pulmonary edema in swine (Harrison *et al.*, 1990), and hepatotoxicity in rats (Gelderblom *et al.*, 1996). Fumonisins are also directly related to human esophageal cancer and defects in neural tube formation in fetuses (Doi and Uetsuka, 2011; Völkel *et al.*, 2011; Jackson and Jablonski, 2004; Ueno 2000).

The identification the *Fusarium* species prevalent throughout corn-producing areas is crucial for the establishment of management strategies for fusariose and fumonisins control. The morphological identification of *Fusarium* species may not be sufficient for complete distinction of species. Thus, the analysis of rRNA genes and the use of specie-specific primers for species identification are frequently used (Covarelli *et al.*, 2012; Mulè *et al.*, 2004; Rahjoo *et al.*, 2008).

Taking into account all the above considerations, this study aimed to identify the species of *Fusarium* from section *Liseola* associated with corn grains in Brazil by morphological and molecular methods and to characterize the potential for fumonisins production of *Fusarium* spp. collected from different maize crop area in Brazil.

2. MATERIALS AND METHODS

This study was performed in the Plant Pathology laboratory at the Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS – EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG, Brazil. The identification of the *Fusarium* species consisted of morphological characterization and molecular confirmation of species.

2.1. Sampling and isolation of *Fusarium* spp. Samples of symptomatic and asymptomatic corn cobs of *Fusarium* infection were collected in the Brazilian producing regions (Figure 1), which are characterized by the great diversity of climatic conditions. In the laboratory, the cobs were thrashed, homogenized and subsequently sub-sampled.

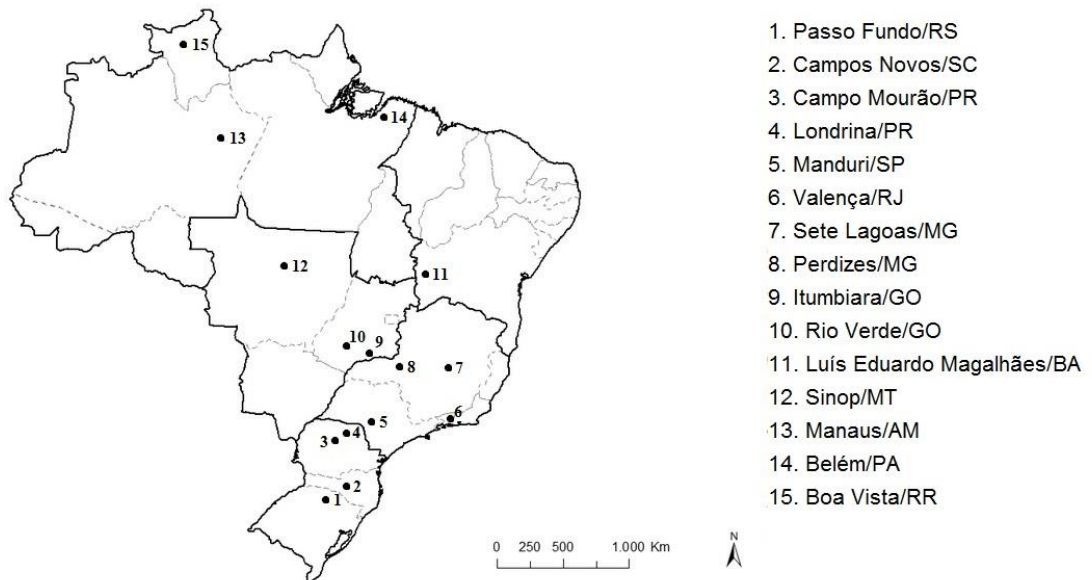


Figure 1. Indications of the Brazilian corn planting areas sampled for *Fusarium* species.

To perform the Blotter test, 25 grains were sterilized by immersion in sodium hypochlorite 2% for 5 minutes and then washed twice with sterile distilled water. Afterward, 200 grains per sample were distributed in gerboxes containing a filter paper moistened with 5% agar-water (w/v) according to Pinto *et al.* (2007). The gerboxes were maintained at room temperature under continuous light for 24 h to stimulate the germination and then transferred to a freezer at -5 °C for a period of 24 h. After, that gerboxes were incubated at 25 °C with 12 h photoperiod for 10 days. The morphological identification and quantification of the pathogens in grains were made with the aid of a stereoscopic microscope and a binocular microscope. Grains showing characteristic colonies of *Fusarium* spp. (cottony white to pinkish mycelium) were transferred to Petri dishes containing PDA medium (potato dextrose agar) to obtain monoconidial cultures. We obtained 230 single spore isolates of *Fusarium*, and each monosporic culture was identified considering the date,

corn genotype and location of sample collection. The isolates were stored and kept in test tubes containing PDA and mineral oil.

2.2. Morphological identification. For morphological identification, all isolates were grown on PDA medium and incubated at 25 °C with 12 h photoperiod for 14 days. The macroscopic characteristics of the colony were analyzed with the aid of a stereoscopic microscope and a binocular microscope. The morphology of microconidia, macroconidia, conidiogenous cells (phialides) and chlamydospores of each species were identified according to the criteria proposed by Leslie *et al.*, (2006).

2.3. Molecular identification. For molecular identification, the isolates were cultured on PD (potato dextrose) liquid medium for three days on an orbital shaker at 90 rpm under continuous fluorescent light. After this period the mycelium was collected with the aid of sterile gauze and then frozen in liquid nitrogen. Total DNA was extracted using the protocol described by Murray and Thompson (1980). The pairs of species-specific primers VER1/VER2, PRO1/PRO2 and SUB1/SUB2 (Table 1) designed by Mulè *et al.* (2004) were used for *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* identification, respectively.

Table 1. Sets of species-specific primers used for molecular identification of *Fusarium* species isolated from corn grains.

Primer	Sequence (5'→ 3')	Species amplicon
SUB1 SUB2	CTGTCGCTAACCTCTTTATCCA CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA	<i>F. subglutinans</i> ^a
PRO1 PRO2	CTTTCCGCCAAGTTTCTTC TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	<i>F. proliferatum</i> ^a
VER1 VER2	CTTCCTGCGATGTTTCTCC AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA	<i>F. verticillioides</i> ^a
EF1 EF2	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT	<i>Fusarium</i> spp. ^b

^aMulè *et al.*, 2004; ^bO'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004

PCR reactions were performed separately for each set of primers containing 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 μM each primer, dNTP 0.25 mM, 1 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 20 ng of DNA, in a final volume of 20 μl. PCR amplifications were performed on Applied Biosystems® Veriti® 384-Well Thermal (Applied Biosystems®) with the following conditions: one cycle for denaturation of DNA samples at 95 °C for 5 min, 30 cycles of 50s at 94 °C, 50 s at 56 °C (annealing), and 7 min at 72 °C (extension). Finally, the reactions were incubated for 10 min at 72°C. DNA of the isolates CML770 (*F. subglutinans*), CML2394 (*F. proliferatum*) and CML2395 (*F. verticillioides*) from the Mycological Collection of the Universidade Federal de Lavras were used as positive controls. The amplified DNAs were analyzed by horizontal gel electrophoresis at 6 V/cm² in 1.0% agarose gel (wt/v) in 1X TAE buffer (0.04 M Tris-Acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0) plus ethidium bromide (0.5 mg/l). Gels were visualized under UV light, photographed, and the fingerprints were compared visually with the overview gels.

2.4. Production of fumonisins by *Fusarium verticillioides*. Fifty isolates of *F. verticillioides* from different corn-growing areas were tested for total fumonisin production. All isolates were cultured in Petri dishes containing PDA medium and incubated at 27 °C for 7 days under 12 h photoperiod. To assess the total fumonisins production four mycelial discs with 0.5 cm diameter were equidistant inoculated onto a Petri dishes containing 40 g of ground corn previously sterilized and moistened with 20 mL of deionized water. The cultures were incubated at 27 °C for 14 days under 12 h photoperiod following the protocol proposed by Ono *et al.* (2010). Then, the samples were placed in an enforced ventilation oven at 65 °C for 48 hours to homogenize the water content. Sub-samples of 10 g were taken from each sample (three replicates) for total fumonisin analysis. The total fumonisin content was determined by immunoaffinity columns Fumonitest® using the fluorometer Vicam according to manufacturer's instructions.

The data of total fumonisin levels were subjected to statistical analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Scott Knott test at 5% probability using the program SISVAR® (Ferreira, 2011).

3. RESULTS

In the present study, 207 of the 230 isolates were identified to the species level based on the conventional morphological criteria proposed by Leslie *et al.* (2006). Of these 207 isolates, 200 were identified as *F. verticillioides*. Some isolates of this species showed grouped monophialides and a great quantity of macroconidia, which complicate then identification. In these cases, the presence of the septum on the base of each phialide allowed identifying them as monophialides, and this was the criterion used to identify the isolates as *F. verticillioides*.

Seven isolates were identified as *F. proliferatum*. The presence of poliphialides with short chains of microconidia and the presence of false heads are characteristics considered for the identification of this species (Leslie *et al.*, 2006).

In relation to the other 23 isolates the features commonly associated with *Fusarium* spp. were inconsistently observed, thus the morphological identification of these isolates to the species level was not possible.

In Figure 2 are shown the results of the DNA amplification tests for validating the *Fusarium* specie-specific primers VER1/VER2, PRO1/PRO2, and SUB1/SUB2 for *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans*, respectively. The species-specific primers used in this study generated amplification products only for the target species.

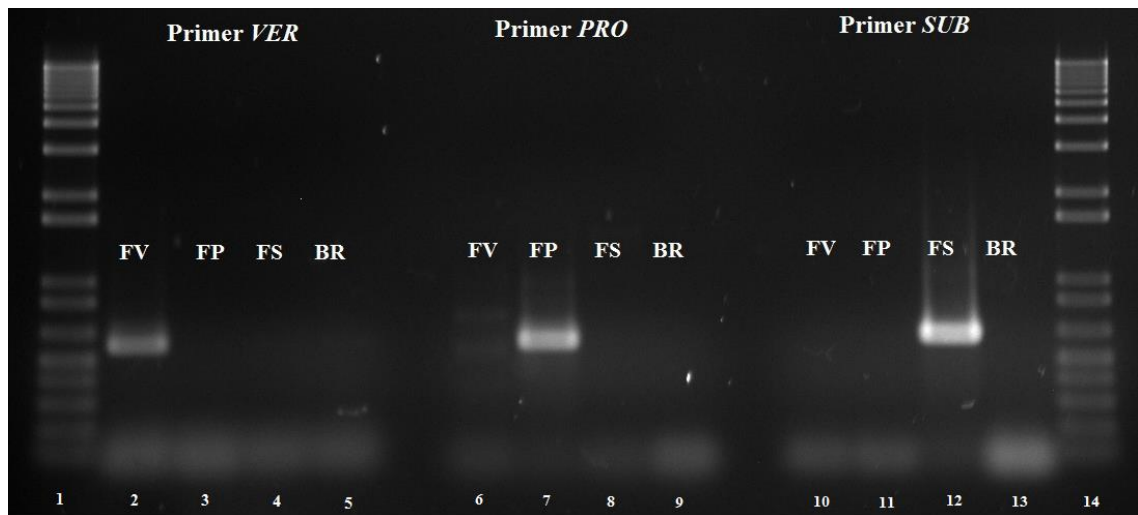


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of species-specific PCR-amplicons for three *Fusarium* reference species. Lanes 2 to 5: PCR products with primers VER1/VER2 for *F. verticillioides* (FV); lanes 6 to 9: amplicon with primers PRO1/PRO2 for *F. proliferatum* (FP); lanes 10 to 13: amplicon with primers SUB1/SUB2: for *F. subglutinans* (FS). BR: negative control. Lanes 1 and 14: 1 Kb Plus DNA Marker (Invitrogen).

From the 230 isolates, 228 showed amplification with the primers VER1/VER2, therefore, this species were assigned as *F. verticillioides*. Two isolates showed amplification with the primers PRO1/PRO2, thus they were identified as *F. proliferatum*. These two isolates were collected in Manduri, São Paulo state and in Manaus, Amazonas state (Figure 1). PCR amplicons were not detected with the primer set SUB1/SUB2 species-specific for *F. subglutinans*.

A high variability in the capability of fumonisin production was observed among 50 selected isolates identified as *F. verticillioides*. The total fumonisins level ranged from 0.01 to 2.39 $\mu\text{g.g}^{-1}$. The isolates were grouped into five categories according to the capacity of fumonisins production (Table 2). Group 1 (24% of the isolates), low yield ($<0.38 \mu\text{g.g}^{-1}$); Group 2 (40%), moderately low ($>0, 38 \text{ to } 0.85 \mu\text{g.g}^{-1}$); Group 3 (26%), average yield ($>0.85 \text{ to } 1.39 \mu\text{g.g}^{-1}$); Group 4 (6%), moderately high ($>1.39 \text{ to } 1.69 \mu\text{g.g}^{-1}$); and Group 5 (4%), high yield ($>1.69 \mu\text{g.g}^{-1}$).

Table 2. Total fumonisin production by fifty *Fusarium verticillioides* isolates collected in different Brazilian corn-planting areas.

Locality	Isolate	*Fumonisin ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Sete Lagoas/MG	F73	0.85 b
Sete Lagoas/MG	F75	0.54 b
Campo Mourão/PR	F105	0.01 a
Campo Mourão/PR	F110	0.14 a
Rio Verde/GO	F115	0.02 a
Rio Verde/GO	F118	1.15 c
Perdizes/MG	F125	1.08 c
Perdizes/MG	F129	0.81 b
Londrina/PR	F135	0.79 b
Londrina/PR	F140	0.46 b
Passo Fundo/RS	F150	0.22 a
Passo Fundo/RS	F154	1.12 c
Passo Fundo/RS	F155	0.69 b
Passo Fundo/RS	F159	2.32 e
Rio Verde/GO	F176	1.35 c
Rio Verde/GO	F177	0.68 b
Luís Eduardo Magalhães/BA	F308	0.62 b
Luís Eduardo Magalhães/BA	F310	2.39 e
Luís Eduardo Magalhães/BA	F311	1.69 d
Luís Eduardo Magalhães/BA	F312	1.02 c
Luís Eduardo Magalhães/BA	F313	0.60 b
Luís Eduardo Magalhães/BA	F315	1.02 c
Campos Novos/SC	F320	0.38 a
Campos Novos/SC	F321	0.82 b
Campos Novos/SC	F323	0.73 b
Campos Novos/SC	F325	0.59 b
Roraima/RR	F375	0.71 b
Roraima/RR	F378	0.03 a
Roraima/RR	F380	0.71 b
Roraima/RR	F383	0.36 a
Manduri/SP	F391	0.16 a
Manduri/SP	F393	0.51 b
Manduri/SP	F395	0.38 a
Manduri/SP	F397	1.02 c
Manaus/AM	F400	0.08 a
Manaus/AM	F403	0.99 c
Manaus/AM	F406	0.20 a
Manaus/AM	F415	1.25 c
Sinop/MT	F420	1.69 d
Sinop/MT	F422	1.05 c
Sinop/MT	F423	0.99 c
Sinop/MT	F425	1.65 d
Valença/RJ	F431	0.45 b
Valença/RJ	F432	0.38 a
Valença/RJ	F433	1.34 c
Valença/RJ	F436	0.62 b
Belém/PA	F440	0.48 b

Belém/PA	F442	0.72 b
Belém/PA	F444	1.39 c
Belém/PA	F446	0.46 b

*means followed by the same letter do not differ among themselves by Scott Knott test ($\alpha=0,05$).

