

Infecção de Grãos de Milho e Cobertura Morta por *Fusarium verticillioides* em Regiões Produtoras no Estado de São Paulo que Adotam o Sistema de Rotação de Culturas
Danielle Diniz Atayde¹, Aildson Pereira Duarte², Tatiana Alves dos Reis³, Mariana Sconza Soncin⁴, Vinícius de Moraes Barroso⁵ e Benedito Corrêa⁶

^{1,3,4,5,6}Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. ¹daniatayde@usp.br, ³tareis@usp.br, ⁴soncin.ms@gmail.com, ⁵viniciusmb@usp.br e ⁶correabe@usp.br ²Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, SP. ²aildson@apta.sp.gov.br

RESUMO – Propomos neste estudo avaliar a influência da rotação de culturas no crescimento fúngico em amostras de grãos de milho e de cobertura morta em duas regiões produtoras. O isolamento dos fungos foi realizado pelas técnicas de Semeadura Direta e Semeadura em Superfície para as amostras de milho e cobertura morta, respectivamente. Os fungos foram identificados em nível de gênero, entretanto, aqueles pertencentes ao gênero *Fusarium* estão sendo identificados até espécie. Em relação à atividade de água, nas amostras de cobertura morta a média foi de 0,57 em Palmital e 0,54 em Capão Bonito. Nas amostras de milho, a média foi 0,91 em Palmital e 0,95 em Capão Bonito. A micobiota do milho revelou maior frequência de *Fusarium* spp. nas duas regiões (68,9% - Palmital e 70,0% - Capão Bonito). Nas amostras de cobertura morta, o gênero *Fusarium* foi o mais frequente na região de Palmital (34,6%). Em Capão Bonito, os gêneros mais isolados foram *Cladosporium* (43,2%) e *Penicillium* (20,7%), seguidos por *Fusarium* (15,5%). Do total das cepas isoladas de *Fusarium* spp., 47,4% foram identificadas em nível de espécie. Dentre estas, 64,4% foram identificadas como *F. verticillioides*. A análise das cepas restantes encontra-se em andamento.

Palavras-chave: Atividade de água, Cobertura morta, *Fusarium verticillioides*, Micobiota, Milho.

Introdução

Uma das causas da baixa produtividade e da baixa qualidade dos grãos de milho está relacionada à ocorrência de doenças, aliada às condições climáticas e as práticas culturais. Entre as medidas de controle utilizadas, práticas simples, como rotação de culturas e manejo adequado da população de plantas, podem ser consideradas opções econômicas e eficientes para minimizar os danos causados por fungos patogênicos. A espécie fúngica mais comumente associada à semente de milho no Brasil é *Fusarium verticillioides* (Casa e Reis, 2003).

F. verticillioides (Syn. *F. moniliforme*) é uma espécie fúngica ubíqua, predominante em regiões tropicais e temperadas (Leslie, 1996). A colonização de plantas ou grãos por cepas desse fungo causa o apodrecimento dos substratos. Soma-se a isso a sua capacidade de produzir fumonisinas, micotoxinas resultantes do seu metabolismo secundário, capazes de acarretar perdas econômicas e danos para a saúde humana e animal (Rheeder et al., 2002). Outro fator que torna este fungo importante do ponto de vista de saúde humana e animal é a

Apoios: FAPESP; IAC; APTA; APTA Regional (Polo Regional Sudoeste Paulista - Capão Bonito e Polo Regional Médio Paranapanema – Assis).

capacidade de colonizar assintomaticamente a planta e/ou os grãos (fungo endofítico). Consequentemente, essa colonização faz com que os fungos e suas toxinas sejam processados e consumidos.

Do ponto de vista dessa problemática, a identificação de *Fusarium* spp., presentes nas amostras de milho e de cobertura morta, por meio de metodologia clássica e molecular, poderá contribuir para o conhecimento mais acurado da população deste fitopatógeno em sistema de rotação de cultura em regiões produtoras.

Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar a influência da rotação de cultura no crescimento fúngico em amostras de grãos de milho e de cobertura morta em duas regiões produtoras no Estado de São Paulo.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos em Palmital e Capão Bonito. Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso com quatro tratamentos e quatro repetições, totalizando 16 parcelas no campo (em cada região). Os tratamentos foram constituídos por sistemas de sucessão de culturas durante três ciclos/épocas, simplificados da seguinte maneira: T1: milho/trigo/milho; T2: milho/milho safrinha/milho; T3: soja/trigo/milho; T4: soja/milho safrinha/milho (Tabela 1). As sementeiras foram realizadas em outubro/2010 e outubro/2011, nas safras de verão, e nos meses de março e abril/2011, no outono-inverno, adotando o sistema de plantio direto na palha. Foi utilizado híbrido de milho transgênico Bt (2B710 HX).

