

**MICOTOXINAS, ASPECTOS QUÍMICOS E
BIOQUÍMICOS RELACIONADOS A GRÃOS ARDIDOS
EM HÍBRIDOS DE MILHO**

MARCELO CRUZ MENDES

2009

MARCELO CRUZ MENDES

**MICOTOXINAS, ASPECTOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS
RELACIONADOS A GRÃOS ARDIDOS EM HÍBRIDOS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Mendes, Marcelo Cruz

Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a
grãos ardidos em híbridos de milho / Marcelo Cruz Mendes. –
Lavras : UFLA, 2009.

106 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Renzo Garcia Von Pinho

Bibliografia.

1. Milho. 2. Grãos ardidos. 3. Severidade. 4. Micotoxinas. 5.
Lipoxigenase. 6. Sanidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1523

MARCELO CRUZ MENDES

**MICOTOXINAS, ASPECTOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS
RELACIONADOS A GRÃOS ARDIDOS EM HÍBRIDOS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2009.

Pesq. Dr. Carlos Roberto Casela	EMBRAPA/CNPMS
Pesq.Dr. Daniel Rufino Amaral	FAPEMIG
Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2009

A Deus,

LOUVO E AGRADEÇO

Aos meus pais, Marcelo Araújo Mendes e Terezinha Cruz Mendes, in memória.

Aos meus irmãos, Antônio José Mendes e Romualdo Cruz Mendes.

À minha tia e madrinha, Deniz Cruz.

A minha noiva, Kírie Lazarini.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela constante presença e amparo em toda a minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro concedido para a realização do curso.

Ao professor Renzo Garcia Von Pinho, pela amizade, disponibilidade, confiança, conhecimentos transmitidos e pela orientação profissional durante a minha formação como pesquisador.

Ao professor José da Cruz Machado, pela amizade, colaboração, pelos ensinamentos transmitidos e pela co-orientação neste trabalho.

Ao doutor Carlos Roberto Casela, pelas contribuições apresentadas e pelo exemplo de profissional transmitido.

Ao professor Mário Sobral de Abreu, bem como, ao pesquisador Daniel Rufino Amaral pela disponibilidade em participar da banca de defesa e pelas contribuições apresentadas

Aos colegas e amigos do Grupo do Milho, Andre, Carlos Juliano, José Luiz, Antonio Canedo, pela amizade e auxílio na condução dos experimentos.

Ao técnico agrícola Márcio Antônio Pereira do Carmo, pela amizade e auxílio na condução dos experimentos.

Aos colegas e amigos de república, Sancho, Noronha, João Ricardo, Junio, Rafael, Guilherme, Fabrício, Maurílio, Paulo e em especial a Márcia Helena, pelo convívio, ajuda e amizade durante esta etapa de minha vida.

Aos amigos de longos tempos, Custódio, Marco Túlio, Diguinho, João Paulo, Glícia, Marcela, Felipe, Dario, Samuel, Tony, Diogo ..., meus sinceros agradecimentos.

A Kírie, pela constante presença e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura (Setor Grandes Culturas), em especial ao Manguinha e João Pila, pela amizade, ajuda e apoio constante.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia de Sementes Cláudio, Ângela e Pepe, bem como, aos do Laboratório de Análise de Sementes Elenir, Bruna e Gabriela.

Aos meus pais (in memória), aos quais me espelho, aos meus irmãos, tios, cunhadas e sobrinhos, que sempre estiveram presentes, transmitindo confiança, carinho e fé, meu sincero reconhecimento e agradecimento.

A todos que, direta ou indiretamente, deram sua parcela de contribuição para que esta pesquisa fosse realizada.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução Geral	02
2 Referencial Teórico.....	04
3 Referências Bibliográficas.....	10
CAPÍTULO 2: Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos.....	15
1 Resumo	16
2 Ababstract	17
3 Introdução	18
4 Material e Métodos	20
4.1 Caracterização das áreas experimentais.....	20
4.2 Tratamentos avaliados e delineamento experimental	22
4.3 Obtenção, produção do inóculo e métodos de inoculação	23
4.4 Características agronômicas avaliadas.....	25
4.4.1 Porcentagem de grãos ardidos	25
4.4.2 Produtividade de grãos.....	25
4.5 Características químicas e bioquímicas avaliadas	25
4.5.1 Análise de ácidos graxos.....	26
4.5.2 Análise de proteínas resistentes ao calor	26
4.5.3 Análise eletroforética da enzima lipoxigenase	27
4.6 Análise estatística	28
5 Resultados e Discussão.....	29
5.1 Experimento de Lavras (Sistema convencional de cultivo).....	29
5.1.1 Produtividade de grãos.....	31
5.1.2 Porcentagem de grãos ardidos	34
5.1.3 Contrastes	38
5.2 Experimento de Luminárias (Sistema de Plantio Direto)	39
5.2.1 Produtividade de grãos.....	41
5.2.2 Porcentagem de grãos ardidos	42
5.2.3 Contraste.....	44
5.3 Correlação entre as características	46
5.4 Características químicas e bioquímicas	47
5.4.1 Teores de ácidos graxos.....	47
5.4.2 Proteínas resistentes ao calor (LEA).....	49
5.4.3 Atividade da lipoxigenase (LOX).....	51
6 Conclusões	53

7 Referências Bibliográficas.....	54
CAPÍTULO 3: Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos fungos causadores de podridões de espiga	58
1 Resumo	59
2 Abstract	60
3 Introdução	61
4 Material e Métodos	62
4.1 Caracterização das áreas experimentais a campo	62
4.2 Tratamentos e delineamento experimental a campo	62
4.3 Obtenção, produção do inóculo e métodos de inoculação.	63
4.4 Avaliação da qualidade sanitária de grãos	63
4.5 Análise estatística	64
5 Resultados e Discussão	65
5.1 Experimento de Lavras (Sistema convencional de cultivo).....	65
5.1.1 Severidade do fungo <i>F. verticilioides</i>	66
5.1.2 Incidência dos fungos <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i>	68
5.2 Experimento de Luminárias (Sistema de Plantio Direto)	70
5.2.1 Severidade do fungo <i>F. verticilioides</i>	72
5.2.2 Incidência dos fungos <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i>	74
6 Conclusões	76
7 Referências Bibliográficas	77
CAPÍTULO 4: Qualidade grãos e produção de fumonisina em híbridos de milho inoculados com <i>fusarium verticilioides</i> em diferentes sistemas de manejo.....	79
1 Resumo	80
2 Abstract	81
3 Introdução	82
4 Material e Métodos	84
4.1 Caracterização das áreas experimentais a campo	84
4.2 Tratamentos e delineamento experimental a campo	84
4.3 Obtenção, produção do inóculo e métodos de inoculação.	84
4.4 Determinação de fumonisinas	85
4.5 Análise estatística	86
5 Resultados e Discussão	86
5.1 Sistema convencional	86
5.1.1 Teores de fumonisina B1 e B2	87
5.2 Sistema plantio direto	89
5.2.1 Teores de fumonisina B1 e B2	90
5.3 Correlação entre características	92
6 Conclusões	94
7 Referências Bibliográficas	95
ANEXOS	98
PROTOCOLOS	105

RESUMO

MENDES, Marcelo Cruz. **Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a grãos ardidos em híbridos de milho** 2009. 106p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Esta pesquisa foi realizada durante as safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08 em dois sistemas de cultivo, convencional e plantio direto, na região do Sul de Minas Gerais, visando obter informações sobre a resistência de híbridos de milho ao complexo de fungos causadores de podridão de grãos. No primeiro trabalho foram avaliados híbridos de milho oriundos de empresas sementeiras do Brasil, com e sem a inoculação dos fungos *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, sendo verificado também, a associação de parâmetros químicos e bioquímicos, que poderiam estar diretamente relacionados à resistência à estes fungos. A produtividade de grãos e a porcentagem de grãos ardidos foram influenciadas pelo tipo de híbrido, pelas safras agrícolas e pelas inoculações artificiais, sendo mais pronunciada no sistema de plantio direto. Não houve associação entre a produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos o que evidenciou que as perdas provocadas pela incidência de grãos ardidos em milho não são de caráter quantitativo. Observaram-se também diferenças nos teores de ácidos graxos linoléico entre os grupos de híbridos estudados, sendo maiores os valores obtidos no grupo de híbridos considerados resistente ao complexo “grãos ardidos”. Com base na concentração de frações de proteínas resistentes ao calor foi possível verificar bandas específicas presentes nos híbridos considerados resistentes aos fungos causadores do complexo grãos ardidos, mais especificamente de peso molecular de 50kDa. Com base nos perfis eletroforéticos para a enzima lipoxigenase foi observado uma maior intensidade de bandas para os híbridos resistentes aos fungos causadores de grãos ardidos em milho. O segundo trabalho avaliou por meio do teste de sanidade “blotter test” a severidade do fungo *Fusarium verticillioides* e a incidência dos fungos *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em grãos de híbridos comerciais, com e sem a inoculação artificial a campo. A avaliação pelo teste de sanidade “blotter test” permitiu detectar diferenças entre híbridos quanto a reação aos fungos *F.verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*. Constatou-se também, influência do híbrido, da safra agrícola e do sistema de cultivo sobre a infecção dos fungos causadores de podridões de espigas. Ficou evidenciado o efeito da inoculação artificial, em campo, visando a obtenção de genótipos resistentes aos fungos causadores do “complexo de grãos ardidos”. No terceiro trabalho foram avaliados os teores de fumonisina B1 e B2 em grãos de híbridos de milho, com e sem inoculação do fungo *Fusarium verticillioides*, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de plantio

direto e em dois anos agrícolas. A inoculação artificial a campo, com o fungo *Fusarium verticillioides*, favoreceu o aumento da produção de fumonisinas B1 e B2 em grãos de milho, sendo influenciada pela safra agrícola, independentemente do sistema de cultivo. Detectou-se correlação positiva e significativa, porém de baixa magnitude, entre a porcentagem de grãos ardidos e os teores de fumonisinas, evidenciando a necessidade da utilização de testes laboratoriais para determinar os níveis desta micotoxina em grãos de milho. Houve correlação entre a porcentagem de grãos ardidos e o teste de sanidade “blotter test”, embora significativa, esta foi de baixa magnitude, isto evidencia, a necessidade de realização do teste de sanidade, visando identificar e selecionar híbridos mais resistentes ao ataque do fungo *Fusarium verticillioides*.

*Comitê de orientação: Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho – UFLA (Orientador)
e Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-orientador)

ABSTRACT

MENDES, Marcelo Cruz. **Micotoxins, chemical and biochemical aspects associated with rotten grains in corn hybrids.** 2009. 106p. Thesis (Doctorate in Plant Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

This research was carried out 2006/07 and 2007/08 crop seasons under conventional and direct planting systems, in Southern Minas Gerais State, Brazil, to study corn hybrids resistance to grain rot causing fungi. In a first work, corn hybrids were obtained from seed companies in Brazil, with and without inoculation by *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis*, and *Stenocarpella macrospora*. Chemical and biochemical aspects, associated with tolerance to the fungi were also studied. Grain yield and the percentage of rotten grains were influenced by hybrid type, by crop season, and by artificial inoculations, being more pronounced in the direct planting system. There was no association between grain yield and percentage of rotten grains, which indicates that losses caused by incidence of corn grain rot are not a quantitative character. Linoleic acid levels among hybrid groups were also studied and this level was higher in grain rot tolerant hybrid group. Based on the concentration of heat resistant protein fractions, it was possible to verify the presence of specific bands in the grain rot tolerant hybrids, more specifically in those of a molecular weight of 50kDa. Electrophoresis profiles for the enzyme lipoxygenase, higher band intensity was observed for the tolerant hybrid to the corn grain rot complex causing fungi. A second work was established to evaluate, through the sanitary test “blotter test”, the severity of *Fusarium verticillioides* and the incidence of *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* in commercial hybrid grains, with and without in-field artificial inoculation. The evaluation by the sanitary test “blotter test” allowed to detect differences among hybrids by reactions to *F. verticillioides*, *S. maydis*, and *S. macrospora* fungi. Effects of hybrids, crop season, and cultivation systems on infection by the grain rot causing fungi were also verified. Direct planting system increased fungi infection responsible for the corn grain rot. The effect of artificial inoculation was observed, in-field, to obtain genotypes resistant to the fungi. In a third work fumonisin B1 and B2 levels in grain of corn hybrids were appraised, with and without inoculation by *Fusarium verticillioides*, under conventional and direct planting systems and in two crop seasons. The in field artificial inoculation, with *Fusarium verticillioides*, favored the increase of fumonisin B1 and B2 production in corn grains, being influenced by the crop season, independently of the cultivation system. Positive and significant correlation was detected, although of low magnitude, between the percentage of rotten grains and the fumonisin levels, indicating the use laboratory tests to determine levels of this mycotoxin in corn grains. There was a significantly low correlation between

percentage of rot²ten grains and the sanitary test, “blotter test”, indicating the need of this test, to identify and select hybrids more resistant to *Fusarium verticillioides* fungus infection.

* Advising Committee: Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho – UFLA (Advisor) and Prof^a. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho – UFLA (Co-advisor)

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

A região Sul de Minas Gerais é considerada uma das mesorregiões que mais evoluiu na participação da produção mineira e também em produtividade de milho. A área plantada com milho é de aproximadamente 300.000 ha e este cereal é um dos mais importantes, devido a grande demanda e ótima alternativa para integração agricultura x pecuária, além do bom conhecimento da exploração por parte dos produtores.

As áreas de cultivo de milho na região Sul de Minas Gerais são caracterizadas por um relevo montanhoso, com altitude geralmente acima de 800m. A maioria das áreas de cultivo é realizada sob o sistema convencional de cultivo mas nos últimos anos tem sido observado, aumento nas áreas de cultivo de milho sob plantio direto. Esse aumento de área associado à falta de rotação de culturas, ao monocultivo de milho e as condições climáticas favoráveis, tem propiciado o aparecimento de varias doenças, destacando as podridões de grãos e espigas, que provocam o aparecimento de “grãos ardidos”. Nas duas últimas safras agrícolas a incidência dessas doenças foi significativa, provocando redução na produção e perdas na qualidade do produto, em vários locais da região.

Os fungos mais frequentemente detectados e associados ao “complexo grão ardido” são *Fusarium verticillioides*, *Gibberella zeae*, *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora*. Vale ressaltar que nesta região não existe nenhum estudo mais detalhado sobre essas doenças. De maneira geral existe escassez de informações, no Brasil, referente ao patossistema milho/fungos causadores de podridões de grãos e espigas.

No processo de infecção dos grãos, muitas espécies de fungos podem, além dos danos físicos, produzirem substâncias tóxicas denominadas de micotoxinas. Estas por sua vez, são metabólitos secundários capazes de produzir

efeitos tóxicos agudos ou crônicos tanto em animais quanto em humanos. O *Fusarium verticillioides* é um dos principais fungos produtores dessas micotoxinas, sendo a fumonisina B₁ produzida em maior quantidade. Porém, muito pouco tem sido pesquisado a respeito da quantificação dessas micotoxinas em cultivares de milho disponíveis no mercado. É importante ressaltar ainda que a presença de micotoxinas em grãos tem restringido a comercialização de milho na região.

Estudos recentes a respeito da associação de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido linoléico e linolênico, na biossíntese de compostos regulatórios que induzem a resistência a fungos, tem chamado a atenção de pesquisadores. Porém é importante enfatizar que há necessidade de estudos nos quais sejam associados a presença desses compostos com a atividade de enzimas, como a lipoxigenases. Esses estudos serão de grande valia para o entendimento da resistência de híbridos de milho aos fungos causadores de grãos ardidos.

Desta forma, devido a importância para a região e para o Brasil e devido a escassez de informações que visam elucidar os mecanismos de resistência dos híbridos a essas doenças, foram realizadas pesquisas com os seguintes objetivos:

- a) Avaliar híbridos comerciais de milho oriundos de empresas sementeiras do Brasil, inoculados com os fungos *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de semeadura direta e em dois anos agrícolas e verificar a associação da resistência de híbridos a esses fungos com parâmetros químicos e bioquímicos.
- b) Avaliar a severidade do fungo *Fusarium verticillioides* e a incidência dos fungos *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em grãos de milho, oriundos de híbridos comerciais, com e sem a inoculação

artificial a campo, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de semeadura direta e em dois anos agrícolas.

- c) Avaliar a porcentagem de grãos ardidos, a incidência pelo método de “blotter test” e quantificar os teores de fumonisina B1 e B2 em híbridos de milho, com e sem inoculação do fungo *Fusarium verticillioides*, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de plantio direto e em dois anos agrícolas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Um dos entraves na exportação e na cotação de preços é a qualidade dos grãos produzidos. No Brasil, é muito comum a ocorrência de grãos ardidos causados por fungos dos gêneros *Fusarium verticillioides*, *Penicillium spp*, *Aspergillus flavus*, *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*, entre outros. Estes fungos atuam de forma deletéria na qualidade dos grãos e são aceitáveis os valores máximos de 2% de grãos ardidos para a exportação e de 6% para a comercialização no mercado interno (Menegazzo, 2001).

Dentre as características morfológicas e taxonômicas destes fungos o *Fusarium verticillioides* produz dois tipos de conídios: macroconídios curvos nas extremidades com 3 a 7 septos, medindo de 2,4-4,9 x 15-60 µm e microconídios asseptados medem 2-3 x 5-12 µm e são produzidos em cadeias ou falsas cabeças (agregados goticulares) sobre conidióforos ramificados a partir da hifa, isolados ou agregados em esporodóquias. Enquanto que as *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* apresentam picnídios subepidérmicos, globulosos ou alongados, com coloração marrom-escuras a preta, paredes grossas, diâmetro de 150 a 300 µm e um ostíolo protuberante papilado. Os conídios são pardo-oliva apicados, cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, medindo 15 a 34 x 5 a 8 µm, bicelulados, comumente com 1 septo,

sendo a *S. macrospora* com conídios duas a três vezes maior que a *S. maydis* (Sutton & Waterston, 1966; Sutton, 1980).