Two isolates, F159 and F310, showed the highest level of total fumonisins production with values of 2.32 and 2.39 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectively. Twelve isolates had very low potential for fumonisins production with values ranging from 0.01 to 0.38 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Compared with other results of the present study these values were categorized as traces of fumonisins production.

A wide variability in the total fumonisin production among isolates of the same geographic region. For example, isolates collected in the region of Luiz Eduardo Magalhães, Bahia state (Figure 1) showed total fumonisin production values ranging from 0.60 (isolate F313) to 2.39 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (isolate F310). A similar situation was observed for isolates collected in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, that showed total fumonisin content ranging from 0.22 (isolate F150) to 2.32 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (isolate F159). In the region of Manaus, Amazonas state, the isolates F400 and F415 produced 0.08 and 1.25 $\mu\text{g.g}^{-1}$ fumonisin, respectively.

4. DISCUSSION

In this study, 230 fungic isolates from corn grains collected from different Brazilian geographic regions representative of the corn-planting areas were initially identified as *Fusarium* species by colony morphology. By using morphological criteria described by Leslie *et al.* (2006) for preliminar classification, 207 isolates were identified to the species level being 200 *F. verticillioides* and 7 *F. proliferatum*. Twenty three isolates could not be identified. However, a slightly different result was observed for the molecular identification of the *Fusarium* species using three specie-specific primers. The identities of 202 isolates were confirmed being 200 *F. verticillioides* and two *F. proliferatum*. Five species previously assigned as *F. proliferatum* by morphological criteria were identified as being *F. verticillioides*. The 23 unidentified species of *Fusarium* produced a single PCR amplicon only with the primer set for *F. verticillioides*. These finds evidenced two important points: first, the limitation of morphological data concerning *Fusarium* species identification,

and second, the use of molecular analysis by specie-specific PCR primers allowed the identification of *Fusarium* species even in those cases that morphological criteria failed. These results corroborate previous studies reporting the difficulty or impossibility in distinguish *Fusarium* species associated with corn kernels through morphological observations (Madania *et al.*, 2013; Rahjoo *et al.*, 2008; Summerell *et al.*, 2003; Leslie *et al.*, 2006).

Divergent results between morphological and molecular methods for *Fusarium* identification are common in the literature. Rahjoo *et al.* (2008) reported that in 140 isolates morphologically identified as *F. verticillioides*, 133 isolates were confirmed by molecular techniques by using species-specific primer. Among the seven remained isolates, one was identified as *F. thapsinum*, four as *F. proliferatum* and two as *Fusarium* spp. Although the difficulties to identify some *Fusarium* isolates to the species level by morphological criteria, the use of molecular analysis by using specie-specific PCR primers allows the identification of *Fusarium* species even in those cases that morphological criteria identification was not possible.

The high prevalence of *F. verticillioides* (99.13%) in this study, has been reported in a number of countries, including Brazil, Italy, Kenya, USA, Iran, and Syria (Munkvold, 2003; Rahjoo *et al.*, 2008; Venturini *et al.*, 2011; Madania *et al.*, 2013). In Brazil, *Fusarium verticillioides* occurring at high frequency (96%) in maize grains collected in four different regions was previously reported by Rocha *et al.* (2011).

In addition to *F. verticillioides*, other species have been reported causing maize cob rot (Leslie *et al.*, 1990). *F. proliferatum* was reported along with *F. verticillioides* in Italy (Logrieco *et al.*, 1995), in the Southern Europe (Logrieco *et al.*, 2002) and in Iran (Ghiasian *et al.*, 2004; Rahjoo *et al.*, 2008). On the other hand, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* were found at low frequency in Austria (Krska *et al.*, 1997), the Slovak Republic (Piecková and Jesenska, 1997), Poland (Kostechi *et al.*, 1995) and Mexico (Desjardins *et al.*, 2000). In a study by Rocha *et al.* (2011), among 100 *Fusarium* isolates from four Brazilian corn-planting areas, only two isolates, from the same area, were identified as *F. proliferatum*. Also in the present study, only two isolates of *F. proliferatum*, one from Amazonas and other from São Paulo state (Figure 1) were detected among 230 isolates. The low frequency of *F. proliferatum* and the absence of *F. subglutinans* observed in this study indicate that these two species actually are

minor pathogens of corn in Brazil, as reported in other countries (Covarelli *et al.*, 2012; Madania *et al.*, 2013).

Although the regulation of fumonisins production is a complex process involving interactions between the host and pathogen genotypes, and environmental conditions (Picot *et al.*, 2010), in the present work, the high variability in fumonisins production among the isolates is consistent with the literature in other countries. (Covarelli *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2011; Ono *et al.*, 2010; Picot *et al.*, 2010; Nelson *et al.*, 1991). In the present study, there is no correlation between the production of fumonisins and the geographic area. Isolates with increased fumonisin production capacity are uniformly distributed in all Brazilian regions.

The maximum levels of total fumonisins detected in this study were lower compared to other studies (Nelson *et al.*, 1991; Rocha *et al.*, 2011). However, in the present study the period of incubation was 14 days, according to the methodology proposed by Ono *et al.* (2010) while in the work carried out by Nelson *et al.* (1991) and Rocha *et al.* (2011) the period of incubation was 30 days. It is important to note that we did not evaluate the expression levels of fumonisins production by isolates of *F. verticillioides*, but rather assess the variability in fumonisins production capacity between the isolates obtained in different Brazilian corn-growing areas.

Based on these results, it was concluded that: *F. verticillioides* is the *Fusarium* species predominantly associated with corn grain in Brazil. All 50 isolates selected for fumonisins test were able to produce fumonisins, and there was high variability in fumonisins production and no correlation was found with the geographic origin and the capacity of it is isolates to produce fumonisins. Finally, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* are infrequent pathogens in Brazilian corn.

5. REFERENCES

- Agriannual., 2013. **Anuário da Agricultura Brasileira**, São Paulo, Instituto FNP. 317p.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Estimativa de produção de grãos no Brasil – Levantamento Abril de 2013. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Accessed June, 09, 2013.
- Covarelli L., Stifano S., Beccari G., Raggi L., Lattanzio V.M.T., Albertini E., 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology* **31**: 17-24.
- Desjardins A.E., Plattner R.D., Gordon T.R., 2000. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. *Mycological Research* **104**: 865-872.
- Doi K., Uetsuka K., 2011. Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways. *International Journal of Molecular Sciences* **12**: 5213-5237.
- Ferreira D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, **35**: 1039-1042.
- Geiser D.M., Gasco M.M., Kang S., Mkalowska, L., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K., 2004. FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 473-479.
- Gelderblom W.C., Snyman S.D., Abel S., Lebepe-Mazur S., Smuts C.M., Van der Westhuizen L., Marasas W.F., Victor T.C., Knasmüller S., Huber W., 1996. Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats. A review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **392**: 279-96.
- Marasas W.F.O., Kellerman T.S., Gelderblom W.C.A., Coetzer J.A.W., Thiel, P.G., van der Lugt, J.J., 1988. Eukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **55**: 197-203.
- Ghiasian S.A., Kord-Bacheh P., Rezayat S.M., Maghsood A.H., Taherkhani H., 2004. Mycoflora of Iranian maize harvested in main population area in Iran. *Mycopathologia* **158**: 113-121.

- Giannitti F., Dia S.S., Pacin A.M., Barrandeguy M., Larrere C., Ortega J., Uza F.A., 2011. Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B1 and B2 in Argentina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **31**: 407-412.
- Harrison L.R., Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E., Cole J.R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **2**: 217-21.
- Jackson L., Jablonski J., 2004. Fumonisins. In: Magan N., Olsen M. (eds). *Mycotoxins in food*. pp. 384-422. CRC Press, Wood-head Publishing Ltd and LLC, Cambridge, England.
- Krska R., Schuhmacher R., Grasserbauer M., Lemmens M., Lemmens-Gruber R., Adler A., Lew H., 1997. Effects of beauvericin to mammalian tissue and its production by Austrian isolates of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. *Mycotoxin Research* **13**: 11-16.
- Leslie J.F., Pearson C.A., Nelson P.A., Toussoun T.A., 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* **86**: 343-350.
- Leslie J.F., Summerell B.A., Bullock S., 2006. *The Fusarium laboratory Manual*. Pp. 388. Wile-Blackwell Publishing.
- Logrieco A., Moretti A., Ritiene A., Bottalico A., Corda A., 1995. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease* **79**: 727-731.
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 597-609.
- Madania A., Altawil M., Naffaa W., Volker P.H., Hawat M., 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Syria. *Journal of Phytopathology* **1-6**. doi:10.11111/jph.12085
- Marasas W.F.O., Riley R.T., Hendricks K.A., Stevens V.L., Sadler T.W., Gelineau-van Waes J., Missmer S.A., Cabrera J., Torres O., Gelderblom W.C.A., Allegood J., Martínez C., Maddox J., Miller J.D., Starr L., Sullards M.C., Roman A.V., Voss K.A., Wang E., Merrill A.H., 2004. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human

- neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *American Society for Nutritional Sciences* **134**: 711-716.
- Mulè G., Susca A., Stea G., Moretti A., 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 495-502.
- Munkvold G.P., Desjardins A.E., 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* **81**: 556-565.
- Munkvold G.P., 2003. Epidemiology of *Fusarium* disease and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 705-713.
- Murray H.G., Thompson W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**: 4321-4325.
- Nelson P.E., Plattner R.D., Shackelford D.D., Desjardins A.E., 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2410-2412.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E., Ploetz R.C., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science* **95**: 2044-2049.
- Oliveira E., Fernandes F.T., Casela C.R., Pinto N.F.J.A., Ferreira A.S., 2004. Diagnose e controle de doenças na cultura do milho. pp. 226-267. In: Galvão J.C.C., Miranda G.V. (Eds.) *Tecnologias de produção do milho*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa.
- Ono E.Y.S., Fungaro M.H.P., Sofia S.H., Miguel T.A., Sugiura Y., Hirooka Y., 2010. *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn feed: Characterization by fumonisin production and RAPD fingerprinting. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **53**: 953-960.
- Orsi R.B., Corrêa B., Possi C.R., Schammass E.A., Nogueira J.R., Dias S.M.C., Malozzi M.A.B., 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* **36**: 75-87.
- Picot A.C., Barreau L., Pinson-Gadais D., Caron C., Lannou F., Richard-Forget L., Pinson-Gadais, Richard-Forget F., 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides* - maize environment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology* **36**: 221-231.

- Pinto N.F.J.A., Vargas E.A., Preis R.A., 2007. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. *Summa Phytopathologica* **33**: 304 - 306.
- Rahjoo V., Zad J., Javan-Nikkhah M., Gohari, A.M., Okhovvat S.M., Bihanta M.R., Razzaghian J., Klemsdal S.S., 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology* **90**: 463-468.
- Rocha L.O., Reis G.M., Silva V.N., Braghini R., Teixeira M.M.G., Corrêa B., 2011. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* **145**: 9-12.
- Summerell B.A., Salleh B., Leslie J.F., 2003. An utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* **87**: 117-128.
- Ueno Y., 2000. Risk of multi-exposure to natural toxins. *Mycotoxins* **50**: 13-22.
- Venturini G., Assante G., Vercesi A., 2011. *Fusarium verticillioides* contamination patterns in Northern Italian maize during the growing season. *Phytopathology Mediterranean* **50**: 110-120.
- Völkel I., Schröer-Merker E., Claus-Peter C., 2011 The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the european food safety legislation. *Food and Nutrition Sciences* **2**: 852-867.
- WANG E., NORRED W.P., BACON C.W., RILEY R.T., MERRIL A.H., 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 14486-14490.

ARTIGO 2

INCIDÊNCIA DE GRÃO ARDIDOS E FUMONISINAS TOTAIS EM MILHO COLHIDO TARDIAMENTE

RESUMO: O milho é uma das culturas mais propensas à contaminação por fungos toxigênicos e é altamente suscetível à acumulação de micotoxinas em grãos. As fumonisinas são uma das mais importantes micotoxinas no milho, devido à sua alta frequência e magnitude. Várias práticas de manejo para a produção de milho estão direta ou indiretamente relacionadas com o acúmulo de micotoxinas em grãos de milho. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do atraso da colheita na ocorrência de fungos patogênicos, incidência de grãos ardidos e acúmulo total de fumonisinas em grãos de milho no Brasil. Dois experimentos de campo utilizando os híbridos Ataque, BRS1035 e DKB390YG foram colhidos em 135, 150, 165, 180, 210 e 225 dias após a emergência, e os resultados mostraram que a colheita realizada tardiamente pode aumentar progressivamente a incidência de grãos ardidos e os níveis totais de fumonisinas em grãos em todos os híbridos testados. Os principais fungos toxigênicos detectados em grãos foram *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella* spp. Tanto para os grãos ardidos quanto para os assintomáticos, a infecção por *F. verticillioides* foi elevada em todas as épocas de colheita e variaram entre os híbridos de milho. O fungo *Stenocarpella* spp. foi detectado predominantemente em grãos ardidos.

PALAVRAS-CHAVE: *Fusarium*, época de colheita, micotoxinas, *Zea mays*.

KERNEL ROT INCIDENCE AND TOTAL FUMONISINS IN TROPICAL DELAYED CORN HARVEST

SUMMARY: Corn is the crop more prone to contamination with toxigenic fungi and is highly susceptible to the mycotoxins accumulation in grains. Fumonisin are one of the most important mycotoxins in maize due to its high frequency and magnitude. Several management practices for corn production are directly or indirectly related to the mycotoxins accumulation in corn grains. This study aimed to evaluate the effects of delayed harvest on the occurrence of fungal pathogens, kernel rot incidence and the total fumonisin accumulation in corn grains in a tropical climate in Brazil. Two field experiments using the hybrids Attack, BRS1035, and DKB390YG were harvested at 135, 150, 165, 180, 210 and 225 days after emergence, and the results showed that the delaying harvest progressively increase the kernel rot incidence and the total fumonisin levels in grains in all hybrids tested. The main toxigenic fungi detected in grains were *Fusarium verticillioides* and *Stenocarpella* spp. In both symptomatic and asymptomatic kernels the infection by *F. verticillioides* was high in all harvesting times and varied among maize hybrids. The fungus *Stenocarpella* spp. was detected predominantly in symptomatic kernels.