As amostras de cobertura morta e grãos de milho foram submetidas à pesquisa de fungos (microbiota) e da atividade de água. Em relação às amostras de cobertura morta, uma amostra foi coletada por parcela, totalizando 16 amostras por coleta. Foram realizadas cinco coletas por região. Para a amostragem dos grãos do milho, foram coletadas três amostras por parcela. As coletas foram realizadas no final dos ciclos da cultura, após a maturidade fisiológica dos grãos. As atividades de água foram determinadas por meio do aparelho AQUALAB CX-2 (Decagon Devices Inc.). O isolamento dos fungos foi realizado pelas técnicas de Sementeira Direta (Berjak, 1984) em meio DRBC (Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol) e Sementeira em Superfície (Pitt e Hocking, 1997) em meio DG18 (Ágar Base Dicloran Glicerol Cloranfenicol) para as amostras de milho e cobertura morta, respectivamente. Os fungos foram identificados em nível de gênero, entretanto, aqueles pertencentes ao gênero *Fusarium* estão sendo identificados até espécie, utilizando métodos morfológicos clássicos (macro e micromorfológicos) e moleculares (sequenciamento parcial do

gene TEF-1•).

Resultados e Discussão

Foram realizadas a micobiota e a determinação da atividade de água (Aa) em 160 amostras de matéria morta (80 por região, divididas em cinco coletas) e 144 de milho (72 por região, divididas em duas coletas). Todas as coletas foram feitas dentro dos períodos estipulados, porém, a segunda coleta de milho (milho safrinha, safra outono-inverno/2011) foi completamente comprometida, devido a fortes chuvas e geada que atingiram as duas regiões. A fim de manter o acompanhamento das análises nas duas regiões, incluímos uma coleta de cobertura morta no período que seria realizada a coleta do milho.

Análise de cobertura morta coletada em cinco períodos distintos nas duas regiões de estudo (Palmital e Capão Bonito), revelou uma diversidade de gêneros fúngicos, a saber: *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Nigrospora*, *Neorospora*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Mucor*, além de fungos não esporulados (FNE).

Na 1ª coleta de cobertura morta, na região de Palmital, *Cladosporium* spp. destacou-se como fungo mais isolado (37,8%), seguido pelo gênero *Fusarium* (34,2%). Em Capão Bonito, *Cladosporium* spp. e FNE foram os mais isolados (65,5% e 25,6%, respectivamente), seguidos por *Fusarium* spp. (5,9%). Nas 2ª e 3ª coletas de cobertura morta, o gênero *Fusarium* predominou na região de Palmital (47,1% e 58,9%, respectivamente), porém, em Capão Bonito, *Fusarium* spp. foi o mais isolado apenas na 2ª coleta (37,3%); na 3ª coleta ficou atrás dos gêneros *Cladosporium* (36,6%) e *Penicillium* (33,0%), com 20,3%. Na 4ª coleta, na região de Palmital, os gêneros *Cladosporium* (65,2%) e *Penicillium* (19,4%) foram os mais isolados, seguidos por *Fusarium* (8,2%). Em Capão Bonito, *Fusarium* (5,9%) ficou atrás dos gêneros *Cladosporium* (82,9%) e *Trichoderma* (7,4%). Na 5ª e última coleta de cobertura morta, *Penicillium* foi o gênero fúngico mais isolado (35,4%) na região de Palmital, seguido por *Fusarium* (24,6%). Em Capão Bonito, o gênero mais isolado foi *Penicillium* (61,0%), seguido por *Aspergillus* (12,7%), *Cladosporium* (11,2%) e *Fusarium* (8,1%).

A grande frequência de *Cladosporium* spp., fungo considerado um contaminante universal, em algumas coletas de cobertura morta, pode ser atribuída a elevada a predominância do fungo no ecossistema brasileiro, principalmente no solo e no ar atmosférico (Gambale, 1998).

Em relação à atividade de água das amostras de cobertura morta, a média na região de Palmital foi de 0,79 na 1ª coleta, 0,50 na 2ª coleta, 0,65 na 3ª coleta, 0,46 na 4ª coleta e 0,48 na 5ª coleta. Em Capão Bonito a média foi de 0,49 na 1ª coleta, 0,50 na 2ª coleta, 0,75 na 3ª

coleta e 0,48 nas 4ª e 5ª coletas (Tabela 2). Os baixos níveis de atividade de água constatados nas amostras de cobertura morta, exceção feita a 1ª coleta em Palmital e na 3ª coleta de Capão Bonito (0,79 e 0,75, respectivamente), não inviabilizaram o crescimento de *Fusarium* spp. no meio de cultura DG18, recomendado para o isolamento de fungos em substrato com baixa atividade de água (Pitt e Hocking, 1997). Neste sentido, segundo Cahagnier et al. (1995), o valor mínimo de atividade de água para o crescimento de *Fusarium* spp. é de 0,87.

