



IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE ESPÉCIES DE *FUSARIUM* ASSOCIADAS A GRÃOS DE MILHO NO ESTADO DO PARANÁ

*Cleilton Novais da Silva*¹; *Jéssika Angelotti*²;
*Danilo Lima das Neves*³, *Dauri José Tessmann*⁴

RESUMO: Diversas espécies de *Fusarium* afetam a cultura de milho (*Zea mays*), causando a morte de plântulas e podridões em raízes, colmos e espigas, e adicionalmente, contaminação de grãos por micotoxinas. Porém, informações sobre principais espécies de *Fusarium* associados a doenças do milho no Paraná, são escassas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar as principais espécies de *Fusarium* associados a podridões da espiga do estado do Paraná, bem como seu potencial micotoxicogênico. Para isso, 191 isolados monospóricos foram obtidos das principais regiões produtoras do estado do Paraná. As espécies foram identificadas mediante o emprego de PCR com ‘primers’ espécie-específicos. Verificou-se que a espécie predominante em todas as regiões pesquisadas foi *F. verticillioides* (88,4 % das amostras), seguida de *F. graminearum* (10,9%), e em menor frequência *F. subglutinans*. A maior parte dos isolados de *F. graminearum* (72,5%) foi originado da região Centro-Sul do Paraná. Os quimiotipos de isolados de *F. graminearum* encontrados foram nivalenol (NIV) (80,9%) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON), neste estudo não foi encontrado o tipo 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON). Todos os isolados de *F. verticillioides* foram positivos para fumonisinas.

PALAVRAS-CHAVES: PCR; Micotoxinas; Grãos ardidos.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque em relação ao milho, ocupando a terceira posição dentre os principais produtores mundiais, atrás dos Estados Unidos e China. O milho é cultivado em praticamente todo o território brasileiro, no entanto os estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, região denominada de Centro-Sul, responde por 88,5% da produção nacional. Apesar da grande importância econômica do milho no Brasil, poucos estudos encontram-se publicados sobre ocorrência de espécies de *Fusarium* associados às podridões de espigas e grãos nas diferentes regiões produtoras, bem como do seu potencial micotoxicogênico.

Estudos de ocorrência, prevalência, patogenicidade e perfil de micotoxinas de espécies de *Fusarium* que afetam o milho são importantes para o desenvolvimento de ações que possam minimizar o impacto desses fungos na produção e qualidade desse

¹ Doutoranda do curso de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. cleilton@gmail.com

² Acadêmica de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIC). jeangelotti@hotmail.com.

³ Doutorando do curso de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. danilolimaneves@hotmail.com

⁴ Orientador, Professor Doutor do Curso em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná.

djtessmann@uem.br.

cereal. Porém, a realização de estudos que envolvem a análise de grande número de isolados de *Fusarium* sofre com a limitação decorrente da dificuldade para a identificação de espécies. Nesse sentido, nos últimos anos, foram disponibilizados métodos moleculares de identificação de espécies utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), com os quais é possível superar as dificuldades apresentadas pela taxonomia tradicional deste gênero, baseada na observação de características morfo-fisiológicas das culturas. Assim, os métodos moleculares viabilizam a obtenção de novas informações sobre a ocorrência de espécies ou biótipos de *Fusarium* nos mais diversos habitats.

Diante deste contexto e visando à obtenção de mais informações sobre a ocorrência, prevalência e potencial de produção de micotoxinas de espécies de *Fusarium* que afetam a cultura de milho em regiões Paraná, este estudo teve por objetivos: (i) identificar as espécies dos isolados e determinar sua prevalência nas regiões produtoras do estado do Paraná; e (ii) tipificar os isolados de *F. graminearum* em relação à presença de genes preditivos para a síntese de micotoxinas do tipo tricoteceno [nivalenol (NIV), desoxinivalenol (DON) e suas formas acetiladas, 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON)] e isolados de *F. verticillioides* quanto a presença de genes para fumonisinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras de grãos de milho: Amostras de grãos de milho foram coletadas em lavouras de milho em 36 municípios produtores de milho no estado do Paraná. O isolamento foi realizado através do método de papel filtro com congelamento. Para isso os grãos passaram por um processo de desinfestação superficial com a imersão em álcool 70% por 1 minutos, seguido por imersão em hipoclorito de sódio 1% por 1 minutos e lavagem com água destilada por 3 vezes e dispostos em gerbox sob três folhas de papel filtro. Incubados na temperatura de 25 ° C durante 5 dias. Após período de incubação, os grãos foram examinados individualmente com auxílio de estereomicroscópio, observando a presença de estruturas do fungo *Fusarium*, de onde se obteve a cultura monospóricas.