KEY-WORDS: *Fusarium*, crop time, mycotoxins, *Zea mays*.

1. INTRODUCTION

Corn kernel maturity occur approximately 55 to 60 days after tasseling, which corresponds to the stage of the highest total dry matter production, and kernels moisture content varies from 30% to 38% for most commercial hybrids. At this stage, vessels obstruction occurs, and a black layer forms at the base of the kernel that become physiologically independent from the parent plant (Ritchie *et al.*, 1993; Magalhães and Durães, 2012). However, kernel moisture is still high and the excessive dampness of green parts of plants prevents mechanical harvesting and threshing (Alves *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2009). The threshing at high moisture cause crushed kernel damages. Traditionally, the delayed harvest of mature corn is a strategy used to circumvent this problem. However, yield losses and decreases in grain quality are adverse effects associated with delayed harvest. Thus, field-drying of corn is considered a high-risk practice since the crop is subject to environmental risk factors (Bruns and Abbas, 2004) like plant lodging due to strong winds and heavy rains; premature grain sprouting on the cob due to high moisture content; diseases, and insect attack (Bruns and Abbas, 2004). In addition, field drying has been

reported as very favorable condition for the growth of toxigenic fungi, mycotoxin accumulation and poor-quality grain (Bruns and Abbas, 2004; Santin *et al.*, 2004; Kaaya *et al.*, 2005; Lauren *et al.*, 2007). Delayed harvesting of corn has been associated with a high incidence of kernel rot and aflatoxin levels in grain (Kaaya *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2009); increased levels of the mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol (Lauren *et al.*, 2007); elevated occurrence of *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cephalosporium* spp., and of some *Fusarium* species (Santin *et al.*, 2004). The yield losses due to mycotoxins have been estimated ranging between 7 to 15%, and may exceed 50%, under extreme conditions (Kaaya *et al.*, 2005).

The main mycotoxins reported to occur in corn are fumonisins, aflatoxins, zearalenone, sterigmatocystin, deoxynivalenol, nivalenol, ochratoxins and T-2 toxin (Scussel, 1998; Queiroz *et al.*, 2012). Fumonisins, produced by *Fusarium* spp., mainly *F. verticillioides* and *F. proliferatum*, are mycotoxins with higher incidence and importance in maize grains (Stack, 1998). The ingestion of food contaminated by fumonisins is linked to negative effects on animal and human health (Bush *et al.*, 2004; Blandino *et al.*, 2008). Several studies have demonstrated a strong correlation between the consumption of food contaminated by fumonisins and neural tube abnormalities and esophageal cancer in humans (Placinta *et al.*, 1999; Stack, 1998; Hermanns *et al.*, 2006). Fumonisin has been shown to cause leukoencephalomalacia in horses (Marasas *et al.*, 1988; Giannitti, *et al.*, 2011), pulmonary edema in swine (Harrison *et al.*, 1990), and hepatotoxicity in rats (Gelderblom *et al.*, 1996).

Surveys aiming the characterization of high-yielding corn production system in Brazil, found that in the South Region the average time from planting to harvest was 172 days, reaching 195 days in plantations made in July (Cruz *et al.*, 2009). In the Southeast and Midwest, the average of the period from planting to harvest was 165 days. In the Midwest region, this average rise over 190 days in plantations made in July. The delayed corn harvest in Brazil has varied from two to ten weeks depending on factors such as genotype of hybrids, acreage, weather conditions, use of harvesters, storage capacity, resource for artificial drying, and technological level of producers. (Cruz *et al.*, 2009). Based on the above considerations, the present study aimed to evaluate the effect of delayed harvest on the incidence of kernel rot and the total accumulation of fumonisins in corn kernels.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental conditions. The experiment was carried out in two seasons, from 2009/2010 to 2010/2011, at the Embrapa Milho e Sorgo in Sete Lagoas, Minas Gerais State. Three commercial hybrids were chosen for the study: Attack (Syngenta), BRS1035 (Embrapa) and DKB390YG (Dekalb). The experiments were planted in December 22, 2009 and on November 18, 2010. The treatments consisted of six different harvesting times carried out at 135, 150, 165, 180, 210 and 225 days after emergency (DAE). The hybrids and harvest times were the same on both experiments.

The experimental design was randomized blocks with treatments arranged in a 3 x 6 factorial (hybrid x harvest date), with three replications. Each experimental plot consisted of four rows of five meters long, with 0.8 m spacing between rows, and an average of five plants per meter. Fertilizer at planting consisted of applying 350 kg.ha⁻¹ formulation 8-28-16 (NPK) + Zn. The nitrogen fertilizer was applied at 30 and 45 DAE in coverage using 150 kg ha⁻¹ of urea (CH₄N₂O).

In each harvest time, the ears from the central two rows of each plot were collected, identified, and threshed separately. The moisture content of the grain mass was determined using a portable grain moisture meter, model Mini Gac Plus (Dickey-john, Minneapolis, Minnesota, USA) with resolution of 0.1% moisture. The grains yield of each plot was homogenized, and two samples of 500 g were taken out for pathological analysis and for determining the level of total fumonisins.

In both years, the meteorological variables: distribution of daily maximum and minimum temperatures (°C), the relative humidity (%), and the average rainfall (mm) were monitored.

2.2. Determination of kernels with rot symptoms and fungal species. The quantification of kernels with rot symptoms was based on visual inspection and separation of healthy kernels from those with rot symptoms. The kernel rots were weighed, and data were expressed as the percentage of the total weight of samples. Kernel-rotting fungi in grains with rot symptoms were determined by pathology tests consisting of surface disinfection of grains performed by immersion in 2% sodium hypochlorite (NaClO) for 5 min and two washes in

sterile distilled water. Afterwards, the rot grains were placed in transparent plastic boxes containing a sheet of filter paper moistened with 5% agar-water and maintained at room temperature for 24 h for stimulating the germination. The plastic boxes were transferred to freezer at -5°C for 24 h and then incubated in a moist chamber at 20°C with photoperiod of 12 h. The morphological identification and quantification of pathogens in grains were made 15 days later with the aid of a stereoscopic microscope.

2.3. Determination of total fumonisin levels in grains. Total fumonisin analysis was made by homogenizing the water content of the samples in an oven at 65 °C until constant weight. After cooling, the grains were ground into flour with a milling machine type Willey and separated by sieving through a 20-mesh sieve. Total fumonisins were extracted in methanol: water (80:20) solution and purified with FumoniTest (VICAM Inc. USA) immunoaffinity columns according to the manufacturer's instructions. All extracts were immediately used for analysis.

Fumonisin were quantified using a Vican, Series 4-EX Fluorometer™. All analyzes were performed in duplicates, and one reference sample with a known total fumonisin content (3.63 ppm +/- 1.29 ppm, Romer Labs, 003,017 BRM code, lot M10203B) was used to ensure the quality of data.

2.4. Statistical Analyses. The incidence of kernel rot (%), the level of total fumonisin (ppm), the moisture content, and the fungal incidence on corn grains (%) underwent analysis of variance (F test) using the program for statistical analyzes Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010). For the factor hybrid, means of Kernel rot, moisture, mycotoxins and means of incidence of fungi in grains, significant by F test, were compared using the Tukey test at 5% significance (P <0.05). For the factor harvest season, those averages significant by F test were submitted to linear regression analysis (P <0.05).

3. RESULTS

The variables kernels rot incidence, total content of fumonisins, incidence of fungal species (*Fusarium spp.* and *Stenocarpella spp.*) and moisture content in grains, were significant (P ≤ 0.05) for hybrid, harvesting date and year factors.

The cultivar x year interaction was statistically significant ($P \leq 0,05$) for the variables kernel rot incidence and total fumonisins content. The other interactions were not significant. Therefore, the factor hybrid was analyzed in the interaction with the year factor.

For the variable total fumonisin levels, the analyzes of the reference samples showed an average of 3.1 and 3.3 ppm for harvest years 2009/2010 and 2010/2011, respectively. Therefore, as the acceptable limit for fumonisins contamination is 3.63 +/- 1.29 ppm, these results ensure the quality of corn sample analyzes in both experiments, which were performed simultaneously. In the 2009/2010 harvest, the hybrid Attack showed the lowest incidence of kernel rot, followed by hybrids BRS1035 and DKB390YG, which differ from each other (Fig. 1).

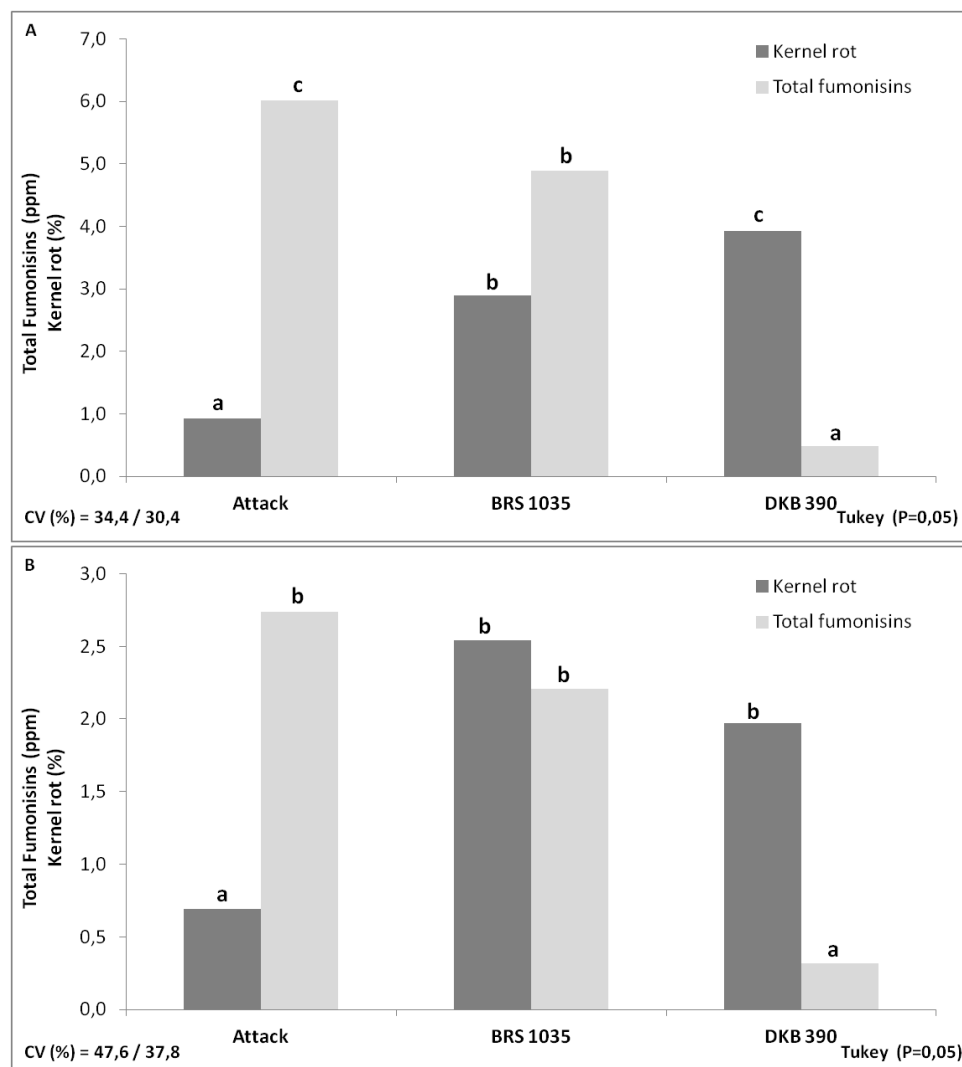


Fig. 1. Means of kernel rot incidence of and total fumonisin levels of three commercial maize hybrids in 2009/2010 (A) and 2010/2011 (B) in six different harvesting times. Means followed by the same letter do not differ by Tukey test.

However, fumonisin levels showed an inverse trend with the hybrid DKB390YG showing the lowest value of fumonisins in grains followed by the hybrids BRS1035 and Attack, respectively, which also differ statistically of each other. In the 2010/2011 harvest, the hybrids also showed the same tendency (Fig. 1). However, the hybrids BRS1035 and DKB390YG, which showed the highest values of damaged kernels, and the hybrids BRS1035 and Attack, which showed the highest values of fumonisins, did not differ from one another significantly.

The linear regression analysis between the variable harvest season and the dependent variable kernel moisture content, for two years average showed R-squared value of 0.95 (Fig. 2).

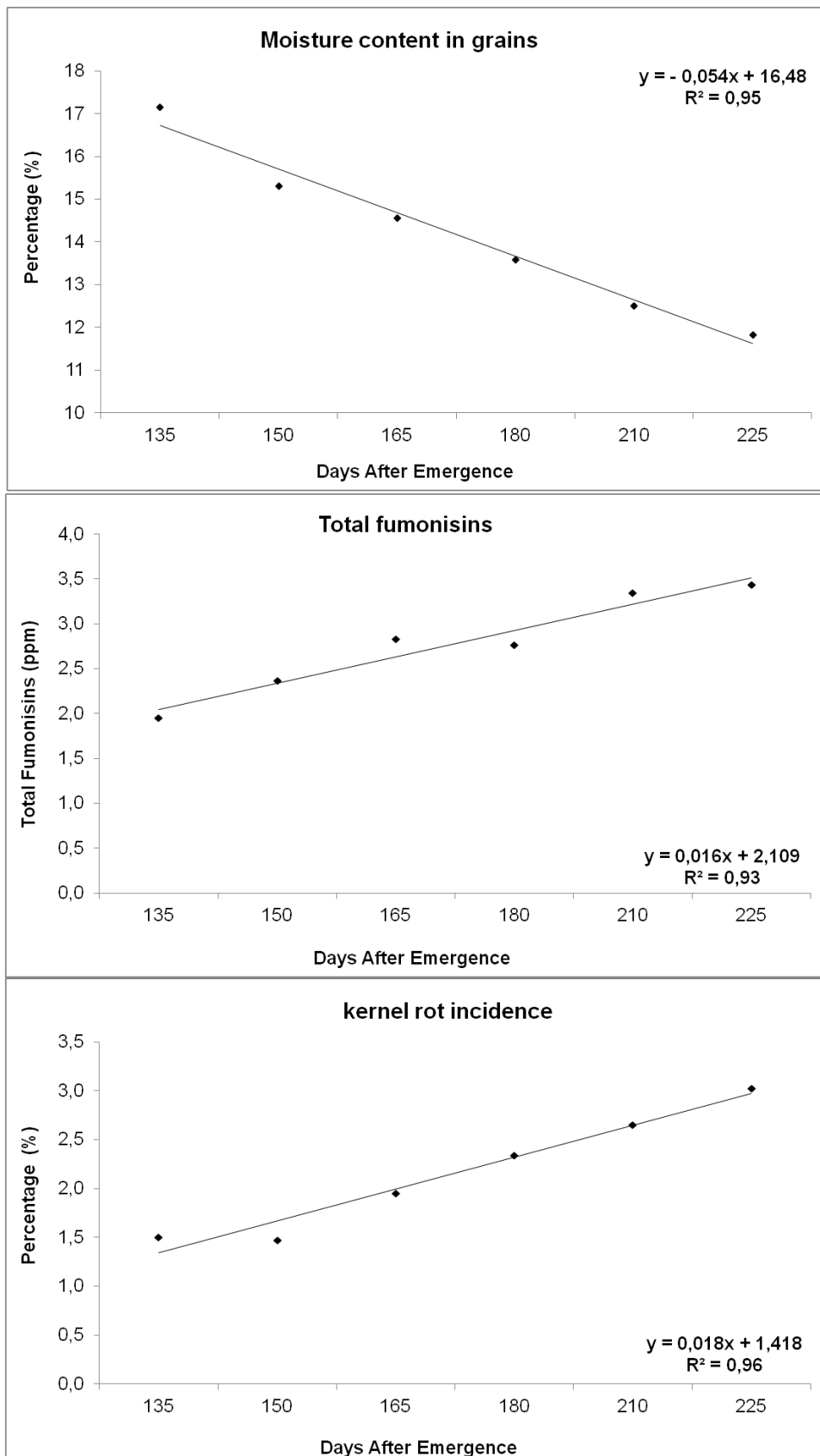


Fig. 2. Effect of delayed harvest on moisture content, fumonisins levels, and kernel rot incidence of three commercial maize hybrids harvested at different days after emergence in 2009/2010 and 2010/2011.