A incidência desses fungos nos grãos normalmente ocorre pela infecção da espiga sendo favorecida por clima úmido e quente na fase de polonização, mal empalhamento e por injúrias causadas por insetos nas espigas (Shurtleff, 1992; Reid et al., 1996). Segundo Agrios (2005), a utilização de populações elevadas de plantas, aliada a desequilíbrios nutricionais e à suscetibilidade dos genótipos, contribui para o aumento da incidência dos grãos ardidos. Além desses fatores, a intensidade das podridões da espiga é aumentada quando se pratica a monocultura principalmente se associada à prática do plantio direto (Flett & Wehner 1991; Reis & Casa, 1996).

Pinto (2006) constatou diferença significativa entre cultivares de milho com relação à incidência de grãos ardidos, quando avaliou 28 cultivares de milho quanto aos fungos *Fusarium verticillioides*, *Penicilium spp* e *Stenocarpella maydis*. Segundo Buiate et al. (2006) e Silva et al. (2006) esses resultados são fundamentais na tomada de decisão para a escolha do genótipo a ser recomendado para uma determinada região, pois mesmo apresentando altíssimo potencial produtivo, a produtividade líquida pode ser inferior, devido a sua alta susceptibilidade aos patógenos causadores do “complexo grão ardido”.

Para identificação de germoplasmas resistentes, há necessidade de utilização de métodos de inoculação artificial (Ullstrup, 1949; Del Rio, 1990; Klapproth & Hawk, 1991; Bensch et al., 1992; Bensch, 1995). Métodos de inoculação utilizados em programas de melhoramento devem ser o mais semelhantes possíveis à infecção natural. O método selecionado deve, também, fornecer dados consistentes entre os anos e genótipos, possibilitando, assim, a distinção entre materiais resistentes e materiais suscetíveis (Ullstrup, 1970; Klapproth & Hawk, 1991; Del Rio & Melara, 1991; Bensch, 1995). Mario (1998) comparando métodos de inoculação artificial para os fungos *S. maydis* e

S. macrospora constatou que o método de deposição foi o mais eficiente para inoculação deste fungos.

Na produção de sementes, estes fungos reduzem a qualidade fisiológica destas influenciando na % no vigor e germinação. Bressan & Figueiredo (2003) afirmaram em seu trabalho, que o fungo *Fusarium verticillioides*, causou redução na germinação da semente, morte de plântulas, podridão de raízes e de colmos e podridão dos grãos. O patógeno pode ainda afetar a qualidade dos grãos pela produção de compostos tóxicos, como as fumonisinas Camargos et al. (2000).

Os compostos tóxicos nada mais são que, metabólitos secundários, chamados de micotoxinas, presentes em grãos ou sementes de milho e outros cereais, produzidos principalmente por espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. São toxinas que apresentam efeitos tóxicos agudos e crônicos em animais e humanos, estando associados a diversas doenças patológicas.

O *Fusarium verticillioides* é o fungo produtor de dezesseis tipos de fumonisina: A1, A2, A3, AK1, B1, B2, B3, B4, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1A E PH1B (Musser & Plattner, 1997; Ah-Seo & Won Lel, 1999) A Fumonisina B1 é a forma molecular mais produzida pelo fungo. O mecanismo de ação das fumonisinas está relacionado com o bloqueio na síntese dos esfingolipídeos, substância importante para a integridade da membrana celular e transporte iônico através das células. Os esfingolipídeos são predominantes no sistema nervoso central e periférico, principalmente como lipídeo da mielina, estando localizados nos oligodendrócitos e células de Schwann (Wang et al., 1991), causando sérios problemas na alimentação de aves e suínos.

Machinski Jr. & Valente Soares (2000), avaliou a presença de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho recém colhido, e concluiu que todos os híbridos analisados apresentaram contaminação de grãos por fumonisinas B1 e B2. Altas temperaturas e

pluviosidade intensa, mostraram alta correlação com o acúmulo de fumonisinas no milho, resultando em maior acúmulo na safra de verão. Não foi encontrada nenhuma correlação entre a produção de aflatoxinas B1 e B2 com o tipo de endosperma duro ou mole do grão ou com o ciclo dos cultivares de milho.

Na cultura de milho, o método de controle de micotoxinas por evasão não é seguro, necessitando do desenvolvimento e/ou da utilização de outras técnicas, em conjunto, tais como, adubação equilibrada, controle de insetos e de plantas daninhas, colheita precoce, transporte rápido e secagem, para evitar a contaminação de grãos de milho por micotoxinas no campo e nos silos, especialmente, àquelas produzidas por *Fusarium spp.*

Conforme Camargos et al. (2000) existem diferenças entre o comportamento de diferentes cultivares quanto ao acúmulo de fumonisinas, o que evidencia a resistência de alguns cultivares, sugerindo a possibilidade de seleção destes para locais específicos. Segundo os resultados obtidos por Hermanns et al. (2006), a fase de grão farináceo é crítica no controle no que diz respeito à produção de fumonisinas, servindo de alerta para a necessidade da adoção de medidas preventivas do ponto de vista micotoxicológico.

Casa (1997), estudando a transmissibilidade dos fungos *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho, detectou que a semente é fonte de inóculo e de disseminação destes fungos, contaminando as plântulas e afetando o vigor, sendo necessário a aplicação de fungicidas nas sementes. Entretanto, somente o fungicida a base de Captan não foi satisfatório para o controle de *Stenocarpella spp.*, necessitando estar associado a outros princípios ativos. Constatou-se também que, não só as sementes, mas os restos culturais são fonte de inóculo destes fungos.

Grãos de milho, com grau de umidade inferior à 13% não apresentaram condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos, no entanto, em graus de umidade, acima de 17%, associada à temperaturas de 25 a 30°C, ocorre alta

produção de fungos e conseqüentemente de micotoxinas (Santúrio, 2003). Segundo esse mesmo autor a resistência de genótipos de milho a grãos ardidos está correlacionada também com o teor de ácidos graxos polinsaturados, mais exatamente ao ácido linoléico. O mecanismo de resistência se dá por meio da produção das enzimas LOX (Lipoxigenase). As LOX catalisam a dioxigenação estereoespecífica de ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis,cis - 1,4-pentadieno com formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando, assim, moléculas reativas com atividades fisiológicas pronunciadas (Vick & Zimmerman, 1983)

Duas principais vias para o metabolismo dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzidos pelas lipoxigenases, chamadas de Via das Lipoxigenases, vêm sendo propostas para plantas superiores. Essa via envolve a ação de duas enzimas, ou seja, hidroperóxido liase e a hidroperóxido ciclase. Após a ação da hidroperóxido liase, pode ocorrer a produção de aldeídos, os quais podem inibir o crescimento de fungos, insetos e protozoários (Croft et al., 1993), podendo também agir como um sinal químico para a planta danificada (Paré & Tumlinson, 1997). Essa via também pode produzir traumatina, conhecida como hormônio relacionado ao processo de infecção, que pode estar envolvida no processo de sinalização e divisão celular em resposta a ferimentos em plantas. Já a hidroperóxido ciclase catalisa a formação de ácidos graxos cíclicos derivados do ácido 13- hidroperoxilinolênico, que são precursores da síntese de ácido jasmônico. Esse possui atividade de fitorregulador e está envolvido em processos de desenvolvimento, bem como na resposta da planta a insetos e patógenos, induzindo à síntese de genes que se expressam para inibidores de proteases (Farmer & Ryan, 1990; 1992).

Quando tecidos de plantas são danificados por patógenos ou mecanicamente, ocorre uma degradação seqüencial de lipídeos que são produtos primários da reação das lipoxigenases. Essas enzimas se ativam e oxidam os

ácidos graxos linoléico e linolênico, produzindo uma determinada concentração de aldeídos e compostos voláteis que inibem a formação e o desenvolvimento de fungos e as conseqüentes micotoxinas (Kim et al., 2002; Wright et al., 2000 e Zeringue et al., 1996). Zeringue & McCormick (1989; 1990)

Um assunto recente e pouco estudado é a influencia de LEA (Late Embryogeneses Accumulated), que são proteínas presentes em grãos de milho, sobre a resistência de grãos aos fungos que causam grãos ardidos. Essas são proteínas hidrofílicas, compostas por aminoácidos localizados no citoplasma, no núcleo e nos vacúolos das células, e se expressam em situação de estresse, aumentando a resistência das sementes (Burns et al., 1997).

Roveri José (2005) observou maior concentração de frações de proteínas resistentes ao calor em linhagens resistentes a altas temperaturas de secagem. Bezerra (1996) estudando a influencia da seca em diferentes estádios da germinação, para o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), conseguiu identificar cultivares mais resistentes a condições de stress. Este mesmo cultivar, o Vita 5, tinha uma maior concentração de proteínas LEA's quando comparado com cultivares mais sensíveis. Desta forma sugere-se estudos da associação destas proteínas à resistência a agentes patogênicos causadores de podridões de espiga.

Estudos relacionados à influência de compostos químicos, atividade de enzimas específicas em grãos de milho sobre a resistência de genótipos associados aos patogênicos causadores de grãos ardidos são muito escassos.

Assim, nessa pesquisa será avaliada a reação de híbridos de milho quanto aos fungos *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*, principais causadores de grãos ardidos. Para isso serão avaliadas características agronômicas, químicas e bioquímicas em grãos que possam estar associados à resistência destes híbridos aos referidos patógenos. Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão ser utilizados nos programas de melhoramento

de híbridos de milho, durante o processo de seleção de genótipos resistentes a grãos ardidos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. New York: Academic, 2005. 922 p.

AH SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.1331-1334, 1999.

BENSCH, M.J. *Stenocarpella maydis* (Berk). Sutton colonization of maize ears. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.143, p.597-599, 1995.

BENSCH, M.J.; STADEN, J. van.; RIJKENBERG, J.H.F. Time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.136, p.265-269, 1992.

BEZERRA, M.A. **Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) com diferentes graus de resistência à seca**. 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J.E.F. **Controle de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho por actinomicetos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 65p. (Comunicado Técnico).

BUIATE, E.A.S.; SILVA, A.M.; BRITO, C.H.; GOMES, L.S.; BRANDÃO, A.M.; SANTANA, D.G. Reação de híbridos de milho ao complexo de patógenos causadores de “grão ardido” e levantamento dos principais fungos associados a essa doença no Brasil Central. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26., 2006, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: EMBRAPA, 2006. 1 CD ROM.

BURNS, W.C.; MAITRA, N.; CUSHMAN, J.C. Isolation and characterization of a cDNA encoding a group I LEA protein (Accession No. U66317) from Soybean 1 (PGR97-016). **Plant Physiology**, v.113, p. 663, 1997.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.3, p.226-229, 2000.

CASA, R.T. **Diplodia maydis e Diplodia macrospora associados à semente de milho**. 1997. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CROFT, K.P.C.; JÜNTTER, F.; SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway involved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, New York, v.101, p.13-24, 1993.

DEL RIO, L. Maiz muerto en Honduras provocado por el complejo *Diplodia Y Fusarium*. **Manejo Integrado de Plagas**, v.18, p.42-53, 1990.

DEL RIO, L.; MELARA, W. Dispersion de *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton en un cultivo de maiz. **Ceiba**, v.32, p.133-140, 1991.

FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v.87, p.7713-7716, 1990.

FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wounding inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, Dordrecht, v. 4, p.129-134, 1992.

FLETT, B.C.; WEHNER, F.C. Incidence of *Stenocarpella* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **Journal of Phytopathology**, v.133, p.327-333, 1991.

HERMANN, G.; PINTO, F.T.; KITAZAWA, S.E.; NOLL, I.B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.7-10, jan./mar. 2006.

KLAPPROTH, C.J.; HAWK, A.J. Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. **Plant Disease**, v.75, p.1057-1060, 1991.

KIM, E.S.; KIM H.; PARK, R.D.; LEE, Y.; HAN, O. Dual positional specificity of woundresponsive lipoxygenase from maize seedlings. **Journal Plant Physiology**, p.1263-1265, 2002.

MACHINSKI JR., M.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.10, p.875-879, 2000.

MARIO, J.L. **Comparação de métodos de inoculação de diplodia amydis em espigas de milho e reação de híbridos em condições de infecção natural de D. macospora**. 1998. 80p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS.

MENEGAZZO, R. Micotoxinas em milho para rações na região sul do Brasil (1992-1997). In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9.; SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 1998, Florianópolis. **Livro de resumos...** Florianópolis: UFSC, 1998. p. 22.

MUSSER, S.M.; PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.45, p. 1169-1173, 1997.

PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. De novo biosynthesis of volatiles inducible by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology**, New York, v.114, p.1161-1167, 1997.

PINTO, N.F.J.A. Reação de cultivares em relação à produção de grãos ardidos em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26., 2006, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte, Embrapa. 2006. 1 CD ROM.

REID, L.M.; BOLTON, A.T.; HAMILTON, R.I.; MATHER, D.E. **Screening maize for resistance to gibberella ear rot agriculture and agri-food** Canada: 1996. (Technical Bulletin Publications, 196-5E).

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

ROVERI JOSÉ, S.C.B.; PINHO, E.V. de R. von; PINHO, R.G. von; SILVEIRA, C.M.DE. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.2, p.115-121, fev. 2005.

SANTÚRIO, J.M. Minimizando perdas e/ou uso de ingredientes não contaminados por micotoxinas. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 18., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2003. 1 CD ROM.

SHURTLEFF, M.C. **A compendium of corn diseases**. St. Paul: Minnesota: American Phytopathological Society, 1992.

SILVA, A.M.; BRITO, C.H.; BUIATE, E.A.S.; GOMES, L.S.; BRANDÃO, A.M.; SANTANA, D.G. Associação da produtividade com incidência de grãos ardidos de milho para a região de São Bento Abade, Sul de Minas Gerais. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 26., 2006, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: Embrapa, 2006. 1 CD ROM.

SUTTON, B.C. **The coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.

SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. **Diplodia maydis**. London: Commonwealth Mycological Institute, 1966. (C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 84).

ULLSTRUP, A.J. A method for producing artificial epidemics of *Diplodia ear* rot. **Phytopathology**, v.39, p.93-101, 1949.

ULLSTRUP, A.J. Methods for inoculating corn ears with *Gibberella zeae* and *Diplodia maydis*. **Plant Disease**, v.54, p.658-662, 1970.

VICK, B.A.; ZIMMERMAN, D.C. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v.111, p.470-477, 1983.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal Biology Chemistry**, v.266, p.1486-1490, 1991.

WRIGHT, M.S.; GREENE-McDOWELLE, D.M.; ZERINGUE, H.J.JR. Effects of volatile aldehydes from Aspergillus-resistant varieties of corn on Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin biosynthesis. **Toxicon**, v.38, p.1215-1223, 2000.

ZERINGUE, H. J.; BROWN, R.L.; NEUCERE, J.N. Relationship between C₆-C₁₂ alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.44, p.403-407, 1996.

ZERINGUE, H.J.; McCORMICK, S.P. Relationships between cotton leaf derived volatiles and growth of *Aspergillus flavus*. **Journal American Oil Chemists Society**, v.66, n.4, p. 581-585 1989.

ZERIGUE, H.J.; McCORMICK, S.P. Aflatoxin production in cultures of *Aspegillus flavus* incubet in atmospheres containing selected cotton leaf-derived volatiles. **Toxicon**, v.28, n.4, p.445-448, 1990.

Capítulo 2

Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos

1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar híbridos de milho oriundos de empresas sementeiras do Brasil, com e sem a inoculação dos fungos *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de semeadura direta e em dois anos agrícolas; e verificar a associação com parâmetros químicos e bioquímicos, que possam estar diretamente relacionados à resistência aos fungos. As características avaliadas foram a produtividade de grãos, a porcentagem de grãos ardidos, os teores de ácidos graxos, as proteínas resistentes ao calor e a atividade da enzima lipoxigenase. A significância do contraste entre os híbridos considerados resistentes versus os híbridos considerados susceptíveis, para produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos evidencia a existência de genótipos com maior resistência aos fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*. A produtividade de grãos e a porcentagem de grãos ardidos foram influenciadas pelo tipo de híbrido, pelas safras agrícolas e pelas inoculações artificiais, sendo mais pronunciada no sistema de plantio direto. Não há associação entre a produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos o que evidencia que as perdas provocadas pela incidência de grãos ardidos em milho não são de caráter quantitativo. Há diferenças nos teores de ácidos graxos linoléico entre os grupos de híbridos estudados, sendo maiores os valores obtidos no grupo de híbridos considerados resistentes ao complexo “grãos ardidos”. Com base na concentração de frações de proteínas resistentes ao calor foi possível verificar bandas específicas presentes nos híbridos considerados resistentes aos fungos causadores do complexo grãos ardidos, mais especificamente de peso molecular de 50kDa. Os perfis eletroforéticos para a lipoxigenase revelam uma maior intensidade de bandas para os híbridos resistentes aos fungos causadores de grãos ardidos em milho.