Extração de DNA: Para extração de DNA genômico utilizou-se o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), a partir de micélio do fungo previamente cultivado em meio líquido BD (batata e dextrose). As amostras de DNA foram mantidas a – 4 °C. A qualidade do DNA das amostras foi avaliada através de corrida em gel de agarose 1%.

Identificação das espécies por PCR: Para a identificação das espécies foram utilizados 'primers' específico para *F. verticillioides* e *F. subglutinans* como descritos por Mulè et. al. (2004). Para identificação dos isolados de *F. graminearum* foi utilizado 'primers' desenvolvido por Nicholson et al. (1998). O volume total das reações foi de 25 µL contendo DNA genômico, 10X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) , 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1mM de cada 'primers'. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Tpersonal Whatman Biometra.

Identificação de genes preditos para síntese de micotoxinas: Para os isolados previamente identificados como *F. graminearum*, determinou-se três tipos de tricotecenos: NIV (nivalenol), 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON), utilizando PCR-multiplex acessando regiões dos genes *Tri3* e *Tri12*. Os conjuntos de 'primers' foram: 3CON, 3NA, 3D15A e 3D3A para *Tri3* e 12CON, 12NF,12-15F e 12-3F para *Tri12* (WARD et al., 2002). Para os isolados identificados como *F. verticillioides* foi

analisado a presença do gene precursor da síntese de fumonisina através de PCR, sendo confirmado pelo 'primers' FUM53F/FUM53R, acessando a região do gene *FUM1* (SANCHEZ-RANGEL et al., 2005). O volume total de todas as reações de amplificação foi de 25 µL contendo DNA genômico, 10X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 1mM de cada 'primers'. Todos os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2%.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram identificados 191 isolados obtidos de grãos de milho oriundos de diferentes regiões do estado do Paraná. A reação com os 'primers' VER1/VER2 permitiu a amplificação de um produto de PCR com o tamanho 580 pb (Figura 1) para *F. verticillioides*. A reação com os 'primers' SUB1/SUB2 permitiu a amplificação de um produto de PCR 630 pb (figura não mostrada). A amplificação com os primers Fg16F/Fg16R específico para o complexo *F. graminearum*, gerou fragmentos com tamanhos de 450 e 490 pb (Figura 2), concordando com o protocolo desenvolvido por Nicholson et al. (1998). Neste caso, os tamanhos de fragmentos diferentes mostram a ocorrência de duas populações dentre os isolados do complexo *F. graminearum*.

Verificou-se que a espécie predominante em todas as regiões pesquisadas foi *F. verticillioides* (88,4 % das amostras), seguida de *F. graminearum* (10,9%), e em menor frequência *F. subglutinans*. A maior parte dos isolados de *F. graminearum* (72,5%) foi originado da região Centro-Sul do Paraná (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência das espécies *F. verticillioides*, *F. graminearum* e *F. subglutinans* em diferentes regiões do Paraná.

Região	Nº de isolados	Espécie		
		<i>F. verticillioides</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. subglutinans</i>
Norte	76	76	0	0
Noroeste	58	54	4	0
Oeste	27	24	3	0
Sudoeste	16	10	5	1
Centro-Sul	14	5	9	0
Total	191	169	21	1

A amplificação com os 'primers' FUM53F/FUM53R que gerou fragmentos com 350 pb, revelou que todos isolados de *F. verticillioides* analisados foram positivos para o gene *FUM1* do cluster gênico responsável pela produção de fumonisinas (Tabela 2).