For kernel rot incidence, there was the same trend observed for fumonisins levels in grains. The R2 value was 0.96 and the parameter b1 of the regression equation was positive, which also indicates an increasing trend in the incidence of kernel rot due to delayed harvest (Fig. 2). The mean values ranged from 1.5 to 3.0% in harvest made at 135 and 225 DAE, respectively. In both years, the lowest incidence of *Fusarium* spp. was detected in the hybrid DKB390YG (Fig. 3), while the hybrids Attack and BRS1035 showed the highest incidence of *Fusarium* spp.

The negative value of the parameter b1 (estimated regression slope) of the linear regression, indicates a reduction in the moisture content of the grain due to delayed harvest. The average values of grain moisture varied between 17.1 and 11.82% for harvests made at 135 and 225 DAE, respectively. The linear regression analysis for total fumonisins content in function of the harvest time showed R2 value of 0.93 for the two years average. In this case, the value of b1 in the regression equation was positive indicating a trend of increased levels of fumonisins in grains with delayed harvest (Fig. 2). The average values of total fumonisins range from 1.95 to 3.44 ppm in harvest made at 135 and 225 DAE, respectively.

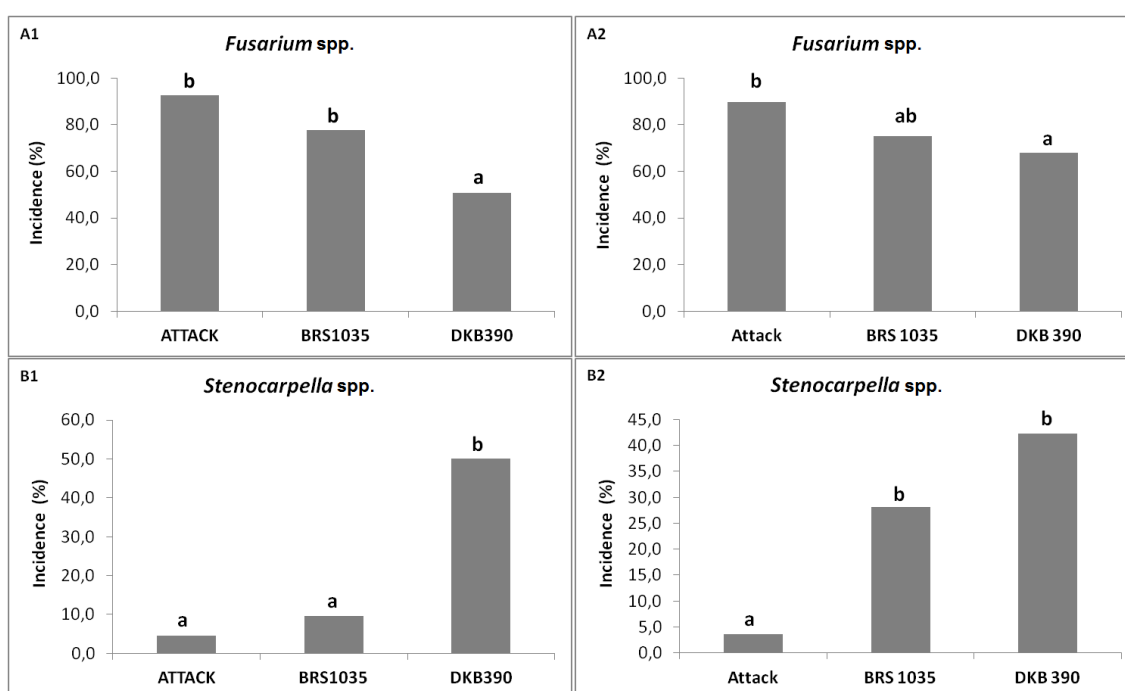


Fig. 3. Means of *Fusarium* spp. (A) and *Stenocarpella* spp. (B) incidence in three commercial maize hybrids. The numbers 1 and 2 are 2009/2010 and 2010/2011 crops, respectively. Means followed by the same letter or letters are not significantly different by Tukey test ($P \leq 0.05$).

Regarding the incidence of *Stenocarpella* spp., the hybrids showed opposite results to that observed for *Fusarium* spp. In the first experiment, the hybrids Attack and BRS1035 showed values significantly lower for the incidence of *Stenocarpella* spp. than that observed for the hybrid DKB390YG, and they did not differ statistically from each other. In the second experiment, all hybrids were different. The hybrid Attack had the lowest value for the incidence of *Stenocarpella* spp., followed by the hybrid BRS1035 together with the DKB390YG (Fig. 3).

In all harvest times the incidence of *Fusarium* spp. in the hybrid Attack was elevated, varied from 77.9 to 100% (Fig. 4). In hybrid BRS1035, the incidence of *Fusarium* spp. ranged between 72.3 and 82.8%, and the lowest incidence of this genus of fungus was detected in hybrid DKB390YG which ranged between 30.7 and 79.3%.

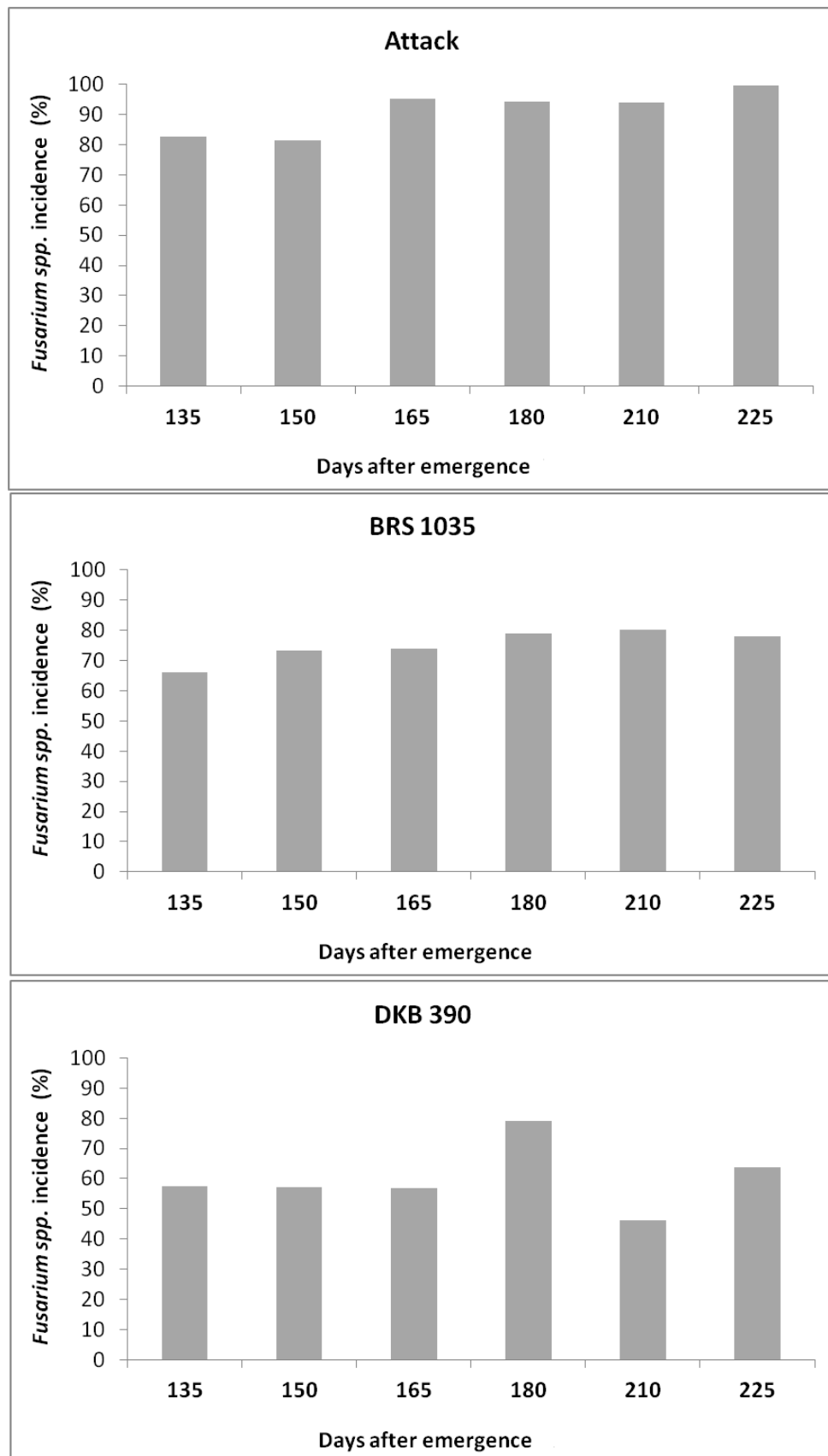


Fig. 4. Means incidence of *Fusarium spp.* incidence in maize kernel of three commercial maize hybrids, harvested at different days after emergency in field experiments in two years.

In the second experiment, performed to compare the incidence of toxigenic fungi in rot grains and visually asymptomatic grains, the incidence of *Fusarium* spp. was elevated in both rot grains and asymptomatic grains (Fig. 5). The incidence of *Stenocarpella* spp. was predominantly higher in damaged kernels and undetectable in the asymptomatic grains of BRS1035.

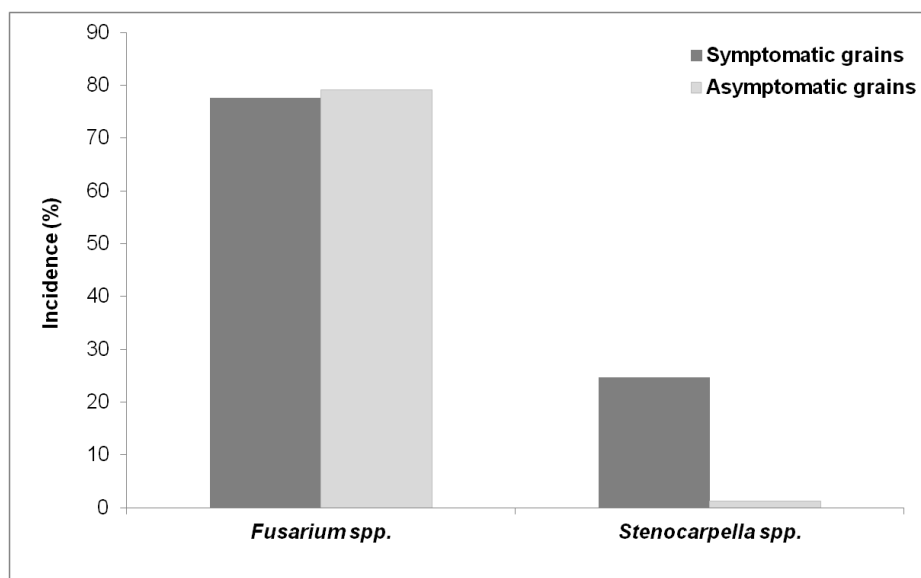


Fig. 5. Means incidence of *Fusarium* spp. and *Stenocarpella* spp. in symptomatic (rot) and asymptomatic (visually healthy) grains of three commercial maize hybrids in field experiments in 2010/2011.

The comparison between the two years showed, on average, total fumonisin levels and incidence of kernel rot significantly higher ($P \leq 0.05$) in the crop year 2009/2010 (Fig. 6). The levels of total fumonisins were 3.8 and 1.76 ppm in 2009/2010 and 2010/2011, respectively. Regarding the incidence of kernel rot, the values were 2.59 and 1.73%, in the same order in both crop years.

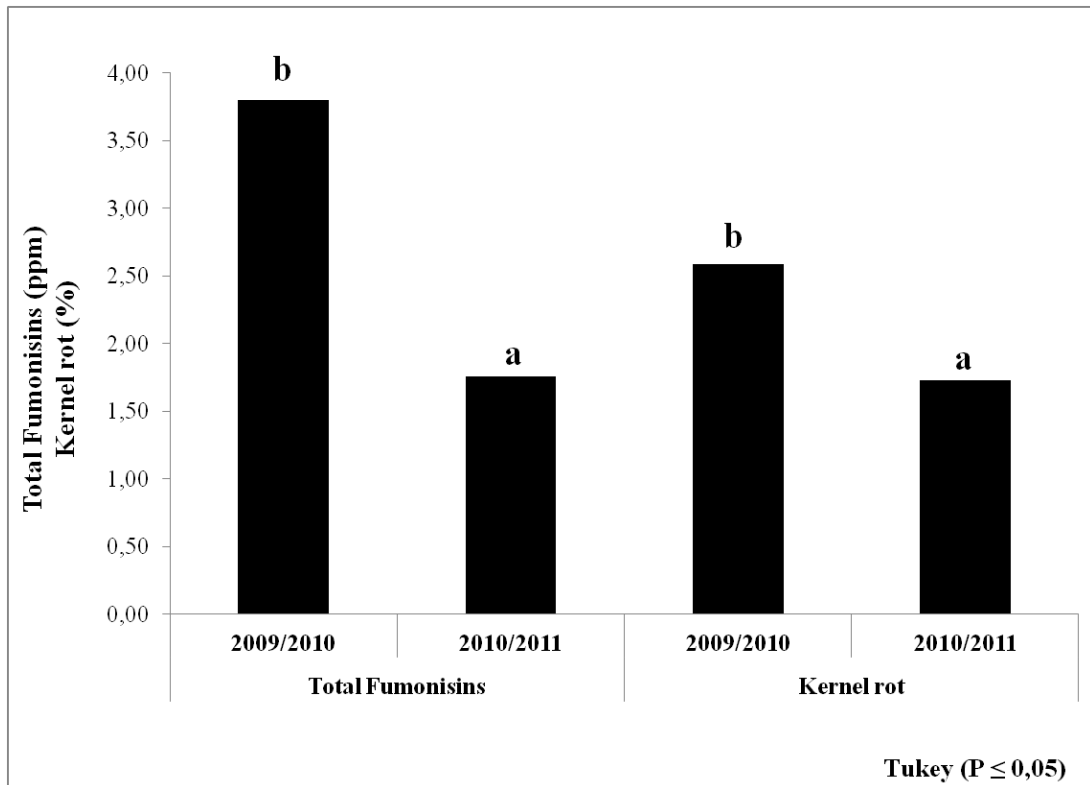


Fig. 6. Means of total fumonisins (ppm) and kernel rot (%) in six harvest dates in field experiments in 2009/2010 and 2010/2011. Means followed by different letters are significantly different by Tukey test ($P \leq 0.05$).