Uma grande variedade fúngica também foi detectada nas amostras de grãos de milho, nas duas regiões, entre eles *Fusarium*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Cladosporium* e *Neorospira*, além de fungos não esporulados (FNE). Dentre todos os gêneros fúngicos isolados, *Fusarium* spp. foi o mais frequente nas duas regiões e em todas coletas (Palmital – 68,9%; Capão Bonito – 70,0%). A atividade de água média das amostras de milho foi de 0,91 em Palmital e 0,95 em Capão Bonito (Tabela 3).

Foram isoladas e identificadas, através da metodologia clássica e molecular, as seguintes espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*, tanto nas amostras de cobertura morta quanto de grãos de milho, nas duas regiões: *F. verticillioides* (64,4%), *F. bulbicola* (10,4%), *F. graminearum* (7,3%), *F. incarnatum* (5,4%), *F. andiyazi* (4,9%), *F. semitectum* (3,7%), *F. oxysporum* (1,8%), *F. subglutinans* (1,1%), *F. poae* (0,5%) e *F. proliferatum* (0,5%). A maior presença de *Fusarium verticillioides* vem ao encontro dos achados de outros autores que apontam a citada espécie como a mais frequente no milho brasileiro (Orsi et al. 2000; Almeida et al. 2000; Almeida et al. 2002; Westhuizen et al. 2003; Rocha et al. 2009).

A predominância de *Fusarium* spp. também está de acordo com os resultados obtidos por diversos autores, que citam este fungo como principal contaminante de grãos de milho, podendo contaminar até 100% das amostras, dependendo do lote (Mills, 1989). No Brasil, trabalhos desenvolvidos também apontam este fungo, considerado endofítico, como o de maior frequência em grãos de milho recém-colhido e armazenados (Orsi et al. 2000; Almeida et al. 2002; Almeida et al., 2005, Rocha et al., 2009), porém, a frequência de isolamento deste gênero em nosso trabalho foi menor que nos trabalhos citados, provavelmente atribuído ao emprego de milho transgênico e/ou a prática da rotação de culturas, que visa reduzir o potencial de inóculo de organismos causadores de podridões radiculares e de manchas foliares (EMBRAPA, 2010).

Relacionando os diferentes tratamentos e a frequência de isolamento de *Fusarium* spp. nas amostras de cobertura morta, notamos que, na região de Palmital, o isolamento deste fungo foi maior no tratamento 2 (58,2%), tratamento no qual não houve rotação com outras

culturas, apenas milho nos três ciclos de cultivo (Tabela 2). Em Capão Bonito, este fungo foi mais frequente no tratamento 3 (23,5%), tratamento onde houve a rotação entre soja (safra verão 2010/2011), trigo (safra outono-inverno/11) e milho (safra verão 2011/2012) (Tabela 2). Nas amostras de grãos de milho, na região de Palmital, *Fusarium* spp também foi mais frequente no tratamento 2 (63,8%) (Tabela 3).

Conclusões

O gênero *Fusarium* foi o mais frequente nas duas regiões e em todas as coletas de grãos de milho. A microbiota das amostras de cobertura morta revelou que *Fusarium* spp. foi o fungo mais isolado na região de Palmital e em Capão Bonito seguido dos fungos *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp. Dentre as várias espécies de *Fusarium* spp. isoladas e identificadas, *F. verticillioides* foi a mais frequente nas amostras de cobertura morta e de grãos de milho, nas duas regiões, demonstrando-se adaptada, principalmente, ao substrato e às condições climáticas das regiões. A disponibilidade do inóculo de *F. verticillioides* apresentou-se maior no sistema monocultura, pois esses fungos sobrevivem saprofiticamente nos restos culturais.

Literatura Citada

Almeida, A.P.; Corrêa, B.; Mallozzi, M.A.B.; Sawazaki, E.; Ortega, E.M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. Brazilian Journal of Microbiology, v.31, p.321-326, 2000.

Almeida, A.P.; Fonseca, H.; Fancelli, A.L.; Direito, G.M.; Ortega, E.M.; Correa, B. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, n.13, p.3877-3882, 2002.

Almeida, A.P.; Sabino, M.; Fonseca, H.; Correa, B. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de micotoxinas. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.64, p.1-9, 2005.

Berjak, P. Report of seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability. 1980-1983. Seed Sci. & Technol., v.12, p.233-253, 1984.

Cahagnier, B.; Melcion, D.; Richard-Molard, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. Lett. Appl. Microbiol., v.20, p.247-51, 1995.