Para isolados do complexo *F. graminearum* analisou-se o potencial para síntese de tricotecenos dos grupos DON e NIV a partir dos genes *Tri3*, *Tri12* e *Tri13*. Tanto o PCR convencional, baseado na amplificação de *Tri13*, como o PCR multiplex, baseado na amplificação dos genes *Tri12* e *Tri3*, confirmaram que 88,4 % dos isolados possuíam genes para a síntese de nivalenol (NIV) e os demais 11,6 % para o tipo desoxinivalenol (DON)/15-acetildesoxinivalenol (15-ADON). Não foi encontrado o tipo 3-acetildesoxinivalenol (3-ADON) para nenhum dos isolados estudados (Tabela 2).

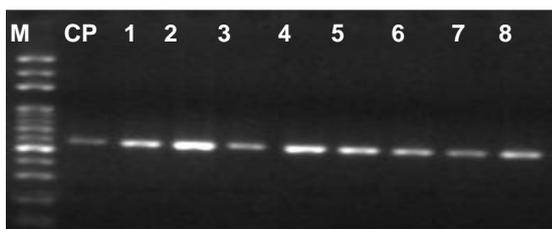


Figura 2. Produtos de PCR utilizando ‘primers’ VER1/2 para *F. verticillioides*. Em que, M, marcador 100 pb; CP, controle positivo; 1 a 8, isolados.

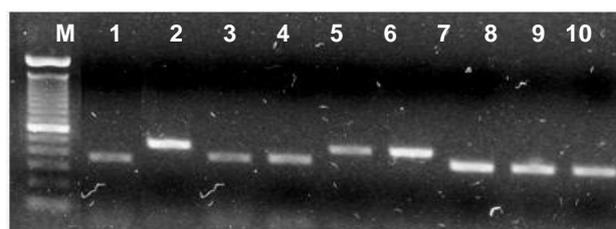


Figura 3. Produtos de PCR utilizando com ‘primers’ Fg16F/Fg16R para *F. graminearum*. Em que, M, marcador 100pb; 1 a 10 isolados.

Tabela 2. Ocorrência de micotoxinas do tipo fumonisina e de genótipos tricotecenos 15 acetildesoxinivalenol (15ADON) e nivalenol (NIV) de *F. verticillioides* e *F. graminearum*, respectivamente, em diferentes regiões do estado do Paraná.

Região	Nº de isolados de <i>verticillioides</i>	Nº de isolados positivos para <i>F. graminearum</i>	Nº de isolados de <i>F. graminearum</i>	de Tricotecenos	
				NIV	15ADON
Norte	76	76	0	0	0
Noroeste	54	54	4	4	0
Oeste	24	24	3	3	0
Sudoeste	10	10	5	5	0
Centro-Sul	05	05	9	5	4
Total	169	169	21	17	4

Este trabalho permitiu gerar informações sobre a ocorrência de espécies de *Fusarium* em milho, podendo desta forma, contribuir para implantação de estratégias de manejo e controle da doença voltado para um âmbito regional.

4. CONCLUSÃO

Dentre os 191 isolados analisados nas regiões pesquisadas *F. verticillioides* foi predominante, seguida de *F. graminearum*, e em menor frequência *F. subglutinans*. Observou-se entre os isolados de *F. graminearum* o gene precursor para tricotecenos do tipo nivalenol (NIV) e 15-acetildesoxinivalenol (15-ADON). Todos os isolados de *F. verticillioides* foram positivos para fumonisinas.

5. REFERÊNCIAS

MULÈ, G., SUSCA, A., STEA, G., MORETTI, 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**, v. 110, p. 495-502, 2004.

NICHOLSON, P., SIMPSON, D.R., WESTON, G., REZANOOR, H. N., LEES, A. K., PARRY, D. W., JOYCE, D. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 53, p. 17-37, 1998.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.