2 ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate corn hybrids originating from seed companies in Brazil, with and without inoculation of the fungi *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*, under conventional and direct sowing cropping systems, in two crop seasons; and verify the association with chemical and biochemical grain characteristics, which can be directly related to tolerance to the fungi. Grain yield, percentage of rotten grain, fatty acids levels, heat resistant proteins, and lipoxygenase enzyme activity were measured. The significance of the contrast between hybrids considered resistant versus susceptible, for grain yield and rotten grains percentage shows the existence of genotypes with higher tolerance to the fungi *F. verticillioides*, *S. maydis* and *S. macrospora*. Grain yield and the percentage of rotten grains were influenced by: hybrid type, crop season, and by artificial fungi inoculations, being more pronounced in direct planting system. There is no association between grain yield and percentage of rotten grains which demonstrated that losses caused by incidence of grain rot disease in corn are not a quantitative character. There are differences in levels of linoleic acid among corn hybrids groups studied with higher values being obtained in tolerant to "grain rot" complex. Based on concentration of heat resistant protein fractions it was possible to verify the presence of specific bands in the tolerant hybrids and more specifically in those of 50kDa molecular weight. The electrophoresis profiles for lipoxygenase reveal a higher band intensity for the hybrids tolerant to the corn grain rot causing fungi.

3 INTRODUÇÃO

As áreas de cultivo de milho na região Sul de Minas Gerais são caracterizadas por um relevo montanhoso, com altitude geralmente acima de 800m. A maioria das áreas de cultivo é realizada sob o sistema convencional de cultivo, mas nos últimos anos tem sido observado, aumento nas áreas de cultivo de milho sob plantio direto. Esse aumento de área associado à falta de rotação de culturas, ao monocultivo de milho e as condições climáticas favoráveis tem propiciado o aparecimento de várias doenças, destacando as podridões de grãos e espigas, que provocam o aparecimento de “grãos ardidos”.

Os fungos mais freqüentemente detectados e associados ao “complexo grãos ardidos” são *Fusarium verticillioides*, *Diplodia maydis* (*Stenocarpella maydis*) e *Diplodia macrospora* (*Stenocarpella macrospora*). Estes fungos atuam de forma deletéria na qualidade dos grãos e são aceitáveis os valores máximos de 2% de grãos ardidos para a exportação e de 6% para a comercialização no mercado interno.

A ocorrência desses patógenos provoca redução na produtividade de grãos e na qualidade sanitária dos grãos, pois a infecção por esses fungos resulta na paralisação do processo normal de enchimento de grãos e reduz o peso de espigas.

O cultivo do milho em monocultura e o plantio direto favorecem a sobrevivência, a manutenção e a multiplicação do inóculo destes fungos (Zambolim et al., 2000). Dessa forma, torna-se cada vez mais importante a correta escolha do material genético a ser utilizado.

A resistência de genótipos de milho a podridões de grãos e espigas está relacionada ao teor de ácidos graxos do tipo linoléico (Zeringue et al.,1996). Esse é o principal ácido graxo insaturado, compreendendo cerca de 62% dos óleos vegetais do milho, sendo também essencial à nutrição humana e a alguns

animais, dada a incapacidade de síntese dos mesmos pelo organismo (Paes, 2008).

Quando tecidos de plantas são danificados por patógenos ou mecanicamente, ocorre uma degradação seqüencial de lipídeos que são produtos primários da reação das lipoxigenases. Essas enzimas se ativam e oxidam os ácidos graxos linolêicos, produzindo uma determinada concentração de aldeídos e compostos voláteis que inibem a formação e o desenvolvimento de fungos em grãos (Kim et al., 2002; Wright et al., 2000).

Um assunto recente e pouco estudado é a influencia de LEA Proteínas presentes em grãos de milho, sobre a resistência de grãos aos fungos que causam grãos ardidos. Cultivares resistentes a condições de estresse e associação a com proteínas resistentes ao calor foram selecionadas para feijão-de-corda (Bezerra, 1996). Desta forma, este autor sugere estudos sobre a associação destas proteínas à resistência a agentes patogênicos causadores de podridões de espiga.

Entretanto estudos relacionados à influência de compostos químicos, à atividade de enzimas específicas em grãos de milho com a resistência de genótipos associados aos patógenos causadores de grãos ardidos são bastante escassos no Brasil.

Este trabalho teve como objetivos avaliar híbridos comerciais de milho oriundos de empresas produtoras de sementes do Brasil, com e sem a inoculação dos fungos *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de semeadura direta e em dois anos agrícolas; objetivou-se também verificar a associação com parâmetros químicos e bioquímicos, que possam estar diretamente relacionados à resistência a esses fungos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das áreas experimentais

Os experimentos foram conduzidos em dois locais, nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08. Em Lavras, MG os experimentos foram conduzidos em área experimental do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A cidade está situada a 918 m de altitude, a 21°14'30'' de latitude sul e 45°00'10' de longitude oeste. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é considerado como mesotérmico, apresentando verões brandos e chuvosos (Cwb). Apresenta temperatura média anual de 19,3°C, com máximas de 27,8°C e mínimas de 13,5°C e precipitação média anual de 1.411 mm, com 65% a 70% desse total concentrados de dezembro a março (Sebrae, 1998). Neste local a instalação dos experimentos foi no sistema de plantio convencional, numa área onde é comum o plantio de milho após milho, sem rotação de culturas.

O segundo experimento foi instalado na Fazenda Palheta, em área pertencente ao Aviário Santo Antônio – ASA, no município de Luminárias, MG. Este local está situado a 1000 m de altitude, sendo a 21°51'00'' de latitude sul e 44°90'00' de longitude oeste, cuja temperatura média anual é de 19,4°C, com máximas de 26,1°C e mínimas de 14,8°C e precipitação média anual de 1.529 mm, onde os verões são brandos e chuvosos (Cwb). Nesta segunda área, os experimentos foram instalados em sistema de plantio direto, adotando como cultura de inverno, o nabo forrageiro e/ou tremoço, em sucessão ao milho

Os experimentos foram instalados na primeira quinzena do mês de novembro e as colheitas ocorreram na primeira quinzena de maio, após a maturidade fisiológica dos grãos. As intensidades e distribuições de chuvas nas diferentes safras e locais estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

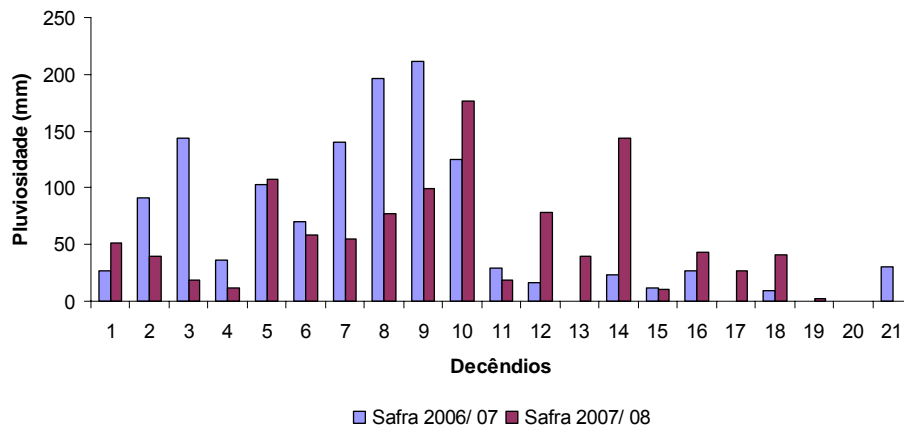


FIGURA 1 Dados médios de precipitação pluviométrica por decênio, em Lavras, MG, no período de 01/11 a 30/05.

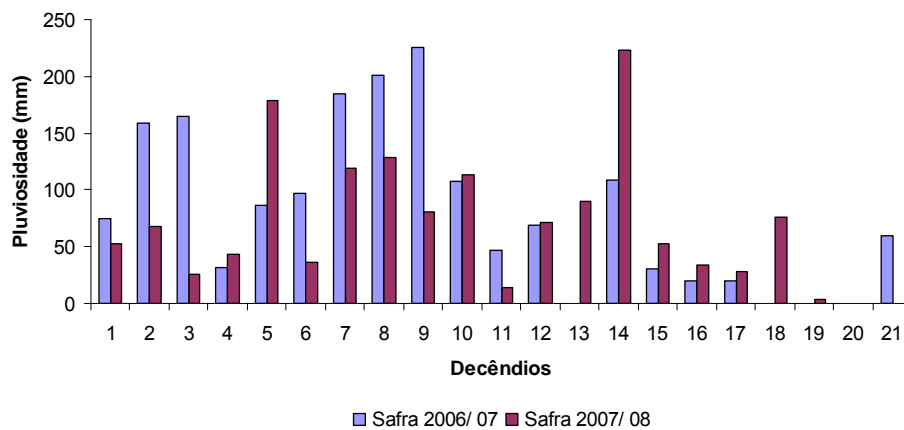


FIGURA 2 Dados médios de precipitação pluviométrica por decênio, em Luminárias, MG, no período de 01/11 a 30/05.

4.2 Tratamentos avaliados e delineamento experimental

Foram utilizados dez híbridos de milho, sendo divididos em dois grupos de acordo com a sua reação aos fungos *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* baseado em dados fornecidos pelas empresas produtoras de sementes (Tabela 1). O grupo 1 foi composto por híbridos resistentes e o grupo 2 por híbridos suscetíveis a esses fungos.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições, em esquema fatorial 10x4, sendo dez híbridos de milho e quatro tratamentos de inoculação de fungos patogênicos, sendo três com inoculação artificial dos fungos *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* e um tratamento testemunha, sem inoculação.

As parcelas foram compostas de duas fileiras de cinco metros de comprimento, espaçadas 0,8 metros. A densidade de semeadura foi de 60.000 plantas por hectare após o desbaste.

Para a adubação de base, no sistema convencional de cultivo, foi utilizado 400 kg ha⁻¹ da formulação 08-28-16 + 0,5% de Zn e 450 kg ha⁻¹ da formulação 10-20-10 no sistema de plantio direto. Quando as plantas atingiram entre quatro e cinco folhas totalmente expandidas, foi realizada a adubação de cobertura, com a aplicação de 300 kg ha⁻¹ da formulação 30-00-20, no convencional e 400 kg ha⁻¹ da formulação 30-00-10, no sistema de plantio direto. Foram utilizados os mesmos tratos culturais para ambos os experimentos, nas duas safras agrícolas e nos diferentes sistemas de manejo. Para o controle das plantas invasoras, foram utilizados os herbicidas: Gesaprim (atrazina) e o Sanson 40SC (nicosulfuron), nas dosagem de 3,0 l ha⁻¹ e 0,7 l ha⁻¹ do produto comercial, que foram aplicado em pós-emergência. Os outros tratos culturais foram executados nas épocas adequadas, de acordo com as necessidades da cultura nas diferentes safras e locais de cultivo.

TABELA 1 Características dos híbridos de milho utilizados nos experimentos e reação aos fungos *Fusarium verticillioides*, *Diplodia maydis* e *Diplódia macrospora*.¹

	Híbrido	Base Genética	Empresa	Resistência ²
Grupo 1	AG 6018	HT	MONSANTO	AT
	AG 8021	HS	MONSANTO	AT
	DKB 199	HS	MONSANTO	AT
	2 A 525	HS	DOW	AT
	NB 7215	HS	AGROSCIENCES SYNGENTA	AT
Grupo 2	DKB 350	HT	MONSANTO	BT
	DKB 390	HS	MONSANTO	BT
	P 30F53	HS	PIONEER	BT
	2 B 710	HS	DOW	BT
	NB 7210	HS	AGROSCIENCES SYNGENTA	BT

¹ Informações fornecidas pelas empresas produtoras de sementes.

² AT - Alta resistência ; BT - Baixa resistência.

4.3 Obtenção, produção do inóculo e métodos de inoculação

Para proceder à inoculação artificial, foram cedidas pela empresa Monsanto do Brasil S.A., amostras de grãos de milho inoculadas com os fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, sendo estas oriundas dos municípios de Uberlândia, MG, Chapadão do Sul, MS e Iraí de Minas, MG, respectivamente.

As amostras de grãos de milho inoculados foram colocadas em meio de *BDA* (batata-dextrose-agar) por um período de três a cinco dias para que estes fungos pudessem ser isolados. Após a formação das colônias, discos contendo micélio foram transferidos para um substrato com a finalidade de produzir esporos. Para substrato na esporulação dos fungos foram utilizadas 100 gramas de grãos de sorgo em erlenmeyer de 1L com posterior lavagem em água corrente de torneira, por agitação manual. Os grãos foram embebidos em 125 mL de água

destilada por aproximadamente 12 horas. Após este período, a água não absorvida pelos grãos foi descartada, e em seguida, o substrato foi autoclavado a 125 °C por 20 minutos. Três discos de cada colônia fúngica, com 5,0 mm de diâmetro, foram transferidos para um erlenmeyer com substrato. O frasco foi agitado para distribuir os discos no interior da massa de grãos. Logo após, o material foi conduzido para incubação a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ até se formar uma massa preta ao redor dos grãos, proveniente da esporulação do fungo. Diariamente a massa de grãos foi agitada.

O inóculo contido no erlenmeyer foi suspenso em 250 mL de água destilada esterilizada (ADE) e agitado durante 30 min. Logo após, foi coado através de cinco camadas de gaze, sustentadas por um coador plástico, para outro erlenmeyer. A suspensão de conídios utilizada nos trabalhos de inoculação foi ajustada por meio de contagem em câmara de Neubauer para 4×10^4 conídios mL^{-1} . As inoculações foram feitas nas duas linhas componentes de cada parcela, sempre no final do dia, quando a temperatura se encontrava amena. Para *S. maydis*, *S. macrospora*, o método de inoculação artificial foi o de deposição e para o fungo *F. verticilioides*, o método de inoculação foi o de aspersão.

Para os fungos *S. maydis* e *S. macrospora* foram depositados 5 mL de uma suspensão com 4×10^4 conídios mL^{-1} , na bainha da folha onde se insere a espiga, dez dias após todas as plantas da parcela terem emitido o estilo-estigma (Bensch et al., 1992). Nesse mesmo estágio da cultura foram aspergidos nos estilo-estigmas de cada espiga, 5 mL de uma suspensão com 4×10^4 conídios mL^{-1} de *F. verticilioides* (Mario & Reis, 2001).

4.4 Características agronômicas avaliadas

4.4.1 Porcentagem de grãos ardidos

A incidência de grãos ardidos foi determinada conforme procedimento proposto na portaria nº11, de 12/04/96 (Brasil, 1996). O método consiste na separação visual e na determinação da porcentagem de grãos com sintomas de descoloração em mais de um quarto da sua superfície total, a partir de uma amostra de 250 g de grãos por parcela.

4.4.2 Produtividade de grãos

Para a determinação da produção de grãos por hectare, foi realizada a colheita manual das espigas das duas fileiras da parcela. As espigas foram debulhadas, os grãos pesados e o teor de água dos grãos determinados. Os dados de produtividade de grãos foram corrigidos para um teor de 13% de umidade e expressos em kg ha⁻¹.

4.5 Características químicas e bioquímicas avaliadas

As análises químicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LNA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Laboratório de Técnicas Moleculares do Setor de Sementes, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para a realização das análises, foram utilizadas amostras de grãos compostas, oriundas das três repetições do tratamento testemunha (sem inoculação) cultivado no sistema de plantio direto. Os teores de ácidos graxos foram analisados com grãos produzidos na safra (2006/07) e as análises de bioquímicas com grãos produzidos na safra (2007/08).

4.5.1 Análise de ácidos graxos

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAMES) foram obtidos segundo metodologia adaptada de Hartman & Lago (1973), citados por Guevara (2003). A extração e a esterificação dos lipídeos foram feitas na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, seguindo os protocolos 1A e 2A, em protocolos página 108. As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LNA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), utilizando-se um cromatógrafo gasoso CP3800, Varian, equipado com detector de ionização em chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (30m x 0,25mm x 0,25 mm) da J&W Scientific, USA. Os dados foram coletados e trabalhados com auxílio da Work Station Varian Star. A temperatura inicial da coluna foi mantida constante por 4 minutos, a 75°C. Após este intervalo, a temperatura foi elevada de 75°C para 235°C a uma razão de 10°C por minuto. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 2,0 mL. min⁻¹, a temperatura do detector FID foi ajustada em 280°C e a do injetor em 250°C. Adotou-se o modo de injeção “splitless”.

4.5.2 Análise de proteínas resistentes ao calor

Uma amostra de grãos composta de cada híbrido foi embebida durante cinco horas, para a extração dos eixos embrionários, os quais foram colocados em microtubos e mantidos a -86°C. No momento da extração das proteínas, 11 eixos embrionários, previamente pesados, foram moídos em mortar sobre gelo, na presença de solução tampão (50mM Tris-HCL – 7,5; 500 mM NaCl; 5 mM Mg Cl₂; 1 mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume do tampão de extração) e posteriormente transferidos para microtubos de capacidade de 1500 µL. O homogeneizado foi centrifugado a 1600 x g por 30 minutos, a 4°C, e o sobrenadante incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos e posteriormente centrifugado como citado acima. O sobrenadante foi

vertido em microtubos e o pellet, descartado. Antes de realizar a aplicação no gel, os tubos de amostra contendo 70µL de extrato + 40 µL de solução tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46 g de SDS; 20 mg de azul de Bromofenol e completado o volume para 20 mL de tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em embulição por 5 minutos. Serão aplicados 50 µL do extrato + tampão da amostra por canaleta, em gel de poliacrilamida SDS_PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 V, e os géis, corados em Coomassie Blue a 0,005 % conforme Alfenas et al. (1991), durante 12 horas, e descorados em solução de ácido acético 10%. A razão da utilização dos eixos embrionários ao invés do embrião inteiro foi para aumentar a concentração dessas proteínas, melhorando a qualidade do gel, após revelação.

4.5.3 Análise eletroforética da enzima lipoxigenase

Sementes secas foram maceradas, juntamente com polivinilpirrolidona e nitrogênio líquido, em cadinhos de porcelana. Desse material foram pesados 100 mg, para análise de cada enzima, colocado em eppendorf onde foram adicionados 250 µL de tampão de extração (Tris HCL 0,2M, pH: 8,0) e 0,1% de β-mercaptaenol. Estes permaneceram durante a noite toda e no dia seguinte foram centrifugados a 14000xg por 30 minutos, a 4°C. Do sobrenadante, foram retirados 50 µL com posterior aplicação em gel de poliacrilamida 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi submetida à voltagem constante de 150 V por aproximadamente seis horas. Logo após, os géis foram revelados conforme Alfenas (2006).