Data comparison of climate variables revealed that the temperature (maximum and minimum) and relative humidity behaved similarly in both years (Fig. 7). However, a striking difference between the two experiments was found for rainfall. In the crop year 2009/2010, cumulative precipitation in the period from December/2009 to July/2010 was 934.7 mm. In the same period of the crop year 2010/2011, the total accumulated rainfall was 260.9 mm, which represent a difference of 673.8 mm between both years.

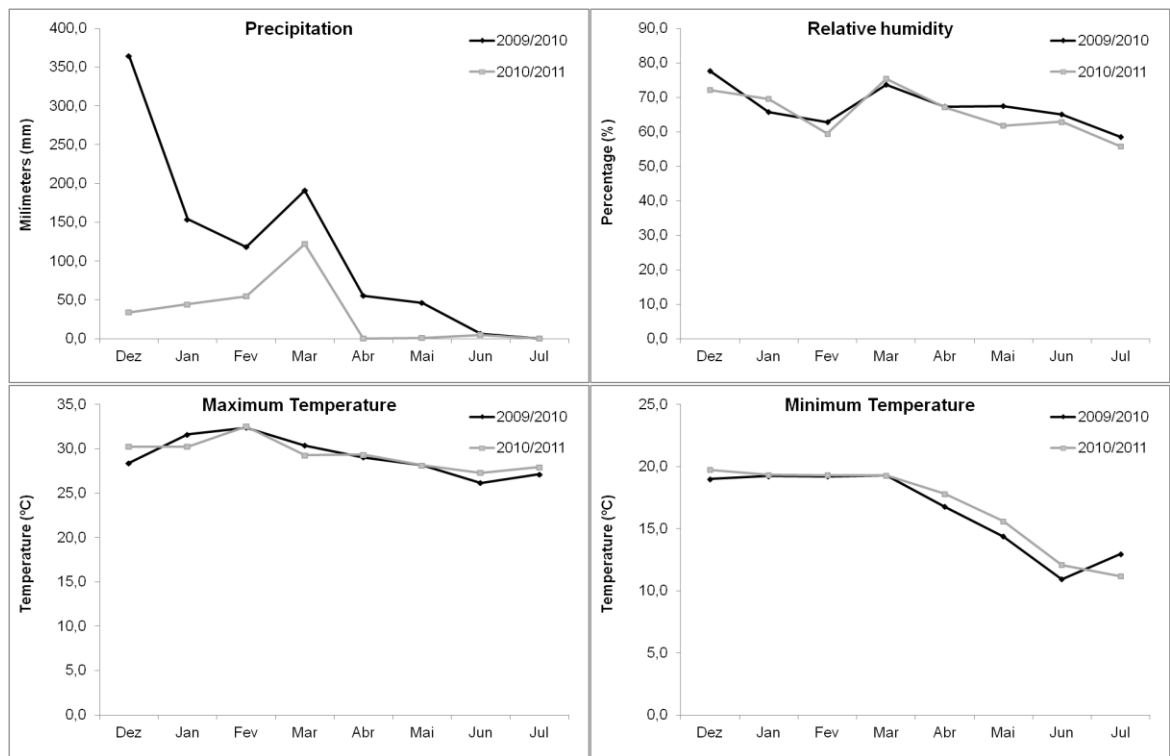


Fig. 7. Maximum and minimum rainfall (mm), relative humidity (%), and temperature (°C) in the period December/2009 to July/2010 and December/2010 to July/2011.

4. DISCUSSION

In the present study, despite differences between hybrids and harvest seasons the incidence of kernel rot in both years was low. The values not exceeded six percent, which is the maximum limit value accepted for kernel rot in batches or truckloads of corn in Brazil. However, total fumonisins exceed the 2.5 ppm upper limit set by the Ministry of Health for processed grain corn. For all hybrids, there was no correlation between the incidence of kernel rot and the fumonisins accumulation in grains. The hybrid DKB390YG, which had the highest incidence of kernel rot in both years, also showed the total fumonisins levels significantly lower than those detected in the other hybrids (Fig. 1). The high incidence of *Stenocarpella* spp. (highly correlated with kernel rot production) and the lower incidence of *Fusarium* spp. (highly correlated with fumonisins production) in DKB390YG (Fig. 3) may explain this result. The high susceptibility of DKB390YG to *Stenocarpella* spp. has been reported in other studies (Costa, 2001; Pinto, 2001; Oliveira *et al.*, 2005; Casa *et al.*, 2006). Studies by Mendes *et al.* (2011, 2012), to assess the feasibility of inoculating

maize plants growing in the field with fungal that cause ear rot reported the high susceptibility of the hybrid DKB390 to *Stenocarpella maydis* and *S. macrospora*.

The dry matter accumulation in maize grains reaches the maximum at physiological maturity when moisture content of the grains is slightly above 30% (Magalhães and Durães, 2012). However, high moisture hinders mechanical harvesting and can lead to grain damage by crushing (Alves *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2009). According Mantovani (1989), grain moisture content ranging from 18 to 26% indicates the best time to harvest corn. In the present work, the first crop was harvested at 135 DAE when the grain moisture was 17%. Thereafter, a gradual reduction in moisture content of the grains was detected, and grains moisture were 12.3 and 11.3% in the crops accomplished at 225 DAE in both years.

Leaving the crop in the field for extended time to allow grain to dry before harvesting promotes the incidence of toxigenic fungi and mycotoxin accumulation in grains (Bruns and Abbas, 2004; Santin *et al.*, 2004; Kaaya *et al.*, 2005; Lauren *et al.*, 2007). However, Santin *et al.* (2004) found that delayed harvest did not influence the kernel rot incidence, although it had resulted in an increased incidence of *Fusarium graminearum*, *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp. and *Penicillium* spp. According to these same authors, delayed harvest reduces the incidence of *F. verticillioides*. In this study, the delayed harvest resulted in a gradual increase in kernel rot incidence and in the levels of total fumonisins, in both years.

Contrary to *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. colonize and infect preferably substrates with high moisture content (Marin *et al.*, 1998). In the present work, the incidence of *Fusarium* was high in all harvesting times, even with the decrease of moisture content in grains (Fig 1, Fig 5). Considering the gradual increase of the fumonisin levels in corn grains (Fig. 1) and that *F. verticillioides* is the main producer of this mycotoxin in corn kernels, (Nelson *et al.*, 1993; Munkvold *et al.*, 1997), possibly, in the present study, this was the main *Fusarium* species in corn grains.

Lauren *et al.* (2007) found that nivalenol and deoxivalenol produced by *Fusarium* spp. increase in corn ears left to dry in the field before harvesting. They also observed that the incidence of *Fusarium* species in susceptible hybrids continued to increase, even with the reduction in the moisture content of the grains. This was also verified in the present work in the last harvest dates. It

is likely, that the reaction of resistance or susceptibility of the hybrids has a more pronounced effect on the incidence of this type of fungus than grain moisture itself. In this work, the results of total fumonisins content in corn grains due to the delayed harvest are consistent with those previously reported in the literature.

According to Kaaya *et al.* (2005), the aflatoxin contamination was initiated during physiological maturation of maize grains and increased approximately 4 and 7 times by delaying the harvest in three and four weeks, respectively. In North Carolina, grain infection by *F. verticillioides* and fumonisins accumulation in grains were detected close to the physiological maturity stage and increased until the date of harvest (Bush *et al.*, 2004). According to those authors, the earlier harvest, when the grains have approximately 25% humidity, reduces the level of fumonisins contamination.

The second experiment of this study was performed to test the pathology of both symptomatic (rot kernels) and asymptomatic grains. Species of *Fusarium* were found with high incidence in both symptomatic and asymptomatic grains (Fig. 5). In contrast, the genus *Stenocarpella* was detected almost exclusively in symptomatic grains. These results may help to explain, at least part, the high levels of fumonisins detected in the grains even the low incidence of kernel rot. Generally, the incidence of asymptomatic grains is larger than the incidence of grains with rot symptoms. Bush *et al.* (2004) found low incidence of moldy, rotten grains or discoloration of the corn grains in two years of study. However, despite the low occurrence of kernel rot, the concentration of fumonisins in grain was higher than the acceptable safe levels for grain used for consumption. There are some ways in which the *Fusarium* species can infect corn grains resulting in rotting grains or asymptomatic infections (Thomas and Buddenhagen, 1980; Headrick and Pataky, 1991; Bacon *et al.*, 1992; Munkvold *et al.*, 1997).

In the present study, the comparison between the two years showed, on average, total fumonisin levels and incidence of kernel rot significantly higher ($P \leq 0.05$) in the crop year 2009/2010 (Fig. 6). The level of total fumonisins were 3.8 and 1.76 ppm in 2009/2010 and 2010/2011 respectively. Regarding the incidence of kernel rot, the values were 2.59 and 1.73%, in the same order in both crop years.

The drought stress has been considered one of the main determinants of ear rot and fumonisins production by *F. verticillioides* in maize (Miller, 2001; Campa *et al.*, 2005; Battilani *et al.*, 2008; Maiorano *et al.*, 2009). In this study, the results did not reinforce this information.

In the two crop years, a high incidence of *Fusarium* species was detected both in symptomatic as asymptomatic grains. The levels of total fumonisins were significantly higher in the crop year 2009/2010 with high intensity of rainfall during the experiment.

Parsons and Munkvold (2010) evaluated the effect of planting date, water stress and insect attack in the incidence of ear rot and the accumulation of fumonisins produced by *Fusarium* spp. According the authors, among the factors evaluated, drought stress was the least effect on the cob rot and fumonisins in grains. There was a correlation between water stress and the increased incidence of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisins. However, the cause under the most severe drought conditions and insufficient moisture in the soil may include other stresses such as high temperatures and the occurrence of insect attacks.

The association between high temperatures and drought stress is often correlated with high growth of *F. verticillioides* resulting in greater disease severity and higher levels of fumonisins in grains (Reid *et al.*, 1999; Samapundo *et al.*, 2005). In the present study, delayed harvest resulted in a gradual increase in the incidence of kernel rot and total fumonisin levels in all three corn hybrids tested.

5. REFERENCES

- Alves W.M., Faroni L.R.A., Corrêa P.C., Queiroz D.M., Teixeira M.M., 2001. Influência dos teores de umidade de colheita na qualidade do milho (*Zea mays* L.) durante o armazenamento. *Revista Brasileira de Armazenamento* **26**: 40-45.
- Bacon C.W., Bennett R.M., Hinton D.M., Voss K.A., 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease* **76**: 144-148.
- Battilani P., Pietri A., Barbano C., Scandolara A., Bertuzzi T., Marocco A., 2008. Logistic regression modeling of cropping systems to predict fumonisins contamination in maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 10433–10438.
- Blandino M., Reyneri A., Vanara F., 2008. Effect of plant density on toxigenic fungal infection and mycotoxin contamination of maize kernels. *Field Crops Research* **106**: 234-241.
- Brooker D.B., Bakker-Arkema F.W., Hall C.W., 1992. Drying and storage of grains and oilseeds. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- Bruns H.A., Abbas H.K., 2004. Effects of harvest date on maize in the humid sub-tropical mid-south USA. *Maydica* **49**: 1–7.
- Bush B.J., Carson M.L., Cubeta M.A., Hagler W.M., Payne G.A., 2004. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology* **94**: 88-93.
- Campa R., Hooker D.C., Miller J.D., Schaafsma A.W., Hammond B.G., 2005. Modeling effects of environment, insect damage, and Bt genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines. *Mycopathologia* **159**: 539–552.
- Casa R.T., Reis E.M., Zambolim L., 2006. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. *Fitopatologia Brasileira* **31**: 427-439.
- Costa F.M.P., 2001. Severidade de *Phaeosphaeria maydis* e rendimento de grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes ambientes e doses de

- nitrogênio. Piracicaba, Brazil, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, MD thesis.
- Cruz J.C., Garcia J.C., Filho I.A.P., Luciano B.B.P., Luciano R.Q., 2009. Caracterização dos sistemas de produção de milho para altas produtividades. Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica 124. www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/660102.
- Ferreira D.F., 2010. SISVAR Sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras, Brazil, versão 5.3 (Biud 75).
- Gelderblom W.C., Snyman S.D., Abel S., Lebepe-Mazur S., Smuts C.M., Van der Westhuizen L., Marasas W.F., Victor T.C., Knasmüller S., Huber W., 1996. Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats. A review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **392**: 279-296.
- Giannitti F., Dia S.S., Pacin A.M., Barrandeguy M., Larrere C., Ortega J., Uza F.A., 2011. Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B1 and B2 in Argentina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **31**: 407-412.
- Harrison L.R., Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E., Cole J.R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **2**: 217-221.
- Headrick J.M., Pataky J.K., 1991. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* **81**: 268-274.
- Hermanns G., Pinto F.T., Kitazawa S.E., 2006. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **26**: 7-10.
- Kaaya A.N., Warren H.L., Kyamanywa S., Kyamuhangire W., 2005. The effect of delayed harvest on moisture content, insect damage, moulds and aflatoxin contamination of maize in Mayuge district of Uganda. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 2595–2599.
- Lauren D.R., Smith W.A., Di Menna M.E., 2007. Influence of harvest date and hybrid on the mycotoxin content of maize (*Zea mays*) grain grown in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **35**: 331–340.