Casa, R.T.; Reis, E.M. Doenças na cultura do milho. In: Fancelli, A.L.; Dourado, D. Neto. (Ed.). Milho: estratégias de manejo e alta produtividade. Piracicaba, Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento da Produção Vegetal, 2003. p.1-18.

EMBRAPA. Rotação de culturas, 2010. In: Embrapa - Informações técnicas para Trigo e Triticale – Safra 2010. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo.pdf>. Acesso em 01 de maio de 2011.

GAMBALE, W. Fungos contaminantes. In: Zaitz, C., Campbell, I., Marques, S.A., Ruiz, L.R., Souza, V.M. (Ed.) Compendio de Micologia Medica. São Paulo: Medsi Editora Medica e Cientifica Ltda., 1998, p.113-121.

Leslie, J.F. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. In: Jackson, L.S.; De Vries, J.W.; Bullerman, L.B. (Ed.). Fumonisin in food. New York: Plenum Press, 1996, p.153-164.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. Journal of Food Protection, v.52, p.737-42, 1989.

Orsi, R.B.; Correa, B.; Pozzi, C.R.; Schammas, E.; Nogueira, J.R.; Dias, S.M.C.; Malozzi, M. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvest and stored hybrid maize. Journal of Stored Products Research, v.36, p.75-87, 2000.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. Fungi and food spoilage. 2. ed. Gaithersburg: Aspen Pub., 1997. 593p.

Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.O.; Vismer, H.F. Production of fumonisina analogs by *Fusarium* species. Appl Environml Microbiol., v.68(5), p.2101-105, 2002.

Rocha, L.O.; Nakai, V.K.; Braghini, R.; Reis, T.A.; Kobashigawa, E.; Correa, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. International Journal of Molecular Sciences, v.10, p.5090-5103, 2009.

Westhuizen, L.V.; Shephard, G.S.; Scussel, V.M.; Costa, L.L.; Vismer, H.F.; Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. Journal Agricultural and Food Chemistry, v.51, p.5574-5578, 2003.

Tabela 1. Tratamentos (T) constituídos por sistemas de sucessão de culturas durante três ciclos/épocas nas duas regiões, Palmital e Capão Bonito.

Tratamento	Safra verão	Safra outono-inverno/11	Safra verão
s	2010/2011		2011/2012
T 1	Milho	Trigo	Milho
T 2	Milho	Milho safrinha	Milho
T 3	Soja	Trigo	Milho
T 4	Soja	Milho safrinha	Milho

Tabela 2. Frequência (%) de *Fusarium* spp. e a Atividade de água (Aa) média nas amostras de Cobertura Morta coletadas em períodos distintos nas duas regiões de estudo no Estado de São Paulo, Palmital e Capão Bonito.

T*	verão 2010/2011				outono-inverno/11		verão 2011/2012			
	1ª coleta (out/10)		2ª coleta (mar/11)		3ª col. (ago/11)**		4ª coleta (out/11)		5ª coleta (fev/12)	
	P***	CB*** *	P	CB	P	CB	P	CB	P	CB
T 1	20,7	4,0	52,6	-	26,5	5,5	13,8	7,7	21,1	14,2
T 2	63,3	2,2	100	37,3	77,6	10,6	4,9	3,5	15,0	-
T 3	25,4	15,5	35,8	70,0	43,6	31,1	6,8	0,7	51,0	-
T 4	27,2	1,8	-	42,1	88,0	34,1	7,2	11,7	11,0	17,9
Aa média	0,79	0,49	0,50	0,50	0,65	0,75	0,46	0,48	0,48	0,48

* T = Tratamentos.

** Coleta de cobertura morta realizada no lugar da coleta do milho safrinha (safra outono-inverno/2011), perdida devido às chuvas e geada na região.

*** P = Palmital.

**** CB = Capão Bonito.

Tabela 3. Frequência (%) de *Fusarium* spp. e a Atividade de água (Aa) média nas amostras de grãos de milho coletadas em períodos distintos nas duas regiões de estudo no Estado de São Paulo, Palmital e Capão Bonito.

Tratamentos	Safrá verão 2010/2011		Safrá outono-inverno/11		Safrá verão 2011/2012	
	1ª coleta (fev/11)		2ª coleta* (ago/11)		3ª coleta (fev/12)	
	P**	CB***	P	CB	P	CB
T 1	40,9	46,7	Ø	Ø	76,8	81,6
T 2	46,0	37,4	Ø	Ø	81,6	88,2
T 3	Ø****	Ø	Ø	Ø	77,3	80,8
T 4	Ø	Ø	Ø	Ø	90,7	85,3
Aa média	0,90	0,94	Ø	Ø	0,92	0,96

* Coleta do milho safrinha (safra outono-inverno/2011), perdida devido às chuvas e geada na região.

** P: Palmital.

*** CB: Capão Bonito.

**** Ø: ausência de milho para coleta.