A solução tampão fosfato foi preparada utilizando: 25 mL água destilada; 0,890 g de fosfato de sódio bifásico e 0,050 g de oleato de potássio, sendo o pH ajustado para 6,8 e acrescentado 25 mL de água destilada. Para a solução de revelação foram utilizados 0,4 g o-dianisidina dissolvido em 360 mL de EtOH 96%, a quente (banho maria). Os rendimentos destas soluções foram

para o preparo de quatro géis. Para o preparo da solução reveladora final, foi utilizado a proporção de 1:9 (solução tampão fosfato: solução revelação), ou seja, 40 mL da solução tampão mais 360 mL da solução de revelação.

4.6. Análise estatística

Inicialmente realizou-se a análise de variância individual e posteriormente a análise conjunta envolvendo os dois anos agrícolas dentro de cada sistemas de cultivo. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de agrupamento de médias Skott Knott por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2002).

Para a realização dos contrastes entre as médias, os 10 híbridos foram separados em dois grupos, um considerado resistente e outro considerado susceptível ao complexo de grãos ardidos. Para avaliar o efeito nos grupos de híbridos, os tratamentos foram divididos de acordo com dados repassados pela empresas e as inoculações artificiais realizadas: (R) considerados resistentes; (S) considerados susceptíveis; (T) testemunhas (sem inoculação); (I) inoculados, (F) inoculado com o fungo *F. verticilioides* e (St) as inoculações com os fungos *S. macrospora* e *S. maydis*.

Deste modo foram realizados quatro contrastes ortogonais (R vs S, T vs I, T vs F, T vs St), visando comparar os grupos de híbridos em relação a produtividade de grãos e grãos ardidos, em cada safra agrícolas.

Obtiveram-se também, correlações simples de Pearson, entre as características agronômicas (produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos), utilizando o programa estatístico GENES (Cruz, 2007).

Realizou-se também análise de variância individual para as análises químicas do perfil dos ácidos graxos, sendo os dados submetidos ao teste de médias Skott Knott, por meio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, é importante ressaltar que a precipitação pluviométrica ocorrida durante a condução dos experimentos ultrapassou os 600 mm, nas duas safras e nos dois locais. Esse valor é considerado suficiente para a obtenção de produções satisfatórias de grãos de milho, apesar da distribuição das chuvas não ter sido muito uniforme (Figura 1 e Figura 2). Vale ressaltar que, nesse período as temperaturas médias sempre estiveram acima de 20°C, valor acima do mínimo necessário para o bom desenvolvimento da planta de milho. Assim, pode-se afirmar que as condições climáticas ocorridas durante a condução dos experimentos foram consideradas normais para o bom desenvolvimento da cultura.

5.1 Experimento de Lavras (Sistema convencional de cultivo)

Quando analisadas as precipitações ocorridas no sistema convencional de cultivo, pode-se constatar na primeira safra (2006/07) uma grande precipitação no mês de janeiro, valores estes superiores a 550 mm de chuva. Este período correspondeu as épocas de inoculação dos fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*. Porém, na fase de enchimento de grãos e final de ciclo houve uma grande redução na precipitação (Figura 1). Este fato não ocorreu na segunda safra (2007/08), onde houve uma melhor distribuição das chuvas e conseqüentemente um maior volume de chuvas no final do ciclo da cultura (Figura 2). Vale ressaltar que o aumento no volume de chuvas no período de enchimento de grãos e no final de ciclo das plantas pode acarretar numa maior infecção dos fungos relacionados ao “complexo de grãos ardidos” (Embrapa, 2006; Fancelli, 1995).

Na Tabela 1A, estão apresentados os resumos das análises de variância individuais para as produtividades de grãos e porcentagem de grãos ardidos nas duas safras agrícolas. Foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$ e $P \leq 0,05$) entre os híbridos, para as características avaliadas. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) variou entre as características. O maior valor de CV foi observado para a porcentagem de grãos ardidos (GA) (54,86%) na safra 2006/07 e o menor, para a produtividade de grãos (10,32%), também na safra 2006/07.

Na primeira safra (2006/07) não houve diferenças significativas para o efeito das inoculações e para a interação híbridos x inoculações. Na segunda safra (2007/08) houve diferença significativa para a interação híbridos x inoculações para as variáveis produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos (Tabela 1A).

O resumo da análise de variância conjunta envolvendo os dois experimentos em sistema de plantio convencional, está apresentado na Tabela 2. Para a produtividade de grãos, houve significância ($P \leq 0,01$) para híbridos, safras e para a interação híbridos x safras e efeito significativo ($P \leq 0,05$) para a interação híbridos x inoculações. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) foi de 12,27%.

Para a porcentagem de grãos ardidos houve significância ($P \leq 0,01$) para todas as fontes de variações e o C.V. foi de 23,68% (Tabela 2).

TABELA 2 Resumo da análise de variância conjunta envolvendo as duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) em sistema convencional de cultivo, para a produtividade de grãos (PROD) em kg ha⁻¹ e grãos ardidos (GA) em porcentagem.

Fonte de variação	GL	QM	
		PROD	GA
Bloco (Safr)	4	1524808,16	6,47
Híbridos (H)	9	9520132,44**	180,06**
Inoculações (I)	3	2224263,65 ^{NS}	263,72**
Safras (S)	1	25093900,10**	4903,57**
H*I	27	2278211,33*	45,55**
H*S	9	3670035,08**	134,42**
I*S	3	1561475,74 ^{NS}	240,75**
H*I*S	27	1849532,93 ^{NS}	51,12**
Erro	156	1353017,11	4,78
CV (%)		12,27	23,68
Média Geral		9.480	9,24

* P<0,05 ** P<0,01; ^{NS} Não significativo.

A seguir são apresentados os resultados médios da produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos, considerando a significância das fontes de variação na análise conjunta envolvendo os dois experimentos conduzidos.

5.1.1 Produtividade de grãos

Na primeira safra (2006/07) o híbrido mais produtivo foi o DKB 390, com produtividade superior a 11.000 kg ha⁻¹, seguido dos híbridos P 30F53, 2 A 525 e DKB 199, que não diferiram entre si. Já na segunda safra (2007/08) o P 30F53 foi o híbrido mais produtivo, com média superior a 10.000 kg ha⁻¹, apesar de não diferir estatisticamente dos híbridos NB 7210, DKB 390 e NB 7215. Os híbridos AG 6018 e DKB 350 foram os menos produtivos, com produtividade inferior a 8.100 kg ha⁻¹. Estes valores de produtividades estão acima das médias do Estado de Minas Gerais, que são inferiores a 4.500 kg ha⁻¹ (Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB, 2008). Houve diferença na produtividade

de grãos entre as safras agrícolas, sendo que, na primeira safra (2006/07) a produtividade de grãos foi superior em cerca de 1500 kg ha⁻¹.

TABELA 3 Resultados médios de produtividade de grãos (kg ha⁻¹) de 10 híbridos de milho em função das safras agrícolas, considerando as médias dos tratamentos inoculados com os fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* e um tratamento testemunha (sem inoculação) em sistema de cultivo convencional.

HÍBRIDOS	SAFRA 06/07	SAFRA 07/08
AG 6018	9.365 b	8.163 b
AG 8021	9.483 b	8.817 b
DKB 199	10.195 a	8.457 b
2 A 525	10.465 a	8.765 b
NB 7215	8.966 b	9.232 a
DKB 350	9.230 b	8.349 b
DKB 390	11.118 a	9.584 a
P 30F53	10.803 a	10.167 a
2 B 710	9.226 b	9.044 b
NB 7210	9.182 b	9.988 a
MÉDIAS	9.803 A	8.256 B

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Com base na significância da interação híbridos x inoculações, para a produtividade de grãos, pode-se inferir que os híbridos se comportaram de forma diferente quando inoculados artificialmente com os fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* (Tabela 4).

Nos tratamentos inoculados pelo fungo *F. verticilioides* os híbridos DKB 390 e P 30F53 obtiveram as maiores produtividades, com média superior a 10.000 kg ha⁻¹. Vale ressaltar que estes híbridos são pertencentes ao grupo considerado como susceptível ao “complexo de grãos ardidos”, não diferindo entre si dos híbridos 2 B 710, NB 7210 e 2 A 525 (Tabela 4).

TABELA 4 Resultados médios de produtividade de grãos de 10 híbridos de milho em função dos tratamentos inoculados com os fungos *F. verticillioides* (F), *S. maydis* (M) e *S. macrospora* (MA) e do tratamento testemunha (T – sem inoculação) em sistema de cultivo convencional, considerando a média das safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08.

HÍBRIDOS	F	M	MA	T
AG 6018	8942 b	9365 a	9195 b	7644 b
AG 8021	8654 b	9450 a	8450 b	10062 a
DKB 199	8725 b	9361 a	10169 a	9049 b
2 A 525	9769 a	10185 a	10202 a	10305 a
NB 7215	8280 b	8806 a	9975 a	9335 a
DKB 350	9058 b	8806 a	8691 b	8602 b
DKB 390	10024 a	10131 a	11165 a	10086 a
P 30F53	11224 a	9499 a	11394 a	9823 a
2 B 710	9916 a	8802 a	8871 b	8952 b
NB 7210	9987 a	9096 a	9583 b	9674 a
MÉDIAS	9.458 A	9.350 A	9.769 A	9.353 A

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Nos tratamentos inoculados com os fungos causadores da podridão branca da espiga, para o fungo *S. maydis* não houve diferenças significativas entre os híbridos inoculados. Porém, houve diferença significativa para a inoculação com *S. macrospora*, sendo os híbridos DKB 390, P 30F53, DKB 199, 2 A 525 e NB 7215 os que obtiveram a maior produtividade de grãos (Tabela 4). Dentre estes híbridos existem aqueles considerados como resistentes e também susceptíveis, de acordo com as empresas produtoras de sementes.

Esses resultados confirmam o relato feito por Wiser et al. (1960), de que não existe germoplasma com resistência completa a *Stenocarpellas spp.* Ficou evidenciado também, que existe variabilidade genética para resistência a *Stenocarpellas spp.*, o que sugere que através de programas de melhoramento específicos, possa-se conseguir híbridos resistentes a podridão branca da espiga.

Nos tratamentos testemunha (sem inoculação) os híbridos mais produtivos foram o 2 A 525, AG 8021, considerados resistentes e o DKB 390

considerado susceptível, ambos com produtividades de grãos superiores a 10.000 kg.ha⁻¹. é importante enfatizar que esses híbridos não diferiram dos híbridos 2 A 525, P 30F53 e NB 7210 (Tabela 4). Vale ressaltar ainda que, o fato do híbrido ter sido mais produtivo não necessariamente acarretará em uma menor incidência de grãos ardidos, além de que, a resistência do material a podridão de grãos apresenta herança quantitativa, sendo altamente influenciada pelo ambiente. Para evidenciar isso, quando se analisa as médias de produtividade de grãos dos diferentes tratamentos inoculados artificialmente (*F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*), verifica-se que estas estiveram próximas da média do tratamento testemunha (sem inoculação), que foi de 9.353 kg ha⁻¹ (Tabela 4).

5.1.2 Porcentagem de grãos ardidos

A significância da interação híbridos x inoculações x safras, para a incidência de grãos ardidos, permite inferir que há diferenças na reação dos híbridos avaliados quando inoculados artificialmente com os fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* e que isso é dependente das safras agrícolas (Tabela 5).

Os valores foram superiores na segunda safra (2007/08) para os tratamentos inoculados com os fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, bem como para o tratamento testemunha (T) sem inoculação. Este fato pode ser explicado pela maior intensidade de chuvas no final do ciclo da cultura. Ribeiro (2005) também obteve diferentes incidências de grãos ardidos, para três híbridos de milho quando comparados em diferentes safras agrícolas.

Na primeira safra (2006/07) apenas para a inoculação artificial com o fungo *S. macrospora* houve diferença significativa entre os híbridos. A maior incidência de grãos ardidos foi para o híbrido DKB 390, considerado susceptível e a menor incidência para o híbrido DKB 199, considerado resistente (Tabela 5).

Com base na infecção natural, representada pelo tratamento testemunha (T – sem inoculação), houve diferença significativa entre os híbridos na segunda safra (2007/08), onde o híbrido AG 6018 obteve a menor porcentagem de grãos ardidos (3,81%), considerado resistente, e a maior porcentagem de grãos ardidos foi detectada no híbrido NB 7210 (14,93%), pertencente ao grupo de híbrido considerado susceptível pelas empresas produtoras de sementes ao “complexo grãos ardidos” (Tabela 5).

A elevada incidência de *F. moniliforme* em grãos de milho já foi descrita por vários autores, como Luz & Pereira (1998) e Pinto (1998). Reid et al. (1999) consideram esse fungo endofítico e onipresente na natureza, contudo, nem sempre patogênico. Entretanto, Munkvold et al. (1997) relatam a possibilidade de infecção sistêmica a partir do inóculo da semente ou através dos restos culturais presentes na superfície do solo, resultando na infecção das espigas e dos grãos.

TABELA 5 Resultados médios de porcentagem de grãos ardidos em 10 híbridos de milho, em função da inoculação com os fungos *F. verticillioides* (F), *S. maydis* (M) e *S. macrospora* (MA) e do tratamentos testemunha (T – sem inoculação) em função das safras agrícolas (2006/07 e 2007/08), em sistema de cultivo convencional.

HÍBRIDOS	SAFRA 2006/07				SAFRA 2007/08			
	F	M	MA	T	F	M	MA	T
AG 6018	2,63 aB	2,90 aB	2,03 aB	4,53 aA	21,56 cA	14,47 dA	24,33 eA	3,81 aA
AG 8021	3,40 aB	5,50 aB	3,13 aB	3,46 aB	13,89 bA	11,91 cA	11,12 bA	7,50 bA
DKB 199	2,73 aB	2,82 aA	3,63 aA	3,26 aA	15,87 bA	3,01 aA	4,93 aA	6,41 bA
2 A 525	4,20 aA	2,93 aB	7,70 bA	7,33 aA	6,89 aA	9,65 bA	4,39 aA	4,84 aA
NB 7215	7,06 aB	5,63 aA	5,13 aB	4,26 aA	13,75 bA	8,62 Ba	12,47 bA	6,41 bA
DKB 350	6,00 aB	6,06 aB	2,03 aB	4,13 aA	21,51 cA	17,74 eA	16,60 cA	4,29 aA
DKB 390	5,90 aB	5,50 aB	7,73 bB	4,06 aB	20,76 cA	24,69 gA	15,26 cA	9,52 cA
P 30F53	4,30 aB	5,93 aB	4,56 aB	4,90 aB	15,03 bA	16,05 dA	13,80 bA	10,67 cA
2 B 710	4,17 aA	5,63 aB	3,76 aB	4,63 aB	4,72 aA	26,44 gA	26,99 eA	8,67 cA
NB 7210	4,80 aB	8,73 aB	6,70 bB	4,83 aB	33,05 dA	22,32 gA	21,37 dA	14,93 dA
MÉDIAS	4,52 A	5,16 A	4,64 A	4,54 A	16,70 A	15,50 A	15,12 A	7,70 B

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Para os resultados da inoculação artificial com o fungo *F. verticillioides*, o híbrido que apresentou a maior incidência de grãos ardidos na segunda safra (2007/08) foi o híbrido NB 7210, com mais de 33% de grãos ardidos, sendo os híbridos 2 A 525 e 2 B 710 os que obtiveram as menores porcentagens 6,89 e 4,72%, respectivamente. Estes valores são superiores ao índice máximo aceitável para fim de exportação de grãos de milho que é de 2% (Menegazzo, 2000).

Ao mesmo tempo em que *F. verticillioides* causa prejuízos econômicos, desvalorização do produto final, também causa problemas devido ao seu potencial como agente produtor de micotoxinas, principalmente das fumonisinas, as quais estão relacionadas a danos à saúde humana e animal (Munkvold & Desjardin, 1997).

Nas avaliações das inoculações com o fungo *S. maydis*, o mesmo híbrido NB 7210, que hora foi susceptível para o fungo *F. verticilioides*, foi também o híbrido que obteve também a maior porcentagem de grãos ardidos, seguido dos híbridos DKB 390 e 2 B 710, sendo os valores superiores a 22% de grãos ardidos (Tabela 5). O fato de ter havido híbridos com elevadas porcentagens de grãos ardidos, quando inoculado com a *S. maydis*, permite-nos inferir que existe diferença entre os híbridos avaliados e que os mesmos possuem comportamento diferente para os fungos em estudos. Segundo Flett & McLaren (1994), para que sejam detectadas diferenças quanto à reação de híbridos, é necessária uma incidência mínima de 17% de grãos infectados. Estes híbridos estão enquadrados no grupo considerado pela empresas produtoras como susceptíveis a podridões de grãos.

Para as inoculações artificiais com a *S. macrospora* o híbrido 2 B 710 obteve a maior incidência de grãos ardidos, com um valor de 27%, pertencente ao grupo de híbridos considerados susceptíveis. O híbrido que obteve o menor percentual foi o 2 A 525, com 4,39%, pertencente ao grupo considerado como resistente ao fungos causadores de podridão.

Trabalhos de pesquisas conduzidos na região sul do Brasil, na cultura do milho, tem obtidos maiores incidências de *S. macrospora* em relação a *S. maydis* (Del Rio, 1990 e Mario et al., 2003). Porém, para os experimentos conduzidos na região do Sul de Minas Gerais, as porcentagens médias de grãos ardidos obtidas para os tratamentos inoculados com *S. maydis* e *S. macrospora* foram semelhantes, mesmo na segunda safra (2007/08), cujo os valores foram mais expressivos, com valores de 15,50 e 15,12, respectivamente (Tabela 5).