- Maiorano A., Reyneri A., Sacco D., Magni A., Ramponi C., 2009. A dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Protection* **28**: 243–256.
- Magalhães P.C., Durães F.O.M., 2001. Ecofisiologia. In: Cruz JC,Ed.. Cultivo do milho, www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/ecofisiologia.htm.
- Mantovani E.C., 1989. A colheita mecânica do milho. In: Fundação Cargil ed., Colheita mecânica, secagem e armazenamento do milho. Campinas, Brazil, Fundação Cargil, 1-24.
- Marasas W.F.O., Kellerman T.S., Gelderblom W.C.A., Coetzer J.A.W., Thiel P.G., van der Lugt J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **55**: 197-203.
- Marin S., Sanchis V., Saenz R., Ramos A.J., Vinas I., Magan N., 1998. Environmental-factors, in-vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research* **102**: 831-837.
- Marques O.J., Vidigal-Filho P.S., Dalpasquale V.A., Scapim C.A., Pricinotto L.F., Machinski J.M., 2009. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. *Acta Scientiarum Agronomy* **31**: 667-675.
- Mendes M.C., Von Pinho R.G., Machado J.C., Albuquerque C.J.B., Falquete J.C.F., 2011. Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos fungos causadores de podridões de espigas. *Ciência e Agrotecnologia* **35**: 931-939.
- Mendes M., Pinho R., Pinho E., Faria M., 2012. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. *Ambiência* **8**: 275-292.
- Miller J.D., 2001. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environmental Health Perspectives* **109**: 321–324.
- Munkvold G.P., McGee D.C., Carlton W.M., 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* **87**: 209-217.
- Nelson P.E., Desjardins A.E., Plattner R.D., 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 233-252.

- Oliveira E., Fernandes F.T., Pinto N.F.J.A., 2005. Doenças do milho: identificação e controle. Sete Lagoas, Brazil, Embrapa Milho e Sorgo.
- Parsons M.W., Munkvold G.P., 2010. Associations of planting date, drought stress, and insects with *Fusarium* ear rot and fumonisin B1 contamination in California maize. *Food Additives and Contaminants* **27**: 591–607.
- Pinto N.F.J.A., 2001. Qualidade sanitária de grãos de milho. Sete Lagoas, Brazil, Embrapa Milho e Sorgo, Comunicado Técnico 30.
- Placinta C.M., D’Mello J.P.F., MacDonald A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science Technology* **78**: 21-37.
- Queiroz V.A.V., Alves G.L.O., Conceição R.R.P., Guimarães L.J., Mendes S.M., Ribeiro P.E.A., Costa R.V., 2012. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control* **28**: 83-86.
- Reid L.M., Nicol R.W., Ouellet T., Savard M., Miller J.D., Young J.C., Stewart D.W., Schaafsma A.W., 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* **89**: 1028–1037.
- Ritchie S.W., Hanway J.J., Benson G.O., 1993. How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service Ames, Iowa. Special Report, no. 48. In: <http://www.soilcropandmore.info/crops/Corn/How-Corn-Grows/index.htm>. (URL accessed 12/05/13).
- Roeth F.W., Elmore R.W., 2000. G1398 corn grain yield and kernel weight stability after black layer. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension. Paper 73. <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/73>. (URL accessed 12/06/13).
- Samapundo S., Devlieghere F., Meulenaer B., Debevere J., 2005. Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *Journal of food protection* **68**: 1054–1049.
- Santin J.A., Reis E.M., Matsumura A.T.S., Moraes M.G., 2004. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* **3**: 182-192.

- Scussel V.M., 1998. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis, Brazil, Editora Insular.
- Stack M.E., 1998. Analysis of fumonisin B1 and its hydrolysis product in tortillas. *Journal of AOAC International* **81**: 737-740.
- Thomas M.D., Buddenhagen I.W., 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia* **72**: 882-887.

ARTIGO 3

EFEITO DA APLICAÇÃO FOLIAR DE FUNGICIDAS NO MANEJO DE GRÃOS ARDIDOS E FUMONISINAS TOTAIS EM MILHO

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da aplicação de fungicidas na redução da incidência de patógenos fúngicos nas espigas, de grãos ardidos e das fumonisinas totais em grãos de milho. Foram conduzidos ensaios em Sete Lagoas (MG) e na empresa Círculo Verdes Assessoria Agronômica e Pesquisa em Luís Eduardo Magalhães (LEM) (BA), na safra 2010/11. Em Sete Lagoas, foi utilizado a cultivar BRS1035 submetido à aplicação dos fungicidas azoxistrobina + ciproconazole ($0,30 + 0,60 \text{ l.ha}^{-1}$), piraclostrobina + epoxiconazole ($0,75 + 0,50 \text{ l.ha}^{-1}$) e trifloxistrobina + tebuconazole ($0,60 + 0,60 \text{ l.ha}^{-1}$), em números (0, 1, 2, e 3) e dias de aplicação considerando o estágio fenológico V10 (V10; V10 e 15; V10, 15 e 30; 15 e 30; 30), com três repetições. O tratamento controle consistiu da não aplicação de fungicidas. No ensaio conduzido em LEM, o híbrido 30F53H foi tratado com quatro fungicidas e três aplicações, totalizando 12 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram da aplicação dos fungicidas picoxistrobina + ciproconazol ($0,30 + 0,60 \text{ l.ha}^{-1}$), piraclostrobina + epoxiconazole ($0,75 + 0,50 \text{ l.ha}^{-1}$), trifloxistrobina + tebuconazole ($0,60 + 0,60 \text{ l.ha}^{-1}$), azoxistrobina + ciproconazole ($0,30 + 0,60 \text{ l.ha}^{-1}$) em zero, uma (V10) e duas (V10 + 15 dias após a primeira) aplicações, com três repetições. Ao final do ciclo da cultura, foi realizada a colheita manual de espigas e após a homogeneização da massa de grãos foram retiradas duas amostra de 500 g de cada parcela. Uma amostra foi encaminhada ao laboratório de Fitopatologia da Embrapa-CNPMS, para a quantificação da incidência de grãos ardidos e a realização dos testes de patologia de sementes. Para isso, foi utilizado o método do papel de filtro com congelamento. A outra amostra foi encaminhada ao laboratório de Segurança Alimentar da Embrapa Milho e Sorgo, para quantificação dos teores de fumonisinas totais presentes nos grãos. Em ambos os ensaios, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos submetidos a zero, uma e duas aplicações com os diferentes fungicidas testados quanto à incidência de grãos ardidos e fumonisinas totais nos grãos. Quanto à incidência de fungos associados aos grãos, foi verificada diferença

significativa apenas para o fator tipo de grão (ardido e assintomático). Foi detectada elevada incidência de Fungos do gênero *Fusarium* sp. tanto em grãos ardidos quanto em grãos assintomáticos, embora tenha sido detectada presença estatisticamente superior nos grãos ardidos (sintomáticos). *Penicillium* sp. foi detectado em maior frequência em grãos assintomáticos, e *Stenocarpella* sp. esteve predominantemente associada a grãos ardidos. Não houve diferença para a incidência de *Aspergillus* sp. entre os tratamentos. Esses resultados demonstram uma baixa eficiência da aplicação de fungicidas na redução da incidência de patógenos fúngicos nas espigas, da incidência de grãos ardidos e dos teores de fumonisinas totais nos grãos.

PALAVRAS-CHAVE: Controle químico, micotoxinas, *Zea mays*.

EFFECT OF FUNGICIDES LEAF APPLICATION IN MANAGEMENT OF KERNELS ROT AND TOTAL FUMONISINS IN CORN

ABSTRACT: The objective this study was evaluate the efficiency of fungicides application to reduction the incidence fungal pathogens in the ear, kernel rot and total fumonisins in maize grains. Trials were performed at Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, state of Minas Gerais, and at Círculo Verde Assessoria Agronômica e Pesquisa, Luís Eduardo Magalhães, state of Bahia during 2010/11 season. In Sete Lagoas, the hybrid BRS1035 was treated with the fungicides azoxystrobin + cyproconazole (0.30 + 0.60 l.ha⁻¹), pyraclostrobin + epoxiconazole (0.75 + 0.50 l.ha⁻¹) and trifloxystrobin + tebuconazole (0.60 + 0.60 l.ha⁻¹) with variations in the sequence of numbers (0, 1, 2, and 3) and days of applications considering the V10 phenological stage (V10; V10 and 15; V10, 15 and 30; 15 and 30; 30) with three replicate. The control treatment consisted of no fungicide application. In trials conducted in Luiz Eduardo Magalhães the hybrid 30F53H was treated with picoxystrobin + cyproconazole (0.30 + 0.60 l.ha⁻¹), pyraclostrobin + epoxiconazole (0.75 + 0.50 l.ha⁻¹), trifloxystrobin tebuconazole + (0.60 l.ha⁻¹ + 0.60) and azoxystrobin + cyproconazole (0.30 + 0.60 l.ha⁻¹) with three applications totaling 12 treatments and four replicate. The treatments consisted of the control without fungicides, and one and two fungicides application at V10 stage, and V10 and 15, respectively with three replicate. At end of the plant cycle the ears were manual harvested and after homogenization, the grains mass of each plot was divided in two 500 g samples. One of the samples was sent to the laboratory of Plant Pathology at Embrapa Milho e Sorgo to quantify the incidence of kernel rot, and to perform the seed pathology test by the filter paper freezing method. The second sample was sent to the Food Safety laboratory at Embrapa Milho e Sorgo for quantifies the levels total fumonisins in grains. In both trials, there was no significant difference in the incidence of kernel rot and total fumonisins in grains. However, significant difference was observed for the factor type of grain (kernel rot and asymptomatic) in relation to fungal incidence. A high incidence of *Fusarium* sp. was detected in both types of grains. However, statistically, the incidence of *Fusarium* spp. was higher in the kernel rot. *Penicillium* sp. was more frequently in asymptomatic grains and *Stenocarpella* sp. was predominantly associated with kernels rot. There was no difference in the incidence of *Aspergillus* spp. in both trials. The results demonstrate the low efficiency of fungicide applications for reducing the kernel rot and the levels of total fumonisins in grains.

KEYS-WORDS: Chemical control, mycotoxins, *Zea mays*

1. INTRODUÇÃO

Na safra 2011/2012 o Brasil produziu cerca de 57 milhões de toneladas de milho, destacando-se como o terceiro maior produtor mundial. Atualmente, passou a ser não só um fornecedor de milho para o consumo interno, mas um dos principais países exportadores desse cereal no comércio internacional. Classificado como o terceiro maior exportador, o Brasil comercializa quantidades superiores a 15 milhões de toneladas para países como o Irã, Colômbia e Coreia do Sul (Agrianual, 2013).

As exigências comerciais no que se refere à qualidade dos grãos, não só destinados à exportação, mas também para o consumo interno, vem se tornando cada vez mais rígidas, principalmente aquelas voltadas à qualidade sanitária dos grãos e à presença de micotoxinas (DOU, 2011). O milho é uma cultura amplamente cultivada no Brasil, sob diversas condições climáticas, estando sujeito ao ataque de vários patógenos que afetam as espigas, causando podridões que resultam na redução da qualidade dos grãos e na produção de micotoxinas (Oliveira et al., 2004; Pereira et al., 2005). O fungo *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. é considerado o principal patógeno causador de podridões de espigas em milho, podendo estar presente tanto em grãos ardidos quanto em grãos assintomáticos. Além de ser encontrado em maior frequência nos grãos, *F. verticillioides* é a espécie que apresenta maior capacidade de produção de fumonisinas. As fumonisinas, um grupo de micotoxinas tóxicas a animais e associadas a alguns tipos de câncer em seres humanos, são consideradas as principais micotoxinas em grãos de milho (Gelderblom et al., 1988; Munkvold & Desjardins, 1997; Jackson & Jablonski, 2004). Nos últimos anos as agroindústrias têm adotado, como padrão de qualidade, o limite máximo de tolerância de 6% de grãos ardidos em lotes comerciais de milho (Menegazzo, 2001). Além disso, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, juntamente com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceu limite máximo de a de $2 \mu\text{g.g}^{-1}$ para fumonisinas em grãos de milho (DOU, 2011).

Tradicionalmente, o manejo das doenças na cultura do milho era realizado principalmente através da utilização de cultivares resistentes, associados a medidas culturais. A partir da severa epidemia de cercosporiose

(*Cercospora zea-maydis*) ocorrida na região sudoeste do estado de Goiás no ano de 2000, verificou-se um aumento acentuado da utilização de fungicidas em lavouras comerciais destinadas à produção de grãos (Costa et al., 2012). Apesar da resistência genética ser uma das principais estratégias de manejo de doenças em milho, o controle químico se apresenta na atualidade, como uma das medidas de manejo de doenças mais utilizadas pelos produtores de milho no Brasil. Em muitos casos, é a única medida eficiente e economicamente viável de garantir as altas produtividades e qualidade de produção (Kimati, 2011). No entanto, existem dúvidas sobre a efetividade dessa medida para o controle de podridões de espigas e grãos ardidos em milho (Pereira et al., 2005; Oliveira et al., 2004). Alguns trabalhos relatam eficiência de fungicidas do grupo das estrobirulinas em mistura com trazois, na redução de grãos ardidos. No entanto, outros autores, utilizando os mesmo produtos relatam ausência ou baixa eficiência no controle dessas enfermidades. Essas variações nos resultados ocorrem em relação aos diferentes fungicidas disponíveis, quanto ao número de aplicações e aos diferentes cultivares utilizadas. Esses resultados demonstram uma grande inconsistência sobre a eficiência desse método de controle sobre a incidência de grãos ardidos em milho (Juliatti et al., 2007; Duarte et al., 2009).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência de diferentes fungicidas, épocas e número de aplicações, na incidência de grãos ardidos, na redução da incidência de fungos patogênicos nos grãos e nos teores de fumonisinas totais em grãos de milho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram conduzidos ensaios no município de Luís Eduardo Magalhães (BA) e em Sete Lagoas (MG), na safra 2010/2011.

2.1. ENSAIO 1 – Luís Eduardo Magalhães/BA

Este experimento foi conduzido utilizando-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4x3 (fungicida x número de aplicação), correspondente aos fungicidas picoxistrobina + ciproconazol (0,30 + 0,60 l.ha⁻¹), piraclostrobina + epoxiconazole (0,75 + 0,50 l.ha⁻¹), trifloxistrobina + tebuconazole (0,60 + 0,60 l.ha⁻¹), azoxistrobina + ciproconazole (0,30 + 0,60 l.ha⁻¹) e três aplicações (sem aplicação, uma

aplicação na fase de 10 folhas definitivas (V10) e duas aplicações em V10 e 15 dias após a primeira), com três repetições.

Foi utilizada a cultivar 30F53H, semeada em 17/11/2010. Cada parcela foi constituída de quatro linhas de 5 m, com espaçamento de 0,8 metros entre linhas e média de 5 plantas/m. Foi mantida uma distância de 1 m entre as laterais e as extremidades de cada parcela. A adubação de plantio consistiu da aplicação de 350 kg.ha⁻¹ da formulação 8-28-16 (NPK) + Zn, e adubações de cobertura aplicadas aos 30 e 45 dias após plantio, utilizando 150 kg.ha⁻¹ de ureia (CH₄N₂O).