Com base nestes resultados, ficou evidente que é possível avaliar a resistencia de híbridos de milho, aos fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, nas condições climáticas da região do Sul de Minas Gerais, por meio de inoculações artificiais.

5.1.3 Contrastes

Para a característica produtividade de grãos considerando os contrastes de médias entre os híbridos considerados resistentes e susceptível (R vs S), somente foi significativo o contraste na segunda safra (2007/08), com mais de 90% de probabilidade (Tabela 6). Porém, não se pode afirmar que o fato do híbrido ser mais ou menos produtivo, condicionará uma maior ou menor resistência as podridões de espigas.

TABELA 6 Probabilidade de significância dos contrastes para produtividade de grãos (PROD) e porcentagem de grãos ardidos (GA), envolvendo os tratamentos inoculados artificialmente com os fungos *Fusarium verticillioides* (F), *Stenocarpella maydis* (M) e *Stenocarpella macrospora* (MA) e um tratamento testemunha (T), nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08, em sistema de manejo convencional.

CONTRASTES ¹	SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
	PROD	GA	PROD	GA
R vs S	0,66	0,03	0,03	<0,01
T vs I	0,59	0,25	0,12	<0,01
T vs F	0,88	0,53	0,16	<0,01
T vs St	0,29	0,97	0,17	<0,01

¹ R (resistente); S (susceptível); T (testemunha); I (inoculação); F (*F. verticilióides*) e St (*S.maydis* e *S macrospora*).

Para os contrastes envolvendo a porcentagem de grãos ardidos, o contraste (R vs S), foi significativo com mais de 95% de probabilidade, nas duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) (Tabela 6). Estes resultados confirmam os dados repassados pela empresas produtoras de sementes, quanto à resistência ao complexo de grãos ardidos, além de evidenciar a existência de variação quanto a resistencia nos híbridos analisados.

Quando analisados os contrastes testemunha vs inoculações, testemunha vs *F. verticilióides*, testemunha vs *S.maydis* e *S. macrospora*, verifica-se significancia somente na segunda safra (2007/08) para grãos ardidos. É

importante enfatizar que o fato de ter havido uma alta significância, mais de 95% de probabilidade, para os contrastes envolvendo os tratamentos inoculados com os fungos causadores de grãos ardidos vs os tratamentos testemunha (sem inoculação), justifica a utilização da inoculação artificial, quando se pretende avaliar a resistência de aos fungos *F. verticilioides*, *S.maydis* e *S. macrospora*,. Estes resultados já eram esperados, devido à avaliação de porcentagem de grãos ardidos ter apresentado uma maior incidência na segunda safra (2007/08).

5.2 Experimento de Luminárias (Sistema de Plantio Direto)

Com base nas precipitações ocorridas no sistema de plantio direto, pode-se constatar que na primeira safra (2006/07) houve uma grande precipitação no mês de janeiro, ultrapassando os 650 mm de chuva, coincidindo com a época de inoculações dos fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* (Figura 2). Na fase de enchimento de grãos e final de ciclo houve uma grande redução no volume de precipitação. Este fato não ocorreu na segunda safra (2007/08) onde ocorreu uma melhor distribuição das chuvas e conseqüentemente um maior volume de chuvas no final do ciclo da cultura, sendo que, somente no mês de março houve uma precipitação acumulada superior aos 400 mm de chuvas (Figura 2). Estas condições são propícias para o desencadeamento das podridões de espigas (Reis & Casa, 1996).

Os resumos das análises de variância individuais para a produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos nas duas safras agrícolas, estão apresentados na Tabela 2A . Foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$ e $P \leq 0,05$) entre os híbridos, para as características avaliadas. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) variou entre as características. O maior valor de CV foi observado para a porcentagem de grãos ardidos (G.A) (63,42%) e o menor, para a produtividade de grãos (13,0%).

Na primeira safra (2006/07) e na segunda safra (2007/08) não houve diferenças significativas para o efeito das inoculações e para a interação híbridos x inoculações na variável produtividade de grãos. Para a porcentagem de grãos ardidos, houve efeito significativo para inoculações e para a interação híbridos x inoculações, nas duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) (Tabela 2A).

Na Tabela 6, está apresentado o resumo da análise de variância conjunta, envolvendo os dois experimentos. Para a produtividade de grãos, houve significância ($P \leq 0,01$) para híbridos, safras e para as interações (híbridos x safras e inoculações x safras) (Tabela 6). A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) foi de 15,62%. Para a porcentagem de grãos ardidos houve significância ($P \leq 0,01$) para todas as fontes de variações, com C.V. de 25,21% (Tabela 6).

TABELA 7 Resumo da análise de variância conjunta envolvendo as duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) em sistema de plantio direto, para produtividade de grãos (Prod.) em kg ha^{-1} e grãos ardidos (GA) em porcentagem. Fazenda Palheta, Luminárias-MG, 2009.

Fonte de variação	GL	QM	
		PROD	GA
Bloco (Safra)	4	1723285,75	14,51
Híbridos (H)	9	8793438,30**	338,33**
Inoculações (I)	3	7887265,62**	481,93**
Safras (S)	1	165143496,06**	4301,15**
H*I	27	1801537,00 ^{NS}	52,89**
H*S	9	6262316,74**	205,08**
I*S	3	1962303,69 ^{NS}	312,11**
H*I*S	27	2711747,50 ^{NS}	53,38**
Erro	156	2491709,56	3,94
CV (%)		15,62	25,21
Média Geral		10.107	7,87

* $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

A seguir são apresentados os resultados médios da produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos, considerando a significância das fontes de variação na análise conjunta envolvendo os dois experimentos conduzidos.

5.2.1 Produtividade de grãos

Com base nos resultados da primeira safra (2006/07) o híbrido mais produtivo foi o DKB 350, com produtividade de $10.518 \text{ kg ha}^{-1}$, seguido dos híbridos 2 B 710, P 30F53, 2 A 525 e DKB 199, que pertenceram ao mesmo grupo de médias (Tabela 7). Já na segunda safra (2007/08) o P 30F53 foi o híbrido mais produtivo, com média de $12.014 \text{ kg ha}^{-1}$, que também não diferiu estatisticamente dos híbridos DKB 390, 2 A 525 e AG 8021.

A produtividade média foi maior na segunda safra (2007/08), com uma diferença de 1.662 kg ha^{-1} , em relação à safra (2006/07). Este fato pode ter sido influenciado pelo excesso de chuvas próximo do período de florescimento ocorrido na primeira safra, pois o período nublado acarreta em queda de produtividade, devido a baixa disponibilidade de radiação solar (Fischer & Palmer, 1984 e Fancelli & Dourado-Neto, 2000).

Os valores de produtividades estão acima da produtividade média nacional de milho que é de 3.653 kg.ha^{-1} (CONAB, 2008). Estes resultados corroboram com os obtidos por Ribeiro (2005) que avaliando a incidência de podridões de grãos, obteve também em sistema de plantio direto, produtividades potenciais superiores a $13.000 \text{ kg ha}^{-1}$.

TABELA 8 Resultados médios de produtividade de grãos de 10 híbridos de milho em função das safras agrícolas, considerando as médias dos tratamentos inoculados com os fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* e um tratamento testemunha (sem inoculação) em sistema de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

HÍBRIDOS	SAFRA 06/07	SAFRA 07/08
AG 6018	8.213 b	9.474 b
AG 8021	8.736 b	11.162 a
DKB 199	9.475 a	10.592 b
2 A 525	9.931 a	11.393 a
NB 7215	8.818 b	11.210 a
DKB 350	10.518 a	10.386 b
DKB 390	8.803 b	11.930 a
P 30F53	9.681 a	12.014 a
2 B 710	10.306 a	10.696 b
NB 7210	8.297 b	10.536 b
MÉDIA	9.278 B	10.940 A

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

5.2.2 Porcentagem de grãos ardidos

O efeito significativo para a interação híbridos x inoculações x safras, para a incidência de grãos ardidos, permite-nos inferir que há diferenças na reação dos híbridos quando inoculados artificialmente com os fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* e isso também é dependente das safras agrícolas (Tabela 8)

De acordo com os resultados obtidos nos tratamentos inoculados com os fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, bem como para o tratamento testemunha (T) pode-se observar que, estes foram superiores na segunda safra (2007/08) (Tabela 8). Estes resultados corroboram com os obtidos por Ribeiro (2005), que obteve diferentes incidências de grãos ardidos, quando comparadas diferentes safras agrícolas. Esses resultados evidenciam o efeito do ambiente na incidência das podridões de espiga.

TABELA 9 Resultados médios de porcentagem de grãos ardidos em 10 híbridos de milho, em função da inoculação com os fungos *F. verticillioides* (F), *S. maydis* (M) e *S. macrospora* (MA) e do tratamentos testemunha (T – sem inoculação) em função das safras agrícolas (2006/07 e 2007/08), em sistema de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

HÍBRIDOS	SAFRA 2006/07				SAFRA 2007/08			
	F	M	MA	T	F	M	MA	T
AG 6018	1,74 Ab	1,60 aB	1,81 aB	3,37 aA	8,12 cA	11,43 cA	8,29 cA	2,15 aA
AG 8021	2,48 Aa	3,17 aB	1,72 aB	2,92 aA	3,28 aA	8,46 bA	4,85 bA	4,71 bA
DKB 199	2,36 aB	2,84 aA	3,98 aA	2,81 aA	5,76 bA	5,87 aA	1,78 aA	3,03 aA
2 A 525	2,95 Ab	5,10 bB	3,08 aB	3,33 aA	10,21 cA	10,84 cA	6,08 cA	3,10 aA
NB 7215	3,07 aB	7,74 bB	2,97 aB	3,94 aA	13,66 dA	26,33 eA	22,56 eA	5,67 bA
DKB 350	4,05 aA	4,60 bB	3,88 aB	2,83 aB	6,46 bA	19,65 dA	17,11 dA	6,62 bA
DKB 390	3,38 aB	15,08 cB	3,47 aB	2,09 aB	10,54 cA	19,07 dA	31,07 gA	6,77 bA
P 30F53	2,87 aB	2,33 aB	2,63 aB	2,11 aB	7,34 bA	5,78 aA	7,23 cA	9,14 cA
2 B 710	4,59 aB	4,81 bB	3,37 aB	2,92 aA	21,43eA	24,89 eA	26,75 eA	4,83 bA
NB 7210	4,13 aB	7,08 bB	2,69 aB	3,49 aB	14,49 dA	25,12 eA	39,37 há	13,53 dA
MÉDIAS	3,16 B	5,43 A	2,96 B	2,98 B	10,12 B	15,74 A	16,51 A	5,95 C

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Na primeira safra (2006/07) apenas para a inoculação artificial com o fungo *S. maydis* houve diferença significativa. A maior incidência de grãos ardidos foi para o híbrido DKB 390, considerado susceptível e a menor incidência para o híbrido AG 6018, considerado resistente. Esses resultados confirmam o relato feito por Wiser et al. (1960), de que não existe germoplasma com resistência completa a *S. maydis*.

Na segunda safra (2007/08) também houve diferença significativa entre os híbridos, para os tratamentos inoculados artificialmente e para a testemunha. Com base nos valores obtidos na infecção natural, no tratamento testemunha (T), a menor incidência foi detectada no híbrido AG 6018 (2,15%) e a maior incidência no híbrido NB 7210 (13,53%). Juliatti et al. (2007) obteve média de porcentagem de grãos ardidos semelhante para o híbrido AG 6018 (2,15%), quando avaliado em sistema de plantio direto, para a região do Triângulo Mineiro em Minas Gerais.

Para os resultados da inoculação artificial com o fungo *F. verticillioides*, o híbrido que apresentou a maior incidência de grãos ardidos foi o 2 B 710, com 21,43% de grãos ardidos. O híbrido AG 8021, foi o que obteve a menor porcentagem, com 3,28%.

Nas inoculações com o fungo *S.maydis* o híbrido NB 7215 foi o que obteve a maior porcentagem de grãos ardidos, com 26,33%, não diferindo estatisticamente dos híbridos 2 B 710 e NB 7210 (Tabela 8).

Para as inoculações artificiais com a *S. macrospora* o híbrido NB 7210 obteve a maior incidência de grãos ardidos, com 39,37%, o menor percentual foi obtido no híbrido DKB 199 com 1,78% (Tabela 8).

Os altos valores obtidos na incidência de grãos ardidos no híbrido NB 7210, permite-nos inferir que, o mesmo apresentou uma menor resistência quando comparados com aos demais híbridos avaliados, principalmente quando submetido a inoculações artificiais com os fungos *S.maydis* e *S. macrospora*.

Segundo Pinto (2001) existem diferentes estratégias no controle de podridões de grãos em milho, sendo uma das melhores alternativas o uso de genótipos resistentes. Desse modo, fica evidente a importância de estudar os mecanismos envolvidos na resistência de híbridos de milho ao complexo “grãos ardidos”.

5.2.3 Contraste

Para a produtividade de grãos somente foi significativo o contraste entre os contrastes de médias entre os diferentes grupos de híbridos, os considerados resistentes e considerados susceptível, para a característica produtividade de grãos, somente foi significativo o contraste na segunda safra (2007/08), com mais de 90% de probabilidade, conforme Tabela 10.

Para os contrastes envolvendo a porcentagem de grãos ardidos, o contraste (R vs S), foi significativo com mais de 90% de probabilidade para as

duas safras agrícolas, conforme Tabela 9. Um fator importante para a obtenção destes resultados, foram às ocorrências de uma maior frequência de chuvas, principalmente no período após o florescimento da cultura (Figura 2). Trabalhos de pesquisas evidenciam (Santos et al., 2002; Fernandes & Oliveira, 1997) que a ocorrência de altas precipitações pluviais, no período de final de ciclo da cultura acarreta em um maior desencadeamento de podridões de espiga.

Quando analisados os contrastes testemunha vs inoculações, testemunha vs *F. verticilioides*, testemunha vs *S.maydis* e *S. macrospora*, os contrastes foram significativos somente na segunda safra (2007/08). Estes resultados confirmam os obtidos anteriormente, quando analisado conjuntamente as safras agrícolas, demonstrando maior incidência de podridão de grãos na segunda safra (2007/08).

TABELA 10 Probabilidade de significância de contrastes para produtividade de grãos (PROD) e porcentagem de grãos ardidos (G.A.), envolvendo os tratamentos inoculados artificialmente com os fungos *Fusarium verticilioides* (F), *Stenocarpella maydis* (M) e *Stenocarpella macrospora* (MA) e um tratamento testemunha (T), nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08, em sistema de plantio direto. Luminárias, MG 2009.

CONTRASTES ¹	SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
	PROD	GA	PROD	GA
R vs S	0,12	0,04	0,15	<0,01
T vs I	0,12	0,12	0,73	<0,01
T vs F	0,05	0,78	0,74	<0,01
T vs St	0,52	0,04	0,78	<0,01

¹ R (resistente); S (susceptível); T (testemunha); I (inoculação); F (*F. verticilioides*) e St (*S.maydis* e *S macrospora*).

Com base nos resultados, podemos inferir que existe variabilidade genética para os fungos *F. verticilioides*, *S.maydis* e *S. macrospora*. e que, através de um programa de melhoramento direcionado para esse fim, pode-se conseguir híbridos resistentes à podridão da espiga.

5.3 Correlação entre as características

O estudo das correlações torna-se importante quando se deseja analisar o grau de associação entre dois conjuntos de *scores* referentes a um determinado grupo de indivíduos. A medida usual de correlação é o coeficiente (r) de correlação de Pearson. Se positivo indica que o aumento de uma determinada característica implicará no aumento da outra, e se negativo, o aumento de uma determinada característica implica na diminuição da outra. A relação é perfeita quando o valor do r for igual a +1 ou -1.

Com base nas variações encontradas para a porcentagem de grãos ardidos, dentro de cada tratamento, eram esperadas por sua vez, que houvesse uma correlação negativa entre a incidência desses fungos nos grãos de milho colhidos com a produtividade de grãos. Contudo, não se observou correlação significativa entre a incidência dos fungos nos grãos e a produtividade de grãos, para as duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) nos dois sistemas de cultivo (Tabela 11). Estes resultados não corroboram com os obtidos por Santos et al. (2002) que obteve correlação significativa e negativa entre a porcentagem de grãos ardidos e a produtividade de grãos.

Por outro lado os dados obtidos são semelhantes aos relatados por Thompson et al. (1971), que apontam a podridão de espiga como um fator redutor da qualidade e não tanto de quantidade de grãos produzidos. Estes autores, afirmam ainda, que a podridão de espigas não está relacionada com a podridão do colmo, a qual pode causar reduções no rendimento de grãos.

TABELA 11 Coeficiente de correlação (r) para produtividade de grãos (PROD) e porcentagem de grãos ardidos (GA.), envolvendo os tratamentos inoculados artificialmente com os fungos *Fusarium verticillioides* (F), *Stenocarpella maydis* (Sy) e *Stenocarpella macrospora* (Sm) e o tratamento testemunha (T), nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08, em dois sistema de cultivo (convencional e plantio direto).

GA	CONVENCIONAL		PLANTIO DIRETO	
	SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08	SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08
	PROD	PROD	PROD	PROD
F	0,19 ^{NS}	- 0,03 ^{NS}	0,41 ^{NS}	0,06 ^{NS}
Sy	0,25 ^{NS}	0,11 ^{NS}	0,32 ^{NS}	0,01 ^{NS}
Sm	0,47 ^{NS}	- 0,03 ^{NS}	0,48 ^{NS}	- 0,17 ^{NS}
T	0,15 ^{NS}	0,30 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,40 ^{NS}

¹ NS: não significativo

Estes resultados permitem inferir que a infecção de grãos de milho a campo, causadas principalmente pelos fungos relacionados ao “complexo grãos ardidos”, dentre eles o *F. verticillioides*, a *S.maydis* e *S. macrospora*, não causaram perdas quantitativas na produção, mas muito provavelmente causaram perdas qualitativas, que serão motivos de desvalorização do produto e riscos para a utilização do produto na alimentação de rebanhos e humana.

5.4 Características químicas e bioquímicas

5.4.1 Teores de ácidos graxos

Os resumos das análises de variâncias individuais para os teores de ácidos graxos, estão apresentados na Tabela 3A. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) variou entre os ácidos graxos. O maior valor de CV foi observado para o ácido graxo esteárico (15,67%) e a menor, para o ácido graxo linoléico (8,68%).

Na Tabela 12, estão os dados médios, referentes aos teores de ácidos graxos nos híbridos de milho, sendo estes divididos em dois grupos, o primeiro considerado resistente e o segundo considerado susceptível ao complexo “grãos ardidos”, com base nas informações repassadas pelas empresas produtoras de

sementes. Os resultados obtidos para os teores de ácidos graxos foram confrontados com os valores tidos como padrão para a cultura do milho, citados na tabela da Embrapa /CNPSA.

Não houve diferença significativa entre os híbridos nos teores de ácido palmítico, esteárico e oléico. Porém, quando comparado os valores médios obtidos para os dois grupos de híbridos, considerados resistentes e susceptíveis, ao complexo de fungos causadores de grãos ardidos, para o ácido palmítico os valores foram superiores ao padrão, o mesmo fato não ocorreu para os ácidos graxos esteárico e oléico, que apresentaram valores médios inferiores ao padrão (Tabela 12).

TABELA 12 Valores médios para os teores de ácidos graxos em 10 híbridos avaliados na safra 2006/07 em sistema de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.*

HÍBRIDOS	PALMITICO	ESTEARICO	OLEICO	LINOLEICO
AG 6018	0,24 a	0,02 a	0,70 a	1,46 b
AG 8021	0,40 a	0,04 a	1,10 a	1,50 b
DKB 199	0,47 a	0,05 a	1,55 a	2,05 a
2 A 525	0,34 a	0,03 a	1,02 a	1,23 b
NB 7215	0,44 a	0,05 a	1,12 a	1,80 a
MEDIA¹	0,38	0,03	1,10	1,61
DKB 350	0,40 a	0,06 a	1,21 a	1,74 a
DKB 390	0,36 a	0,03 a	0,79 a	1,11 b
P 30F53	0,58 a	0,05 a	1,45 a	1,24 b
2 B 710	0,59 a	0,04 a	1,17 a	1,70 a
NB 7210	0,35 a	0,04 a	0,85 a	1,23 b
MEDIA²	0,46	0,04	1,09	1,40
PADRÃO³	0,35	0,06	1,26	1,65
MÉDIA GERAL	0,41	0,04	1,09	1,50
C.V.	10,73	15,67	9,04	8,68

* Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

¹ Média do grupo considerado resistente

² Médias do grupo considerado susceptível

³ Padrão EMBRAPA/CNPSA_Tabela SADIA S.A.

Os dados obtidos com o ácido palmítico, chama a atenção, pois se trata de um tipo de gordura saturada, e como o milho é um dos alimentos tradicionais mais empregados para suprir as demandas energéticas das aves e animais, atualmente, há uma preocupação com a saúde alimentar humana. Neste caso, existe uma associação entre ingestão de gordura e os problemas de saúde, relacionados principalmente à gordura animal (gordura saturada), que é representada em grande parte pelo ácido palmítico (C16:0), sobre a concentração plasmática das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e que é adotada por grande parte dos consumidores (Kazama, 2008).

Para o ácido graxo linoléico houve diferença entre os híbridos, sendo o DKB 199, NB 7215, DKB 350 e 2 B 710 foram os que apresentaram maiores valores. Os dois primeiros híbridos são pertencentes ao grupo considerados resistente e os dois últimos ao grupo considerados susceptível. Para estes materiais, os teores de ácido linoléico ficaram acima do valor padrão que é 1,65. Existem trabalhos de pesquisa mostrando a associação do ácido graxo linoléico, com a atividade de enzimas responsáveis por conferir maior resistência a plantas a infecção por patógenos, que será discutido posteriormente.

5.4.2 Proteínas resistentes ao calor (LEA)

Na Figura 1 estão apresentados os padrões eletroforéticos das proteínas resistentes ao calor extraídas de grãos de milho secos e produzidos na safra 2007/08. Vale salientar, que houve estabilidade nos padrões de banda das proteínas para todos os híbridos analisados.

Foi possível observar ainda uma concentração das frações protéicas de peso molecular entre 40 e 60 kDa, nos híbridos considerados resistentes aos fungos causadores de grãos ardidos em milho. Vale salientar, que foi possível observar bandas específicas presentes nos híbridos considerados resistentes, mais especificamente de peso molecular de 50kDa (Figura 3).

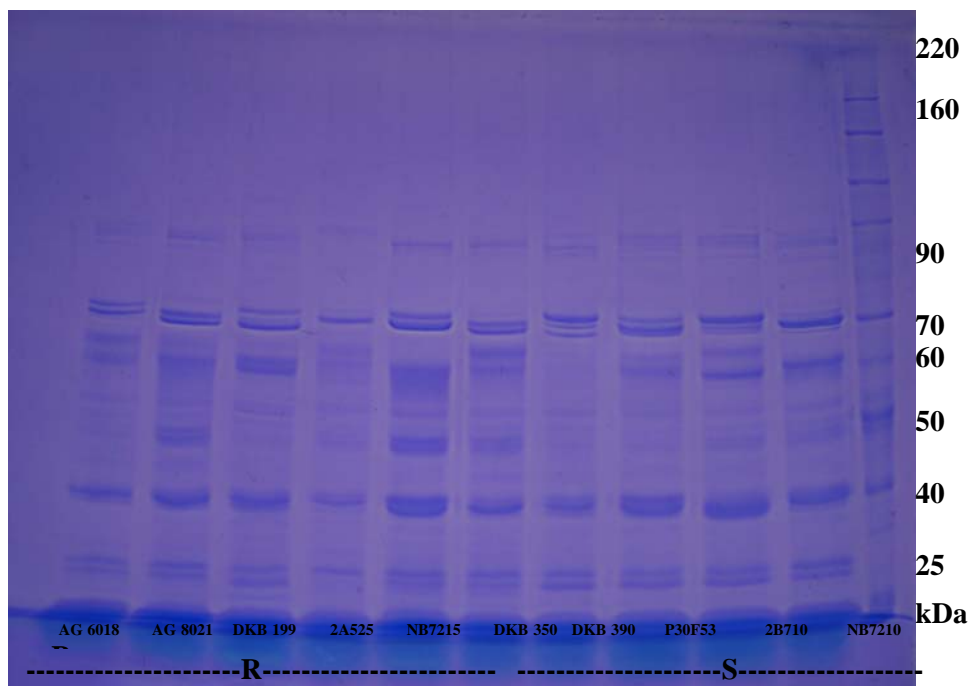


FIGURA 3 Padrão eletroforético das proteínas resistentes ao calor em híbridos de milho, considerados resistentes e susceptíveis aos fungos causadores de grãos ardidos, produzidas na safra 2007/08.
R: resistente, S: susceptível e P: padrão protéico.

Roveri José (2005) conseguiu identificar em linhagens de milho, concentrações de frações de LEA em genótipos resistentes a alta temperatura de secagem. Bezerra (1996) estudando a influencia da seca em diferentes estádios da germinação, para o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), conseguiu identificar cultivares mais resistentes a condições de stress. Este mesmo cultivar, o Vita 5, tinha uma maior concentração de proteínas LEA's quando comparado com cultivares mais sensíveis. Com base nos dados apresentados, podemos inferir que existe uma associação, entre a resistência de híbridos de milho, a infecção por fungos causadores de podridões de espigas e a concentração de LEA proteínas.

5.4.3 Atividade da lipoxigenase (LOX)

O gel revelado para a enzima lipoxigenase, presente nos híbridos de milho utilizados no presente trabalho, estão apresentados na Figura 4. A atividade da LOX pode ser evidenciada pelas bandas de cor laranja, devido a uma reação com o α -dionisidina, em gel de fundo branco, tratando-se de uma revelação positiva.

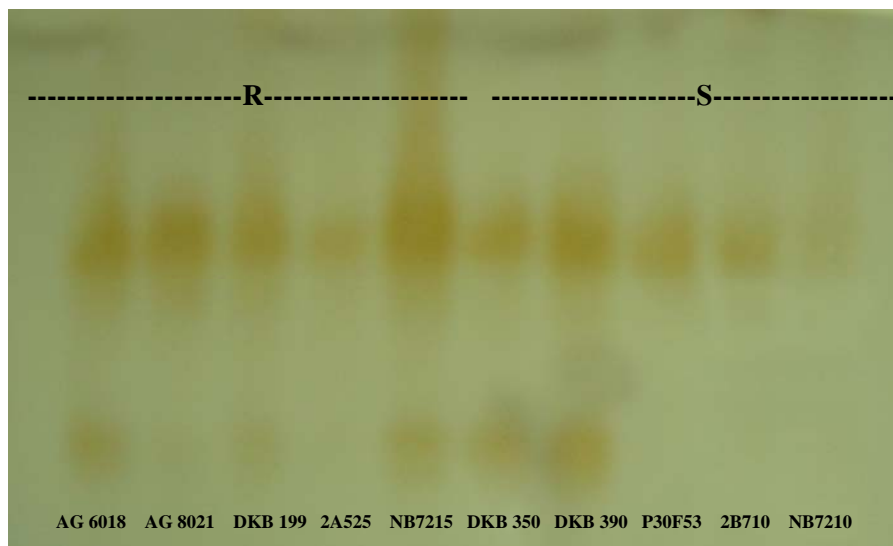


FIGURA 4 Padrão eletroforético da lipoxigenase em híbridos de milho, considerados resistentes e susceptíveis aos fungos causadores de grãos ardidos, produzidas na safra 2007/08.
R: resistente e S: susceptível.

Foi possível constatar a atividade da enzima LOX para todos os híbridos estudados. Uma maior atividade da enzima foi observada para os híbridos pertencentes ao grupo considerado resistente aos grãos ardidos, representados na figura 4, por R, quando comparado com o grupo considerado susceptível aos fungos, representados por S. Sendo que, ficou mais evidente a maior atividade da enzima para o híbrido NB 7215.

Estudos relacionados à influência de compostos químicos, atividade de enzimas específicas em grãos de milho sobre a resistência de genótipos

associados aos patogênicos causadores de grãos ardidos são bastante escassos, em nível de Brasil. Porém, o U.S. Department of Agriculture realizou vários experimentos para comprovar a resistência de algumas variedades de milho, devido aos diferentes níveis de ácidos graxos do óleo, principalmente ácido linoleico associados a presença da enzima lipoxigenase (Zeringue, 1996).

Com base nos dados apresentados na Tabela 12 (pag. X), deste mesmo trabalho, o híbrido NB 7215 esta no grupo que apresentou maiores teores de ácido linoléico, vindo a comprovar os resultados obtidos por Zeringue et al. (1996). Este mesmo autor, constatou diferença nas composições dos ácidos graxos extraídos através de vários genótipos de milho estudados, podendo explicar a susceptibilidade e resistência entre os genótipos com relação a infecção fúngica. O mecanismo funcionaria baseado nas produções de Hexanal e Octanal (aldeídos voláteis) pela liperoxidação do ácido linoléico promovido pela reação da enzima lipoxigenase. Esta enzima oxida o ácido linoléico e como resultado será a produção de aldeídos voláteis. Nestas investigações foi demonstrada a relação entre os níveis de aldeídos fungitóxicos na oxidação do ácido linoleico em diversos genótipos de milho, bem como a sua susceptibilidade e resistência ao ataque fúngico. Estes aldeídos são tóxicos para os fungos, eliminando as hifas em desenvolvimento.

Portanto, podemos inferir que híbridos de milho com alto teor de ácido linoleico como ácido graxo principal e a presença de alta atividade da enzima lipoxigenase, indicam que estes genótipos possuem maior capacidade de resistirem ao ataque fúngico no final de ciclo da cultura, com conseqüente menor produção de grãos ardidos na colheita.

6 CONCLUSÕES

A significância do contraste entre os híbridos considerados resistentes vs os híbridos considerados susceptíveis, para produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos evidencia a existência de genótipos com maior resistência os fungos *F. verticillioides*, *S.maydis* e *S. macrospora*.

A produtividade de grãos e a porcentagem de grãos ardidos foram influenciadas pelo tipo de híbrido, pelas safras agrícolas e pelas inoculações artificiais, sendo mais pronunciada no sistema de plantio direto.

Não há associação entre a produtividade de grãos e porcentagem de grãos ardidos o que evidencia que as perdas provocadas pela incidência de grãos ardidos em milho não são de caráter quantitativo.

Há diferenças nos teores de ácidos graxos linoléico entre os grupos de híbridos estudados, sendo maiores os valores obtidos no grupo de híbridos considerados resistente ao complexo “grãos ardidos”.

Com base na concentração de frações de proteínas resistentes ao calor foi possível verificar bandas específicas presentes nos híbridos considerados resistentes aos fungos causadores do complexo grãos ardido, mais especificamente de peso molecular de 50kDa

Os perfis eletroforéticos para a lipoxigenase revelam uma maior intensidade de bandas para os híbridos resistentes aos fungos causadores de grãos ardidos em milho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 627p.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991.242p.
- BENSCH, M.J.; STADEN, J. van; RIJKENBERG, J.H.F. Time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, v.136, p.265-269, 1992.
- BEZERRA, M.A. **Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata (L.) Walp*) com diferentes graus de resistência à seca**. 1996. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BRASIL. Portaria no 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.72, 1996.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra 2008/2009** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/politica_agricola/safra/quadro7.xls>. Acesso em: 6 jan. 2009.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2007. 648p.
- DEL RIO, L. Maiz muerto en Honduras provocado pôr el complejo diplodia y fusarium. **Manejo Integrado de Plagas**, v.18, p.42-53, 1990.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Doenças de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br>>. Acesso em: 10 jan. 2009.
- FANCELLI, A.L. (Org.). **Atualização em plantio direto**. Campinas: Fundação Cargill, 1985. v. 1, 343p.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.

FERREIRA, D.F. **SISVAR Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA/DEX, 2002. Software.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. de. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa- CNPMS, 1997. 80p. (Circular Técnica, 26).

FISCHER, K.S.; PALMER, A.F.E. Tropical maize. In: GOLSDWORTHY, P.R.; FISHER, N.M. (Ed.). **The physiology of tropical field crops**. New York: J.Wiley, 1984. p.213-248.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Optimum disease potential for evaluating resistance to *Stenocarpella maydis* ear rot corn hybrids. **Plant Disease**, v.78, p.587-589, 1994.

GUEVARA, M.J.P. **Enriquecimento de zooplâncton com óleo de peixe na larvicultura de pacu, *Piaractus mesopotamicus* e curimatá *Prochilodus lineatus***. 2003. 106 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HARTMANN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v.22, p.475-477, 1973.

JULIATTI, F.C.; ZUZA, J.L.M.F.; SOUZA, P.A.; POLIZEL, A.C. Avaliação da incidência de grãos ardidos em genótipos de milho sob aplicação foliar de fungicidas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.2, p.34-41, abr./jun. 2007.

KAZAMA, R.; ZEOULA, L.M.; PRADO, I. N.; SILVA D.C., DUCATTI, T.; MATSUSHITA, M. Características quantitativas e qualitativas da carcaça de novilhas alimentadas com diferentes fontes energéticas em dietas à base de cascas de algodão e de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.350-357, 2008

KIM, E.S.; KIM H.; PARK, R.D.; LEE, Y, HAN, O. Dual positional specificity of woundresponsive lipoxygenase from maize seedlings. **Journal Plant Physiology**, p.1263-1265, 2002.

LUZ, W.C. da; PEREIRA, L.R. Tratamento de sementes com fungicidas relacionando com o controle de patógenos e rendimento de milho. **Ciência Rural**, v.28, p.537-541, 1998.

- MARIO, J.L.; REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.670-672, 2001.
- MARIO, J.L.; REIS, E.M. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.143- 147, 2003.
- 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 DO MERCOSUL, 2., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: SAG-Mercosul, 2001. p.161-171.
- MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v.81, p.556-564, 1997.
- MUNKVOLD, G.P.; MCGEE, D.C.; CARLTON, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v.87, p.209-217, 1997.
- PINTO, N.F.J. de A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1998. 44p. (Circular Técnica, 29).
- PINTO, N.F.J.A. **Qualidade sanitária de grãos de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 4p. (Comunicado Técnico, 30).
- REID, L.M.; NICOL, R.W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J.D.; YOUNG, J.C.; ATEWART, D.W.; SCHAAFSMA, A.W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation. **Phytopathology**, v.89, p.1028-1037, 1999.
- RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.5, p.1003-1009, set./out. 2005
- ROVERI JOSÉ, S.C.B.; PINHO, E.V. de R. von.; PINHO, R.G. von.; SILVEIRA, C.M. de. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.2, p.115-121, fev. 2005.

SANTOS, P.G.; JULIATTII, F.C.; BUIATTI, A.L.; HAMAWAKI, O.T. Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho em Uberlândia, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.5, p.597-602, 2002.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS. **Lavras**: diagnóstico municipal. Belo Horizonte, 1998. 179p.

THOMPSON, D.L.; VILLENA, W.L.; MAXWELL, J.D. Correlation between *Diplodia* stalk and ear rot of corn. **Plant Disease Reporter**, v.55, p.158-162, 1971.