À calda fungicida, foi adicionado óleo mineral parafínico na proporção de 0,5% do volume de calda. As aplicações foram realizadas utilizando um pulverizador costal pressurizado a CO₂, com pressão de 4 bar e vazão constante de 300 l.ha⁻¹. A calda foi pulverizada sobre as plantas de milho, a uma altura média de 50 cm da parte superior das plantas.

2.2. ENSAIO 2 – Sete Lagoas/MG

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 3 repetições em esquema fatorial 3x6 (fungicidas x número de aplicações). Os tratamentos estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Épocas e número de aplicações para os diferentes fungicidas utilizados no ensaio 2 em Sete Lagoas - MG.

Fungicidas	Época X Número de aplicações		
	1º Aplicação	2º Aplicação	3º Aplicação
1. Azoxistrobina+Ciproconazole	-	-	-
2. Azoxistrobina+Ciproconazole	V6 a V8	-	-
3. Azoxistrobina+Ciproconazole	V6 a V8	15 dias após 1º	-
4. Azoxistrobina+Ciproconazole	V6 a V8	15 dias após 1º	15 dias após a 2º
5. Azoxistrobina+Ciproconazole	-	15 dias após 1º	-
6. Azoxistrobina+Ciproconazole	-	15 dias após 1º	15 dias após a 2º
7. Azoxistrobina+Ciproconazole	-	-	15 dias após a 2º
8. Piraclostrobina+Epoxiconazole	-	-	-
9. Piraclostrobina+Epoxiconazole	V6 a V8	-	-
10. Piraclostrobina+Epoxiconazole	V6 a V8	15 dias após 1º	-
11. Piraclostrobina+Epoxiconazole	V6 a V8	15 dias após 1º	15 dias após a 2º
12. Piraclostrobina+Epoxiconazole	-	15 dias após 1º	-
13. Piraclostrobina+Epoxiconazole	-	15 dias após 1º	15 dias após a 2º
14. Piraclostrobina+Epoxiconazole	-	-	15 dias após a 2º
15. Trifloxistrobina+Tebuconazole	-	-	-
16. Trifloxistrobina+Tebuconazole	V6 a V8	-	-
17. Trifloxistrobina+Tebuconazole	V6 a V8	15 dias após 1º	-
18. Trifloxistrobina+Tebuconazole	V6 a V8	15 dias após 1º	15 dias após a 2º
19. Trifloxistrobina+Tebuconazole	-	15 dias após 1º	-
18. Trifloxistrobina+Tebuconazole	-	15 dias após 1º	15 dias após a 2º
19. Trifloxistrobina+Tebuconazole	-	-	15 dias após a 2º

Foi utilizada a cultivar BRS1035, semeada em 17/11/2010. Cada parcela foi constituída de quatro linhas de 5 m, com espaçamento de 0,8 metros entre linhas e em média de 5 plantas/m. Foi mantida uma distância de 1 m entre as laterais e as extremidades de cada parcela. A adubação de plantio consistiu da aplicação de 350 kg.ha⁻¹ da formulação 8-28-16 +Zn (N-P-K), e adubações de cobertura aplicadas aos 30 e 45 dias após plantio, utilizando 150 kg.ha⁻¹ de ureia (CH₄N₂O).

À calda fungicida, foi adicionado óleo mineral parafínico na proporção de 0,5% do volume de calda. As aplicações foram realizadas utilizando um pulverizador costal pressurizado a CO₂, com pressão de 4 bar e vazão constante de 300 l.ha⁻¹. A calda foi pulverizada sobre as plantas de milho, a uma altura média de 50 cm da parte superior das plantas.

2.3. Avaliação dos ensaios

Ao final do ciclo da cultura, foi realizada a colheita manual de todas as espigas das duas linhas centrais de cada parcela. Após a colheita, as espigas foram debulhadas e a massa de grãos, de cada parcela, homogeneizada. A umidade da massa de grãos foi determinada utilizando um medidor de umidade portátil, modelo Mini Gac Plus (Dickey-john, Minneapolis, Minnesota, USA) com resolução de 0,1% de umidade. Após homogeneização, foram coletadas duas amostras de 500g de cada parcela. Uma amostra foi encaminhada ao Laboratório de Fitopatologia para análise da incidência de grãos ardidos, análise da incidência de fungos fitopatogênicos associados aos grãos e o peso de 1000 grãos, chamado aqui de rendimento de grãos. A outra amostra foi encaminhada ao laboratório de Segurança Alimentar, para quantificação dos teores de fumonisinas totais. Os laboratórios estão localizados na Embrapa Milho e Sorgo no Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, Minas Gerais.

2.4. Quantificação de grãos ardidos

A incidência de grãos ardidos foi obtida por meio da separação visual dos grãos assintomáticos daqueles sintomáticos (ardidos). Foram considerados como ardidos os grãos que apresentavam pelo menos 25% de sua superfície com descolorações, cujo matiz pode variar de marrom-claro a roxo ou vermelho-claro a vermelho-intenso (Pinto, 2005). Os grãos ardidos foram pesados, e os dados expressos em porcentagem do peso total da amostra.

2.5. Incidência de fungos associados aos grãos

Foi realizada a identificação e quantificação de fungos fitopatogênicos associados aos grãos ardidos e assintomáticos, separadamente. A incidência dos fungos foi obtida pelo método de incubação em substrato de papel de filtro com congelamento, denominado “Blotter Test” (Machado, 1988). Para tal análise, os grãos de cada tratamento foram separados em ardidos e assintomáticos e, de cada extrato, foram avaliados 100 grãos em quatro repetições de 25. Estes foram previamente desinfestados em hipoclorito de sódio a 2%, por 5 min e distribuídos em caixas tipo “gerbox”, contendo três folhas de papel de filtro umedecidas com agar-água 5% esterilizadas a 121°C por 30 min. As caixas foram mantidas em uma sala a temperatura ambiente

sob luz contínua durante 24 horas para estimular a germinação. Posteriormente, as caixas contendo os grãos foram incubadas em freezer a -20°C, por 24 horas, a fim de inibir a germinação e evitar a contaminação de grão a grão. Esse material foi incubado em BOD a 25°C, fotoperíodo de 12 horas, por dez dias, para o crescimento dos fungos. Ao final desse período, os grãos foram examinados, individualmente, identificados e quantificados com auxílio de microscópio estereoscópio.

2.6. Quantificação de fumonisinas

Foram quantificadas fumonisinas totais, de cada tratamento, das amostras de 500 g, obtidas no processo de homogeneização citado acima. Foi realizada a homogeneização do teor de água das amostras colocando-as em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas. Após resfriamento, as amostras foram trituradas em moinho tipo Willey e peneiradas em peneira de 20 mesh. A amostra moída foi novamente homogeneizada e coletada uma subamostra de 10g. Desta subamostra, as fumonisinas totais foram extraídas em solução de metanol:água (80:20) e purificadas em colunas de imunoafinidade FumoniTest (VICAM Inc. USA) de acordo com o manual do fabricante. Todos os extratos obtidos foram imediatamente utilizados para as análises.

Os teores de fumonisinas totais foram quantificados utilizando um fluorímetro marca VICAM, serie 4E-EX. Todas as análises foram realizadas em duplicatas e uma amostra referência, com nível de fumonisinas já conhecido, (3,6 $\mu\text{g.g}^{-1}$ +/- 1290 $\mu\text{g.g}^{-1}$, Romer Labs, 003.017 BRM code, lot M10203B) foi utilizada para garantir a qualidade dos dados.

2.7. Rendimento de grãos

O rendimento de grãos foi determinado seguindo a metodologia descrita pela RAS (Brasil, 2009) que compreende a separação e pesagem de 1000 grãos obtidos de cada tratamento. Este foi utilizado para verificar o efeito da aplicação dos fungicidas no peso dos grãos, uma vez que essa variável é altamente correlacionada com a produtividade. Além dessa informação, é possível relacionar a presença de fungos encontrados e o peso desses grãos.

2.8. Análise estatística

Os dados referentes à incidência de grãos ardidos, incidência de fungos nos grãos, teores de fumonisinas totais e rendimento de grãos, após transformados em $ARCOSEN\sqrt{x/100}$, foram submetidos a análise de variância. Quando detectada diferença significativa pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000). Para a apresentação dos resultados foram utilizados os dados sem transformação.

3. RESULTADOS

3.1. Incidência de grãos ardidos

De acordo com os resultados das análises de variância para a incidência de grãos ardidos, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) para os fatores fungicidas, número de aplicações e para a interação fungicidas x número de aplicações, em ambos os ensaios. A incidência média de grãos ardidos foi de 7,25% e 4,85% nos ensaios 1 e 2, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Quadro de análise de variância para incidência de grãos ardidos nos ensaios 1 e 2.

Ensaio 1 – Luís Eduardo Magalhães/BA						
FV*	GL	SQ	QM	Fc	P-valor	
Fungicida	4	106,84	26,71	0,86	0,49	
Número de aplicações	1	21,57	21,57	0,69	0,41	
Fungicida x Número de aplicações	4	105,16	26,29	0,85	0,51	
Bloco	3	200,27	66,75	2,16	0,11	
Erro	27	833,19	30,85			
Total	39	1267,06				
CV (%) = 76,57						
Média Geral = 7,25%			Número de observações: 40			
Ensaio 2 – Sete Lagoas/MG						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P-valor	
Fungicida	2	0,03	0,01	1,49	0,23	
Número de aplicações	6	0,19	0,03	2,54	0,08	
Fungicida x Número de aplicações	12	0,01	0,01	0,84	0,61	
Bloco	2	0,03	0,03	2,82	0,07	
Erro	40	0,01	0,01			
Total	62	0,92				
CV (%) = 59,21						
Média Geral* = 4,85%			Número de observações: 63			

*Valor não transformado.

3.2. Fungos fitopatogênicos associados aos grãos

Em ambos os ensaios, foram detectados quatro gêneros de fungos associados aos grãos: *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Stenocarpella* sp. e *Aspergillus* sp. De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa somente para o fator tipo de grão (ardido e assintomático) ($P < 0,05$). Os outros fatores, fungicida, número de aplicações, bem como a interação entre estes fatores, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$).

Embora tenha sido detectada diferença significativa quanto ao tipo de grãos, a incidência de *Fusarium* spp. foi elevada tanto nos grãos sintomáticos, quanto nos grãos assintomáticos. Os maiores valores de incidência de *Fusarium* sp. foram detectados nos grãos ardidos, em ambos os ensaios (92,46% e 73,51% respectivamente), quando comparado à sua incidência em grãos assintomáticos (85,02% e 38,87% respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3 – Incidência (%) de fungos associados aos grãos de milho nos dois ensaios.

Isolado	Ensaio 1*		Ensaio 2	
	Grão assintomático	Grão ardido	Grão assintomático	Grão ardido
<i>Fusarium</i> spp.	85,02 a	92,46 b	38,87 a	73,51 b
<i>Penicillium</i> spp.	29,11 b	12,27 a	10,09 b	4,43 a
<i>Stenocarpella</i> spp.	0,01 a	3,73 b	0,12 a	17,04 b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na horizontal, analisando os ensaios separadamente, pelo teste T a 5% de probabilidade.

Para *Penicillium* spp. foram observados maiores valores de incidência em grãos assintomáticos, em ambos os ensaios (29,11% e 10,09% respectivamente), quando comparados à incidência nos grãos ardidos (12,27% e 4,43 respectivamente). Como observado para o gênero *Fusarium* spp. a incidência de *Stenocarpella* spp. foi predominante em grãos ardidos. Praticamente não foi detectada a presença desse gênero nos grãos visualmente sadios.

Não houve diferença significativa, em ambos os ensaios, para os dados de incidência de *Aspergillus* sp. Para esse gênero, os valores médios de incidência foram de 3,58% e 0,18% para os ensaios 1 e 2 respectivamente.

3.3. Teores de fumonisinas

Não foi observada diferença significativa, para nenhum dos fatores avaliados, quanto aos teores de fumonisinas totais encontrados nos grãos nos ensaios 1 e 2 ($P > 0,05$). Os teores médios de fumonisinas totais observados nos dois ensaios foram de $7,99 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $0,94 \mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente (Figura 2). A aplicação de fungicidas, em diferentes números e épocas de aplicações, não apresentou eficiência na redução dos teores de fumonisinas totais nos grãos.

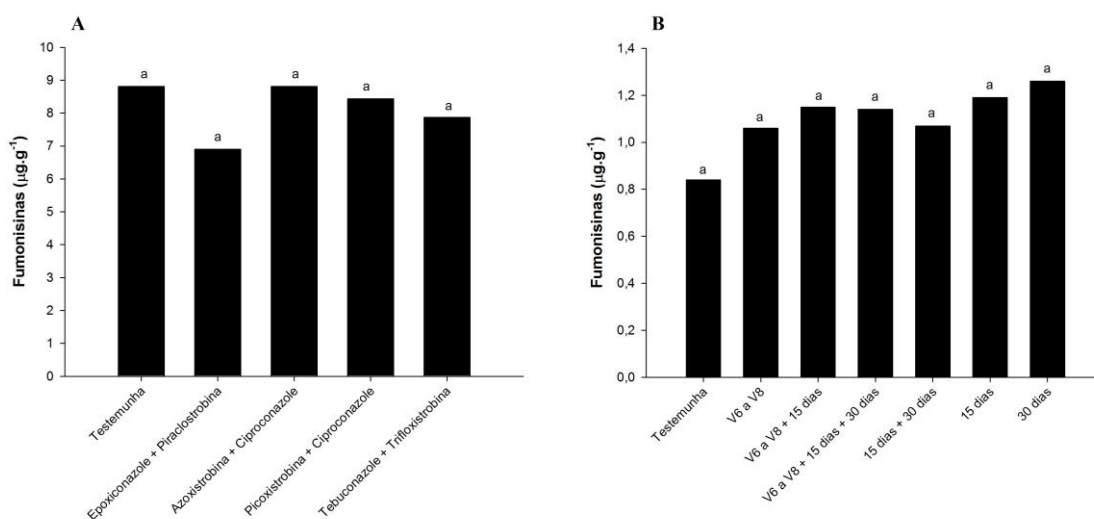


Figura 2 – Teores de fumonisinas detectados nos ensaios 1 (A) e 2 (B), para os diferentes tratamentos. (A) Aplicação de diferentes fungicidas; (B) Diferentes épocas e número de aplicações do fungicida Piraclostrobina+Epoxiconazole (0,75 l.ha⁻¹). Barras seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

3.4. Rendimento de grãos

No ensaio 1 foi detectada diferença significativa, quanto ao rendimento de grãos, para os fatores fungicidas e número de aplicações ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa quando analisada a interação entre estes fatores ($P > 0,05$). Neste mesmo ensaio, a aplicação de fungicida, independente do produto utilizado, foi significativamente diferente da testemunha (Tabela 4). Com relação ao número de aplicações, foi detectada diferença entre zero (testemunha), uma e duas aplicações, com valores médios de rendimento de grãos de 273,85g; 292,26g e 312,80g respectivamente.