WISER, W.J.; KRAMER, H.H.; ULLSTRUP, A.J. Evaluating inbred lines of corn for resistance to *Diplodia* ear rot. **Agronomy Journal**, v.52, p.624-626, 1960.

WRIGHT, M.S.; GREENE-McDOWELLE, D.M.; ZERINGUE, H.J.JR. Effects of volatile aldehydes from *Aspergillus*-resistant varieties of corn on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin biosynthesis. **Toxicon**, v.38, p.1215-1223, 2000.

ZAMBOLIM, L.; CASA, R.T.; REIS, E.M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.585-595, 2000.

ZERINGUE, H.J.; BROWN, R.L.; NEUCERE, J.N. Relationship between C₆-C₁₂ alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.44, p.403-407, 1996.

Capítulo 3
Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos
fungos causadores de podridões de espiga

1 RESUMO

O uso sucessivo de híbridos de milho com resistência variada aos fungos causadores de podridão de grãos, têm causado aumento na importância destas doenças a cada ano. Este trabalho teve como os objetivos: avaliar pelo teste de sanidade (blotter test) a severidade do fungo *Fusarium verticillioides* e a incidência dos fungos *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em grãos de milho, em grãos de híbridos comerciais, com e sem a inoculação artificial a campo, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de semeadura direta e em dois anos agrícolas. O experimento foi conduzido a campo, em blocos casualizados, com três repetições. Em laboratório, foram avaliadas, pelo método de “blotter test”, a severidade do fungo *F. verticillioides* e a incidência dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora* causadores de podridões de espiga. A avaliação pelo teste de sanidade (blotter test) permite detectar diferenças entre híbridos quanto a reação aos fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*. Há influência do híbrido, da safra agrícola e do sistema de cultivo sobre a infecção dos fungos causadores de podridões de espigas. É correta a utilização da inoculação artificial, em campo, visando selecionar genótipos resistentes aos fungos causadores do “complexo de grãos ardidos”.

2 ABSTRACT

The successive use of corn hybrids with varied resistance to fungal agents causing grain rot, has caused an increase in the importance of these diseases every year. This work had as objectives: to evaluate, by the sanitary test (blotter test), the severity of the fungus *Fusarium verticillioides* and the incidence of *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* in corn grain, commercial hybrids, with and without in-field artificial inoculation, under two cultivation systems, conventional and direct sowing system in two crop seasons. The experiment was carried out under field conditions, in a randomized blocks experimental design, with three replications. In the laboratory, the severity of *F. verticillioides* and the incidence of *S. maydis* and *S. macrospora*, the causative agents of ear rot in corn, were accomplished by the “blotter test” method. The evaluation by the blotter test allows detect differences among hybrids in their reaction to the fungi *F. verticillioides*, *S. maydis* and *S. macrospora*. There is an influence of the hybrid, from crop season and from cultivation system upon the infection by the fungi causing corn ear rot. The direct sowing system favors the increase of the fungi infection responsible for the grain rot in corn. The use of artificial inoculation, in field, to select genotypes resistant to the fungal agents causing the “grain rot complex” is correct.

3 INTRODUÇÃO

Os grãos ardidos em milho são reflexos das podridões de espigas, causadas principalmente, pelos fungos presentes no campo, como o *Fusarium verticillioides*, *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora*. Muitas dessas espécies, além de causar danos físicos (descoloração dos grãos, redução nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais), causam perdas qualitativas, pela produção de compostos tóxicos, chamados de micotoxinas, sendo uma ameaça a saúde animal e humana (Pinto, 2001).

Ao longo dos últimos anos tem se observado um avanço das doenças nesta cultura, como consequência do estreitamento das relações patógeno-hospedeiro-ambiente (Costa, 2001). Aparentemente, o aumento na incidência e na severidade das doenças pode ser explicado por vários dos fatores que contribuíram para o crescimento da produção (aumento de área, população de plantas, manejo de doenças e disponibilidade hídrica) e também pelo deslocamento da cultura para novas regiões (Oliveira, 2000).

O controle das podridões de grãos envolve ações integradas, dentre elas destacam-se o manejo dos restos culturais, a rotação de culturas e a utilização de cultivares resistente. Porém, cada vez mais tem se tornado uma prática comum, a utilização por parte de alguns agricultores, de híbridos com resistência variada, aos fungos causadores de podridão de grãos, fazendo com que a importância destas doenças aumente a cada safra.

Para a identificação de híbridos de milho resistentes ao complexo de fungos, causadores de grãos ardidos em milho, as empresas produtoras de sementes, têm utilizado muito a inoculação artificial (Klapproth & Hawk, 1991; Bensch et al., 1992).

Por outro lado, é de suma importância a diagnose e a identificação, em laboratório, dos fungos que estão incidindo sobre os grãos. O teste de sanidade

(método de blotter test) é uma alternativa prática e viável para esta finalidade. Este teste permite, além de uma melhor avaliação da resistência dos genótipos, aos fungos causadores de podridões de espigas, estudar a reação a cada espécie de fungo separadamente (Mario & Reis, 2001; Casa et al., 2006).

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar pelo teste de sanidade (blotter test) a severidade do fungo *Fusarium verticillioides* e a incidência dos fungos *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em grãos de milho, oriundos de híbridos comerciais, com e sem a inoculação artificial a campo, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de semeadura direta e em dois anos agrícolas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das áreas experimentais a campo

A caracterização das áreas experimentais, bem como, a condução dos experimentos foi à mesma descrita anteriormente nos item 4.1, na página 20 do capítulo 2.

4.2 Tratamentos e delineamento experimental a campo

Os tratamentos e delineamentos experimentais utilizados a campo foram os mesmo descritos anteriormente nos item 4.2, na página 22 do capítulo 2.

Posteriormente, no laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, foram instalados dois novos experimentos, para avaliação do teste de sanidade “blotter test”. Para a realização destes testes, foram utilizadas amostras de grãos compostas, oriundas das três repetições de cada tratamento conduzido em campo. O primeiro experimento foi conduzido, visando avaliar a severidade do fungo *F. verticillioides*, e o segundo, a incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (10 x 2), sendo os dez híbridos e os dois tratamentos, sendo o primeiro (inoculado com o fungo *F. verticilioides* e o tratamento testemunha), e o segundo (inoculado com o fungo *S. maydis* e o *S. macrospora*), o tratamento testemunha foi conduzido até o 15º dia para análise de incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*.

4.3 Obtenção, produção do inóculo e métodos de inoculação.

A descrição da obtenção, produção de inóculo e os métodos de inoculação esta descrita anteriormente nos item 4.3, na página 23 do capítulo 2.

4.4 Avaliação da qualidade sanitária de grãos

De cada amostra composta foram retirados 100 grãos, os quais foram dispostos em quatro placas de petri, contendo três lâminas de papel de filtro embebidos com meio BDA. Em cada placa de petri, foram dispostos vinte e cinco grãos equidistantes. Estas placas permaneceram a temperatura ambiente por 24 horas e após este período, foram levadas por mais 24 horas a um freezer de onde saíram para serem incubados a 25 ± 2 ° C e fotoperíodo de 12 h, conforme método descrito por Mario & Reis (2001). Após 5 dias de incubação foram avaliadas a severidade de *F. verticilioides* e a testemunha, e no 15º dia após incubação avaliou-se a incidência dos fungos *S. macrospora* e *S. maydis*.

Para a avaliação de severidade do fungo *F. verticilioides*, estabeleceu-se adicionalmente uma escala de notas, baseada no percentual da superfície de cada semente recoberta por estruturas típicas dos fungos, para isto, utilizou-se um microscópio estereoscópico. A escala de notas adotada foi à seguinte: (0) semente sadia; (1) até 25% da semente recoberta por estruturas fúngicas; (2) até 50% da semente recoberta por estruturas fúngicas; (3) mais de 50% da semente recoberta por estruturas fúngicas. Para se determinar a severidade de infecção

por semente, utilizou-se uma adaptação da metodologia proposta por McKinney (1923):

$$SI/S = \frac{\sum(f \times n)}{F \times N} \times 100$$

em que:

(SI/S): severidade de inóculo por semente observada; (f): nota da escala atribuída à semente observada; (n): número de sementes que receberam a nota (f); (F): nota máxima da escala, e (N): número total de sementes avaliadas por repetição.

Decorridos os períodos de incubação citados e com o auxílio de um microscópio estereoscópico, procedeu-se ao exame individual das sementes de milho, computando o percentual de incidência dos fungos *S. macrospora* e *S. maydis*.

4.5 Análise estatística

Inicialmente realizou-se a análise de variância individual e posteriormente a análise conjunta envolvendo os dois anos agrícolas para cada sistema de cultivo. Quando necessário, os dados obtidos foram transformados em log x e submetidos ao teste de médias Skott Knott, através do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento de Lavras (Sistema convencional de cultivo)

Nas Tabelas 4A e 5A , estão apresentados os resumos das análises de variância individuais para a severidade de *F. verticilioides* e incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*, nas duas safras agrícolas. Foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre todas as fontes de variação (híbridos, inoculações e interação híbridos x inoculações). A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) variou entre as características. O maior valor de CV foi observado para incidência das *S. maydis* e *S. macrospora* (46,33%) e o menor, para severidade do *F. verticilioides* (8,56%). Vale ressaltar que valores elevados de CV, acima de 20%, ocorreram devido a várias avaliações apresentarem valores nulos.

O resumo da análise de variância conjunta envolvendo os dois anos (safras), estão apresentados na Tabela 13. Para a severidade do *F. verticilioides* houve significância ($P \leq 0,01$) para híbridos, safras, inoculações e para a interação híbridos x safras, híbridos x inoculações e para a interação tripla híbridos x safras x inoculações. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) foi de 10%.

Para a incidência de *S. maydis* e *S. macrospora* houve significância ($P \leq 0,01$) para todas as fontes de variações, com exceção de safras (Tabela 13).

TABELA 13 Resumo da análise de variância conjunta envolvendo as duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) em sistema convencional de cultivo, para as avaliações de severidade de *F. verticillioides* e incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*.

Fonte de variação	GL ¹	QM	
		SEVERIDADE	INCIDENCIA
Bloco (Safr)	6	12,47	24,10
Híbridos (H)	9	89,29**	456,10**
Inoculações (I)	1	640,00**	4796,10**
Safras (S)	1	6330,25**	8,10 ^{NS}
H*I	9	64,04*	370,76**
H*S	9	73,30**	223,65**
I*S	1	33,85 ^{NS}	1232,10**
H*I*S	9	126,98**	204,54**
Erro	114	18,98	27,67
CV (%)		10,17	40,55
Média Geral		42,85	12,97

¹ grau de liberdade para o experimento de avaliação de severidade e de incidência

** P≤0,01; ^{NS} Não significativo.

A seguir são apresentados os resultados médios da severidade do fungo *F. verticillioides* e incidência dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*, considerando a significância das fontes de variação na análise conjunta envolvendo as duas safras agrícolas.

5.1.1 Severidade do fungo *F. verticillioides*

Na primeira safra (2006/07) os valores obtidos na avaliação da severidade, pelo teste de sanidade (blotter test), foram maiores nos tratamentos inoculados artificialmente com o fungo *F. verticillioides*, comparado ao tratamento testemunha (sem inoculação) (Tabela 14). Os híbridos AG 6018 e AG 8021 apresentaram os menores valores de severidade no tratamento inoculado artificialmente evidenciando uma maior resistência ao fungo *F.*

verticilioides. É importante enfatizar que estes híbridos estão no grupo de híbridos considerados resistentes, pelas empresas produtoras de sementes,.

TABELA 14 Médias de severidade do fungo *Fusarium verticilioides* (F) e do tratamento testemunha (T), sem inoculação, considerando dez híbridos de milho em sistema convencional de cultivo, analisados nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08.

Híbrido	SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
	F	T	F	T
AG 6018	33,20 aB	26,00 aA	46,60 bA	44,00 aA
AG 8021	32,00 aA	29,20 aA	49,40 bA	45,20 aA
DKB 199	38,60 bB	28,00 aA	46,40 bA	38,00 bA
2 A 525	40,00 bB	30,60 aA	41,80 aA	41,60 aA
NB 7215	42,80 bB	32,80 aA	51,60 cA	49,00 bA
DKB 350	46,60 cB	36,40 bA	57,60 cB	50,80 bA
DKB 390	47,20 cA	35,60 bA	49,80 bA	50,60 bA
P 30F53	40,80 bB	31,60 aA	49,40 bA	51,80 bA
2 B 710	43,20 bB	38,40 bA	52,00 cA	47,80 bA
NB 7210	45,80 cB	32,40 aA	54,20 cB	47,20 bA
MEDIA	41,02A	32,10B	49,88^a	46,60A

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Os híbridos DKB 350, DKB 390 e NB 7210, pertencentes ao grupo considerado susceptíveis à podridão de grãos, apresentaram os maiores valores de severidade, quando inoculados com o fungo *F. Verticilioides*.

A média da severidade do tratamento inoculado com *F. verticilioides* foi de 41,02%, sendo superior a média obtida no tratamento testemunha (sem inoculação) que foi de 32,10%. Este fato comprova o efeito das inoculações, mesmo em condições adversas ao desencadeamento das podridões de espiga.

O híbrido 2 A 525 apresentou os menores valores de severidade na segunda safra (2007/08), quando submetido a inoculação artificial, e enquadrou-se no grupo de híbridos que obteve os menores valores para a infecção natural

(sem inoculação), compostos dos híbridos AG 6018 e AG 8021, não diferindo estatisticamente (Tabela 14). Este resultado comprova os dados repassados pela empresas produtoras de sementes, visto que estes híbridos são considerado resistentes aos fungos causadores de grãos ardidos.

De maneira geral, os valores médios de severidade do fungo *F.verticilioides*, foram maiores na segunda safra (2007/08), para ambos os tratamentos, com inoculação e sem inoculação (Tabela 14). Estes valores já eram esperados, pois na segunda safra (2007/08) houve um maior índice de pluviosidade na fase final do ciclo da cultura o que favorece a incidência deste fungo.

Os altos valores de severidade obtidos, mesmo no tratamento testemunha (sem inoculação), alertam para os cuidados que devem ser tomados quanto a utilização desses grãos na alimentação de animais, ou mesmo para seres humanos. Principalmente, devido a possível produção de micotoxinas, pelo fungo *F.verticilioides*.

É importante enfatizar que, os híbridos considerados susceptíveis ao complexo “grãos ardidos” foram os que obtiveram os maiores valores de severidade do fungo *F.verticilioides*. Outro fato importante, é que a severidade dos tratamentos inoculados foi superior ao tratamento testemunha (sem inoculação) evidenciando, mais uma vez, o efeito das inoculações artificiais a campo. O fato de ter havido a presença do fungo *F. Verticilioides*, nas parcelas não inoculadas, pode ser explicado com base nas características do fungo, que apresenta elevada esporulação e taxa de dispersão atmosférica.

5.1.2 Incidência dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*

Embora trabalhos semelhantes conduzidos em condições de campo por Mario & Reis (2003), tenham encontrado *S. macrospora*, em tratamentos foi feito inoculação artificial da *S. maydis*, o mesmo não ocorreu nesta pesquisa. Vale salientar também que, na avaliação pelo teste de sanidade (blotter test) no

tratamento testemunha (sem inoculação), não foi constatado a incidência dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*, mesmo após 20 dias de encubação.

Na primeira safra (2006/07) os híbridos considerados susceptíveis obtiveram valores de incidência de *S. maydis* superiores a media geral que foi de 22 %. O híbrido DKB 390, considerado susceptível, foi o que apresentou a maior incidência, 59,00% (Tabela 15). Esses valores são considerados suficientes para permitir diferenciar níveis de resistência. Segundo trabalhos de Flett & McLaren (1994) é necessário uma incidência mínima de 17%, para que sejam detectadas diferenças quanto à reação de híbridos a *Stenocarpella spp.*

TABELA 15 Médias de incidência dos fungos *Stenocarpella maydis* (MY) e *Stenocarpella macrospora* (MA) em 10 híbridos de milho em sistema convencional de cultivo, nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08.

Híbrido	MY		MA	
	2006/07	2007/08	2006/07	2007/08
AG 6018	10,00 aA	12,00 aA	7,00 aB	11,00 aA
AG 8021	12,00 bA	9,00 aA	4,00 aA	9,00 aA
DKB 199	15,00 bA	6,00 aB	4,00 aA	4,00 aA
2 A 525	16,00 bA	10,00 aA	4,00 aA	7,00 aA
NB 7215	6,00 aA	12,00 aA	4,00 aA	9,00 aA
DKB 350	16,00 bA	18,00 bA	3,00 aA	9,00 aA
DKB 390	59,00 dA	24,00 bB	6,00aA	15,00 bA
P 30F53	27,00 bB	24,00 bA	5,00 aA	11,00 aA
2 B 710	36,00 cA	21,00 bB	4,00 aA	15,00 bA
NB 7210	25,00 bA	19,00 bA	4,00 aA	13,00 bA
MEDIA	22,20 A	15,50 B	4,50 B	10,30 A

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Não houve diferença significativa entre os híbridos para a incidência de *S. macrospora* na primeira safra (2006/07), sendo que a incidência de *S. macrospora* foi em média cinco vezes inferior a de *S. maydis* (Tabela 5). Estes

dados diferem dos obtidos por Mario (2003), em experimentos conduzidos em plantio direto, no Estado do Rio Grande do Sul, onde após a inoculação artificial dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*, obteve-se valores de incidência de *S. macrospora* quatro vezes superior.