Tabela 4 – Rendimento de grãos (peso de 1000 grãos) nos ensaios 1 e 2.

Fungicida	Rendimento de grãos(g)*	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Testemunha (sem aplicação)	273,85 b	315,09 a
Picoxistrobina+Ciproconazole	302,01 a	-
Trifloxistrobina+Tebuconazole	304,47 a	293,68 a
Piraclostrobina+Epoxiconazole	309,72 a	320,12 a
Azoxistrobina+Ciproconazole	322,61 a	314,40 a

*Médias seguidas de mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

No ensaio 2, não foi observada diferença significativa quanto ao rendimento, para nenhum dos fatores avaliados (fungicidas, número de aplicação ou a interação destes fatores ($P > 0,05$)) (Tabela 4).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, em ambos os ensaios, indicaram que a aplicação foliar de fungicidas, nas épocas e número de aplicações, não foi efetiva em reduzir a incidência de grãos ardidos na cultura do milho. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Nolasco et al. (2011). Segundo estes autores, a aplicação foliar de diferentes fungicidas do grupo das estrobirulinas, em mistura com triazóis, não reduziram a incidência de grãos ardidos. No entanto, Juliatti et al. (2007), utilizando os fungicidas Piraclostrobina+Epoxiconazole em duas aplicações, relatam eficiência dos produtos na redução da incidência de grãos ardidos. Neste trabalho, os autores relatam, ainda, a ineficiência dos fungicidas Azoxistrobina, hidróxido de cobre e Azoxistrobina+Ciproconazole, no controle de patógenos fúngicos presentes nos grãos. Ao contrário do que foi observado por Juliatti et al. (2007), Duarte et al. (2009) relata a eficiência na redução da incidência de grãos ardidos, quando aplicado o fungicida Azoxistrobina+Ciproconazole. Esses resultados demonstram a existência de uma grande inconsistência nos resultados referentes à eficiência da utilização de fungicidas na redução de grãos ardidos em milho. Neste trabalho, nos ensaios realizados em locais bastantes distintos quanto às condições climáticas, não foi observada eficiência da aplicação foliar de fungicidas no controle de grãos ardidos em milho.

A aplicação foliar de fungicidas também não apresentou eficiência na redução da incidência de patógenos fúngicos nos grãos. Estudos realizados por Duarte et al. (2009) corroboram parcialmente com os resultados deste estudo. A aplicação foliar de fungicidas em alguns genótipos de milho não resultou em controle da incidência de fungos. A detecção dos fungos *Fusarium* spp., *Stenocarpella* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. está de acordo com relatos que descrevem este grupo de fungos como os principais microrganismos associados a grãos de milho no Brasil (Pinto, 2001; Pinto, 2005; Ramos et al., 2010). Contudo, houve maior incidência de *Fusarium* spp. e *Stenocarpella* spp. associada a grãos ardidos. Resultados semelhantes foram encontrados por Munkvold & Desjardins (1997), que relatam *Fusarium* spp. como o fungo mais encontrado associado aos grãos, principalmente aos grãos ardidos. Porém, os mesmos autores relatam que estes fungos também podem ocorrer em alta frequência em grãos assintomáticos, como observado no

presente trabalho. Segundo Casa et al. (2006), *Stenocarpella* spp. está principalmente associado a grãos ardidos, e pode ser o principal agente de podridão de grãos na cultura do milho. Pinto (2005) e Ramos et al. (2010) também descrevem que a elevada incidência de *Fusarium* spp. e *Stenocarpella* spp. está diretamente relacionada à maior incidência de grãos ardidos. Estes autores relatam que outros fungos também podem ser observados em frequência elevada, como *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Porém, estes são observados causando maiores danos em grãos armazenados. Segundo os resultados do presente estudo, apesar da maior prevalência de *Penicillium* spp. estar relacionada a grãos assintomáticos, Pinto (2001) relata que este normalmente não está associado aos grãos de milho imediatamente após a colheita, mas pode ser um agente "apodrecedor" de espigas. Além disso, os grãos assintomáticos podem ser selecionados por não apresentarem sintomas, e transportados até o armazém, onde o fungo pode causar severos danos. A elevada incidência desse patógeno em grãos de milho é um fator preocupante, pois trata-se de um organismo produtor de uma micotoxina que está associada a câncer em seres humanos e animais, a ocratoxina (Machinski et al., 2001). *Aspergillus* spp., apresentou incidência pouco relevante nos ensaios. A baixa incidência desse fungo imediatamente após colheita tem sido relatada em outros trabalhos (Stefanello et al., 2012), entretanto, sua incidência pode variar muito de acordo com o genótipo ou condições climáticas (Ramos et al., 2010).

Os teores de fumonisinas totais também não foram alterados pela aplicação de fungicidas em ambos os experimentos. Até o presente, não foram encontrados trabalhos que discutissem o efeito de fungicidas sobre os teores de fumonisinas em experimentos de campo. No entanto, Falcão (2009) relata que o fungicida fludioxonil+metalaxil-M administrado *in vitro* em isolados de *F. verticillioides*, causa aumento na produção média de fumonisinas. Porém, para os fungicidas aqui avaliados, não foi observado efeito sobre os teores de fumonisinas totais, tanto em altos teores de fumonisinas quanto em baixos teores, como detectados para os ensaios 1 e 2 respectivamente.

As aplicações de fungicidas realizadas no ensaio 1 resultou em maior rendimento de grãos quando comparada à testemunha sem aplicação, o que não foi observado para o ensaio 2 (Tabela 3). Esse fato, provavelmente ocorreu devido à elevada severidade da ferrugem polissora (*Puccinia polysora*) observada no ensaio 1 (dados não mostrados). A aplicação dos fungicidas

promoveu redução da severidade da ferrugem com consequente aumento do peso médio de grãos das parcelas tratadas. No ensaio 2, não foi observada ocorrência severa de doenças foliares ao longo do ciclo da cultura, não sendo possível observar o efeito positivo da aplicação de fungicidas no aumento do rendimento de grãos. Esses resultados indicam que o incremento na produção na cultura do milho, decorrente da aplicação de fungicidas, ocorre de forma mais consistente em situações de elevada pressão de doenças foliares. Estes resultados corroboram com estudo realizado por Costa *et al.* (2012). Estes autores relatam que as aplicações de fungicidas, pertencentes ao grupo das estrobirulinas, apresentam elevada inconsistência em condições de baixa severidade de doenças. Segundo os mesmos autores, rendimentos positivos e benefício econômico ocorrem quando as aplicações de fungicidas são realizadas em condições de elevada pressão de doença, assim como observado no presente trabalho.

A avaliação de fungicidas foliares em milho, visando à redução dos teores de fumonisinas totais nos grãos, demonstrou uma baixa eficiência dos produtos testados, em diferentes épocas e números de aplicações. Vale ressaltar, no entanto, que não foram avaliados todos os fungicidas registrados para a cultura do milho no Brasil, bem como novas metodologias de aplicação desses fungicidas, não sendo possível extrapolar os resultados obtidos para todos os produtos ou metodologias de aplicação (Agrofit, 2013). Portanto é necessária a condução de novas pesquisas nessa direção.

Conclui-se que aplicações via foliar dos referidos fungicidas, em diferentes épocas e número de aplicações, não apresentou eficiência na redução da incidência de grãos ardidos, dos fungos fitopatogênicos associados aos grãos e nos teores de fumonisinas totais nos grãos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agriannual - **Anuário da Agricultura Brasileira**, 16 ed. São Paulo, AgraFNT. 2013.
- Agrofit – Sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. In: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acesso em: 15/07/2013.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 395p., 2009.
- Casa, R.T., Reis, E.M., Zambolim, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira** v.31, p.427-439, 2006.
- Costa, R.V.; Cota, L.V.; Silva, D.D.; Meirelles, W.F.; Lanza, F.E. Viabilidade técnica e econômica da aplicação de estrobilurinas em milho. **Tropical Plant Pathology**, v.37, p.246-254, 2012.
- DOU – Diário Oficial de União. N°37, 2011. In: <http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=72&data=22/02/2011> Acesso em : 11/07/2013.
- Duarte, R.P.; Juliatti, F.C.; Lucas, B.V.; Freitas, P.T. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicidas quanto a incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.4, p.112-122, 2009.
- Ferreira D.F., Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35: 1039-1042, 2011.
- Gelderblom, W.C.A.; Jaskiewicz, J.; Marasas, W.F.O; Thiel, P.G.; Horak, R.M.; Vleggar, R. and Kriek, N.P.J. Fumonisin-micotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moliniforme*. **Applied Environment Microbiology** v.54, pp.1806-1811, 1988.
- Jackson, L. & Jablonski, J. Fumonisin. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (eds) **Mycotoxins in food**. Abington, Cambridge, England, Wood-head Publishing Ltd and CRC Press LLC, p.384-422, 2004.
- Juliatti, F. C.; Zuza, J. L. M. F.; Souza, P. A.; Polizel, A. C. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.2, p.34-41, 2007.

- Kimati, H. Controle químico. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M. & Bergamin Filho, A. (eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 - Princípios e Conceitos. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, 704p., 2011.
- Machinski, Jr., M.; Valente Soares, L.M.; Sawazaki, E.; Bolonhezi, D.; Castro, S.L.; Bortolletto, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Jornal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.81, n.10, p.1001-1007, 2001.
- Munkvold, G.P. & Desjardins, A.E. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? **Plant Disease** v.81, n.6, p.556-565, 1997.
- Machado, J.C. Patologia de sementes: Fundamentos e aplicações. Brasília. MEC/FAEPE. 1988.
- Menegazzo, R.; Giacomini, V.; Trichez, M.A.; Lazzari, F.A. Amostragem e monitoramento de micotoxinas em matérias-primas para rações. In: Simpósio em armazenagem qualitativa de grãos no MERCOSUL, v.2, **Anais...** Londrina, PR, p.161-171, 2001.
- Nolasco, A.A.R.; Costa, R.V.; Cota, L.V.; Silva, D.D.; Costa, G.M.C.; Lanza, F.E. et al. Controle químico de grãos ardidos em milho. In: XVII Congresso Brasileiro de Sementes, Natal, 2011. In: **Informativo ABRATES**, v.21, n.2, 2011.
- Novakowski, J.H.; Sandini, I.E.; Luchetti, A.F.; Novakowski, H.; Basi, S.; Muller, T.M. Eficiência da aplicação de fungicida sobre a severidade de doenças foliares, produtividade e qualidade de grãos em diferentes híbridos de milho. In: XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo, **Anais...** Águas de Lindóia, p.635-642, 2012.
- Oliveira, E. de.; Fernandes, F.T.; Casela, C.R.; Pinto, N.F.J.A. & Ferreira, A.S. Diagnóstico e controle de doenças na cultura do milho. In: Galvão, J.C.C. & Miranda, G.V. (Eds.) **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, pg. 226-267, 2004.
- Pereira, O.A.P.; Carvalho, R.V.; e Camargo, L.E.A. Doenças do milho. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. ed. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 666p. 2005.
- Pinto, N.F.J.A. Qualidade sanitária de grãos de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo: **Comunicado Técnico n° 30**, 4p. 2001.

- Pinto, N.F.J.A. Grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo: **Circular Técnica n° 66**, 5p. 2005.
- Ramos, A.T.M.; Moraes, M.H.D.; Carvalho, R.V.; Camargo, L.E.A. Levantamento da microflora presente em grãos ardidos e sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.257-259, 2010.
- Stefanello, J.; Bachi, L.M.A.; Gavassoni, W.L.; Hirata, L.M.; Pontim, B.C.A. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.4, p.476-481, 2012.

CONCLUSÕES GERAIS

A) *Fusarium verticillioides* é a espécie do gênero predominantemente associada a grãos de milho no Brasil; todos os seus isolados foram capazes de produzir fumonisinas; verificou-se elevada variabilidade na produção de fumonisinas e não foi detectada correlação com a região geográfica de origem; *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são patógenos pouco frequentes em milho e apresentam baixa relevância para o Brasil.

B) A colheita do milho realizada tardiamente resulta em aumento gradual da incidência de grãos ardidos e teores de fumonisinas totais. Os principais fungos detectados, associados aos grãos ardidos foram *Fusarium* spp. e *Stenocarpella* spp. Em todas as épocas de colheita foi detectada alta frequência de *Fusarium* spp. tanto em grãos ardidos quanto em grãos assintomáticos. *Stenocarpella* spp. está associado predominantemente a grãos ardidos.

C) As aplicações via foliar de fungicidas com base em estrobirulinas e triazóis, não apresentaram eficiência na redução da incidência de grãos ardidos e nos teores de fumonisinas totais em grãos de milho. Os fungos detectados foram *Fusarium* spp., *Stenocarpella* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Apesar da alta frequência tanto em grãos assintomáticos quanto ardidos, *Fusarium* spp. está mais associado a grãos ardidos. *Stenocarpella* spp. está associado predominantemente a grãos ardidos. *Penicillium* spp. está associado em maior frequência a grãos assintomáticos.

REFERÊNCIAS

AGRIANUAL - *Anuário da Agricultura Brasileira*, 16 ed. São Paulo, AgraFNT. 2013.

BINDER, E.M.; TANB, L.M.; CHINB, L.J.; HANDLA, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 1, p. 265-282, 2007.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCES AND MICOTOXINS: Risks in plant, animal, and human systems [Book]. - Ames, Iowa, USA, p. 139, 2003.

DOU – Diário Oficial de União. N°37, 2011. In: <http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=72&data=22/02/2011>
Acesso em : 11/07/2013.

FIGUEIRA, E.L.Z.; COELHO, A.R.; ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. Milho: Riscos associados a contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.24, n.2, p.359-378, 2003.

JACKSON, L. & JABLONSKI, J. Fumonisin. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (eds) **Mycotoxins in food**. Abington, Cambridge, England, Wood-head Publishing Ltd and CRC Press LLC, p.384-422, 2004.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D.; SANTOS, G. T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 1., 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, p. 242-261, 2001.

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

PICOT, A., C. BARREAU, L. PINSON-GADAIS, D. CARON, C. LANNOU, F. RICHARD-FORGET, L. PINSON-GADAIS and F. RICHARD-FORGET. Factors

of the *Fusarium verticillioides* - maize environment modulating fumonisin production. **Critical Reviews in Microbiology** v.36, n.3, p. 221-231, 2010.

PINTO, N.F.J.A. Grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo: Circular técnica nº 66, 5p. 2005.

ROCHA, L.O.; REIS, G.M.; SILVA, V.N.; BRAGHINI, R.; TEIXEIRA, M.M.G. and CORREA, B. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. **International Journal of Food Microbiology** 145, pp.9-21, 2011.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology** 43, p. 141-158, 1998.

WU, F. Mycotoxins risk assessment for the purpose of setting International Regulatory Standards. **Environment Science and Technology**, v.38, n.15, pp. 4049-4055, 2004.