Houve diferença significativa para os valores de incidência de *S. maydis* nos híbridos avaliados na segunda safra (2007/08). Os valores de incidência *S. maydis*, obtidos pelos híbridos considerados resistentes, ficaram abaixo da média observada (10,30%) e diferiram estatisticamente, dos valores obtidos para os híbridos considerados susceptíveis (Tabela 15). Estes dados confirmam os resultados repassados pelas empresas produtoras de sementes quanto a resistência dos híbridos aos fungos causadores do “complexo grãos ardidos”.

Na segunda safra (2007/08) houve diferença entre os híbridos para a incidência de *S. macrospora*, sendo os híbridos que obtiveram a maior incidência o DKB 390, 2 B 710 e NB 7210, com os valores de 15,0, 15,0 e 13,0% de incidência, respectivamente.

5.2 Experimento de Luminárias (Sistema de Plantio Direto)

Os resumos das análises de variância individuais para a severidade de *F. verticillioides* e incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*, nas duas safras agrícolas, estão apresentados na Tabela 6A e 7A. Foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$ e $P \leq 0,05$) entre os híbridos, inoculações e híbridos x inoculações, nas duas safras agrícolas, para as características avaliadas, com exceção para a interação híbridos x inoculação na safra 2007/08 para a severidade de *F. verticillioides*. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) variou entre as características. O maior valor de CV foi observado para incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*, (41,42%) e o menor, para severidade do fungo *F. verticillioides* (9,36%).

O resumo da análise de variância conjunta envolvendo os dois experimentos em sistema de plantio direto, estão apresentados na Tabela 16. Para a severidade do *F. verticilioides* houve significância ($P \leq 0,01$) para híbridos e inoculações e para a interação híbridos x safras, híbridos x inoculações e para a interação tripla híbridos x safras x inoculações. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) ficou com valores abaixo de 10 %.

Para a incidência de *S. maydis* e *S. macrospora* houve significância ($P \leq 0,01$) para todas as fontes de variações, menos para as safras (2006/07 e 2007/08) (Tabela 16). A incidência e severidade dos fungos causadores do complexo de grãos ardidos, *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, foram influenciada pelo híbrido, pela safra agrícola e pelas inoculações artificiais, em plantio direto. O valor de coeficiente de variação (CV) foi de 42,29%, devido aos valores obtidos próximo de zero na avaliação.

TABELA 16 Resumo da análise de variância conjunta envolvendo as duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) em sistema plantio direto, para as avaliações de severidade de *F. verticilioides* e incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

Fonte de variação	GL	QM	
		SEVERIDADE	INCIDENCIA
Bloco (Saфра)	6	37,71	17,70
Híbridos (H)	9	87,09**	776,45**
Inoculações (I)	1	5560,16**	0,90 ^{NS}
Safras (S)	1	8,10 ^{NS}	1188,10**
H*I	9	141,35**	286,67**
H*S	9	117,11**	343,21**
I*S	1	133,95*	532,90**
H*I*S	9	64,78**	184,90**
Erro	114	27,62	39,84
CV (%)		9,95	42,29
Média Geral		52,80	14,92

¹ grau de liberdade para o experimento de avaliação de severidade e de incidência

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

De maneira geral, os valores médios de severidade e incidência dos fungos *F.verticilióides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, foram maiores no sistema de plantio direto, quando comparado com os valores obtidos no sistema convencional. Estes valores já eram esperados, pois o sistema de plantio direto atua como fonte de inóculo, pois se tratam de fungos necrotóficos e sobrevivem nos restos culturais, causando conseqüentemente uma maior infecção nos grãos produzidos. Este problema se agrava ainda mais, devido a maioria dos produtores do Sul de Minas Gerais adotarem a prática do monocultivo, milho sobre milho, nas safras de verão.

A seguir serão apresentados os resultados médios da severidade e incidência dos fungos *F. verticilioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, considerando a significância das fontes de variação na análise conjunta envolvendo os dois experimentos em plantio direto.

5.2.1 Severidade do fungo *F. verticilioides*

Na avaliação conjunta envolvendo os dados de qualidade sanitária “blotter test”, a severidade para o tratamento inoculado com o fungo *F. verticilioides*, foi maior na primeira safra (2007/08). Esse resultado não ocorreu no sistema de plantio direto, onde a maior severidade ocorreu na segunda safra (2006/07). Porém independente do sistema de cultivo a severidade dos tratamentos inoculados foram superiores ao tratamento testemunha (sem inoculação) evidenciando o efeito das inoculações.

Os híbridos que apresentaram os menores valores de severidade na primeira safra (2006/07), para o tratamento testemunha (sem inoculação), foram o AG 6018 e o 2 A 525, sendo estes híbridos pertencentes ao grupo considerado resistente aos fungos causadores de podridões de espigas (Tabela 17).

TABELA 17 Médias de severidade do fungo *Fusarium verticillioides* (F), e do tratamento testemunha (T), sem inoculação, em 10 híbridos de milho em plantio direto, nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

Híbrido	SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
	F	T	F	T
AG 6018	58,80 aB	35,00 aA	54,80 aB	42,20 aA
AG 8021	58,40 aB	45,60 bA	54,40 aB	46,60 bA
DKB 199	59,20 aA	56,40 cA	53,40 aB	45,60 bA
2 A 525	55,40 aB	40,40 aA	56,00 aA	50,80 bA
NB 7215	62,80 bB	49,20 cA	55,20 aB	37,00 aA
DKB 350	52,60 aA	46,40 bA	55,60 aA	52,60 bA
DKB 390	60,20 bB	43,00 bA	61,20 bB	49,60 bA
P 30F53	56,60 aB	43,80 bA	53,40 aA	50,20 bA
2 B 710	61,40 bB	51,80 cA	66,60 bB	53,60 bA
NB 7210	68,00 bB	50,60 cA	61,00 bB	47,80 bA
MÉDIA	59,34 A	46,22 B	57,16 A	47,60 B

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Ainda na primeira safra (2006/07), quando feito a inoculação, os híbridos que apresentaram a maior severidade do fungo *F. verticillioides*, foram o NB 7210, 2 B710 e DKB 390, pertencentes ao grupo considerado susceptíveis aos grãos ardidos e o NB 7215 pertencente ao grupo considerado susceptível. Neste caso a infecção foi superior a 60%.

Na segunda safra (2007/08), analisando a infecção natural no tratamento testemunha (sem inoculação), os híbridos que obtiveram os menores valores de severidade foram o AG 6018 e NB7215, pertencentes ao grupo considerado resistentes ao “complexo grãos ardidos”(Tabela 7).

As maiores severidades obtidas nos tratamentos inoculados da segunda safra (2007/08) foram para os híbridos pertencentes ao grupo susceptível aos grãos ardidos, sendo os híbridos: NB 7210, DKB 390 e 2B710, com severidades superiores aos 60%. Estes resultados confirmam os dados repassados pela

empresas produtoras de sementes, quanto a resistência desses híbridos aos fungos causadores do “complexo de grãos ardidos”.

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, podemos inferir que os híbridos se comportaram de forma diferente, quanto à resistência ao fungo *F. verticillioides*. Ficou evidente a necessidade de pesquisas, que visem elucidar os mecanismos associados a infecção das plantas

Vale salientar ainda, que o teste de sanidade utilizado mostrou alta severidade do fungo *F. verticillioides*, tanto no tratamento testemunha, como principalmente no tratamento inoculado, independente da safra agrícola. Estes resultados são bastante expressivos, visto que, o fungo pode vir a ocasionar perdas qualitativas, devido a produção de compostos toxinogênicos, podendo causar sérios prejuízos, se utilizado para a alimentação de animais e seres humanos Pinto et al. (2001).

5.2.2 Incidência dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*

Para os valores de incidência de podridão branca, causada pelos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*, a avaliação individual e conjunta evidenciou o efeito das inoculações quando comparado com o tratamento testemunha (sem inoculação). Somente no tratamento inoculado com *S. maydis* e *S. macrospora*, ocorreu o aparecimento dos sintomas nos grãos avaliados pelo “blotter test”.

Na avaliação da primeira safra (2006/07) para a incidência de *S. maydis* os híbridos DKB 390 e 2 B 710 obtiveram os maiores valores de 36 e 30 %, respectivamente (Tabela 18). Estes valores foram muito expressivos, pois estiveram acima dos valores considerados suficientes para identificar resistência a *Stenocarpella spp.*, entre híbridos de milho que é de 17%. Estes híbridos estavam enquadrados no grupo de híbridos considerados susceptíveis aos fungos causadores de grãos ardidos em milho, evidenciando a correta recomendação por parte das empresas produtoras de sementes.

Na primeira safra (2006/07) não houve diferença entre os híbridos inoculados com o fungo *S. macrospora* (Tabela 18). Vale salientar que, na primeira safra (2006/07), as médias de incidência de *S. maydis* foram superiores a incidência de *S. macrospora* (Tabela 8).

Os híbridos que apresentaram maior incidência de *S. maydis*, na segunda safra (2007/08) foram o DKB 390, 2 B 710, NB 7210 e DKB 350, com as seguintes porcentagens médias 26, 26, 25 e 20 %.

TABELA 18 Médias de incidência de *Stenocarpella maydis* (M) e *Stenocarpella macrospora* (MA) em 10 híbridos de milho em plantio direto, nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

Híbrido	MY		MA	
	2006/07	2007/08	2006/07	2007/08
AG 6018	10,00 aA	9,00 aA	10,00 aA	9,00 aA
AG 8021	8,00 aA	11,00 aA	11,00 aA	6,00 aA
DKB 199	9,00 aA	8,00 aA	8,00 aA	8,00 aA
2 A 525	8,00 aA	6,00 aA	13,00 aA	12,00 aA
NB 7215	6,00 aB	12,00 aA	10,00 aB	19,00 aA
DKB 350	11,00 aA	20,00 bA	12,00 aA	16,00 aA
DKB 390	36,00 bA	26,00 bB	11,00 aB	28,00 bA
P 30F53	8,00 aA	11,00 aA	8,00 aA	7,00 aA
2 B 710	30,00 bA	26,00 bA	9,00 aB	39,00 cA
NB 7210	15,00 aB	25,00 bA	11,00 aB	50,00 dA
MÉDIA	14,10 A	15,40 A	10,30 B	19,40 A

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Para a incidência de *S. macrospora* na segunda safra (2007/08) os híbridos que obtiveram os maiores valores foram o NB 7210, 2 B 710 e DKB 390, com 50, 39 e 28%, respectivamente. Vale lembrar que, na primeira safra (2006/07) não ocorreu diferenças entre os híbridos para a incidência de *S. macrospora*. Este fato pode ser atribuído a maior concentração de chuvas

ocorridas no final do ciclo da cultura, na segunda safra (2007/08), o que favoreceu a maior infecção do patógeno.

Segundo Mario (2003) e Del Rio (1990) a *S. macrospora* é provavelmente, um competidor mais eficiente pelo sítio de infecção do milho, quando comparado a *S. maydis*. Provavelmente, em condições ideais de ambiente e com a presença das duas *Stenocarpellas*, a incidência de *S. macrospora* seja maior que a de *S. maydis*. Estas considerações podem explicar também, o fato da incidência *S. macrospora* ter sido superior à de *S. maydis*, na segunda safra (2007/08) (Tabela 18).

De maneira geral para o sistema de plantio direto, os maiores valores de incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*, ocorreram na segunda safra (2007/08). Este fato pode ser atribuído a dois fatores, sendo o primeiro ao maior índice de chuvas ocorrido no final de ciclo da cultura (Figura 2), e o segundo, à maior disponibilidade de inóculo nos restos culturais, de onde os esporos podem ter sido liberados e transportados pelo vento até o sítio de infecção. Isso foi relatado também por Mario & Reis (2003).

É importante enfatizar que os resultados desta pesquisa evidenciaram a importância de quantificar em laboratório, a severidade do fungo *F. verticillioides* e a incidência dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora* em grãos de milho. Isto mostra a possibilidade de se selecionar genótipos resistentes a estes fungos, causadores de podridão de grãos e espigas.

6 CONCLUSÕES

A avaliação pelo teste de sanidade (blotter test) permite detectar diferenças entre híbridos quanto a reação aos fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*.

Há influência do híbrido, da safra agrícola e do sistema de cultivo sobre a infecção dos fungos causadores de podridões de espigas.

É correta a utilização da inoculação artificial, em campo, visando selecionar genótipos resistentes aos fungos causadores do “complexo de grãos ardidos”.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENSCH, M.J.; STADEN, J. van.; RIJKENBERG, J.H.F. Time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, v.136, p.265-269, 1992.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do Milho Causadas por Fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.5, set./out. 2006

COSTA, F.M.P. **Severidade de *Phaeosphaeria maydis* e rendimento de grãos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes ambientes e doses de nitrogênio.** 2001. 99p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

DEL RIO, L. Maiz muerto en Honduras provocado pôr el complejo Diplodia Y Fusarium. **Manejo Integrado de Plagas**, v.18, p.42-53, 1990.

FERREIRA, D.F. **SISVAR Sistemas de análises de variância para dados balanceados:** programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA/DEX, 2002. Software.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Optimum disease potential for evaluating resistance to *Stenocarpella maydis* ear rot corn hybrids. **Plant Disease**, v.78, p.587-589, 1994.

KLAPPROTH, C.J.; HAWK, A.J. Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. **Plant Disease**, v.75, p.1057-1060, 1991.

MARIO, J.L.; REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.670-672, 2001.

MARIO, J.L.; REIS, E.M. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.143-147, 2003.

McKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Vol. 6: 195-218p . 1923.

OLIVEIRA, 2000, E.; FERNANDES, F.T.; PINTO, N.F.J.A. **Doenças do milho**: identificação e controle. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 84p.

PINTO, N.F.J.A. **Qualidade sanitária de grãos de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 4p. (Comunicado Técnico, 30).

Capítulo 4

**Qualidade grãos e produção de fumonisina em híbridos de milho inoculados
com *fusarium verticillioides* em diferentes sistemas de manejo**

1 RESUMO

O fungo *Fusarium verticillioides* é um dos principais patógenos de grãos de milho no campo, causando além das podridões de espigas, doenças em animais e seres humanos, devido a compostos secundários produzidos pelo fungo, dentre eles, as fumonisinas B1 e B2. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os teores de fumonisina B1 e B2 em híbridos de milho, com e sem inoculação do fungo *Fusarium verticillioides*, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de plantio direto em dois anos agrícolas. O experimento foi conduzido em duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) nos municípios de Lavras, MG e Luminárias, MG, em blocos casualizados com três repetições. Foram avaliados os teores de fumonisina B1 e B2 nos grãos de milho. Com base nos resultados obtidos podemos concluir que, a inoculação artificial a campo, com o fungo *Fusarium verticillioides*, favoreceu o aumento da produção de fumonisinas B1 e B2 em grãos de milho, sendo influenciada pela safra agrícola, independente do sistema de cultivo. Há correlação positiva e significativa, porém de baixa magnitude, entre a porcentagem de grãos ardidos e os teores de fumonisinas, evidenciando a necessidade da utilização de testes laboratoriais para determinar os níveis desta micotoxina em grãos de milho. Existe correlação entre a porcentagem de grãos ardidos e o teste de sanidade “blotter test”, embora significativa, esta foi de baixa magnitude, isto evidencia, a necessidade de realização do teste de sanidade, visando identificar e selecionar híbridos mais resistentes ao ataque do fungo *Fusarium verticillioides*.

2 ABSTRACT

The fungus *Fusarium verticillioides* is one of the main pathogens in corn crop, causing, besides corn ear rot, diseases in animals and human beings, due to secondary compounds produced by the fungus, like fumonisins B1 and B2. This work had the objective of quantifying the fumonisin B1 and B2 levels in corn hybrids, with and without inoculation of the fungus *Fusarium verticillioides*, under conventional and direct planting systems in two crop seasons. The experiment was carried out in 2006/07 and 2007/08 in Lavras, MG and Luminárias, MG counties, Brazil. The experimental design was a randomized blocks, with three replications. The fumonisin B1 and B2 levels in corn grains were measured. Based on the results obtained it can be concluded that, the in-field artificial inoculation of *Fusarium verticillioides*, fumonisin B1 and B2 levels increased in corn grains, being influenced by the crop season but independently of the cultivation system. There is positive and significant correlation, although at low magnitude, between percentage of grain rot and fumonisin levels, showing evidence for the need of laboratory tests to determine the levels of this micotoxin in corn grains. The low positive correlation, although significant, between the percentage of grain rot and the sanitary test “blotter test”, indicates the need for the use of this test to identify and select hybrids more resistant to *Fusarium verticillioides* infection.

3 INTRODUÇÃO

A cultura do milho é constantemente exposta a fungos que podem iniciar seu ataque no campo, durante o desenvolvimento da planta, como também podem ser encontrados no armazenamento, caso as condições de temperatura e umidade sejam adequadas para os seu desenvolvimento. As possíveis contaminações podem ocorrer devido a presença de esporos e fragmentos de micélios presentes no solo, de restos de plantas e sementes, ou ainda podem ser transportados pelo vento, chuva ou insetos (Mills, 1989).

O *Fusarium verticillioides* (sacc.) Nirenb é o fungo mais frequentemente encontrado em grãos de milho recém colhidos, com níveis de contaminação de até 100%, podendo causar redução na germinação, morte de plântulas, podridão de raízes e colmo e podridão de grãos (Orsi et al., 2000 e Silva et al., 2001). O patógeno pode ainda afetar a qualidade dos grãos pela produção de compostos tóxicos, como as fumonisinas.

Os compostos tóxicos nada mais são que, metabólitos secundários, chamados de micotoxinas, presentes em grãos ou sementes de milho e outros cereais, produzidos principalmente por espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Estas toxinas são capazes de produzir efeitos tóxicos agudos e crônicos em animais e humanos, estando associados a diversas doenças (Hirooka et al., 1996; Osweiler et al., 1992; Henry & Wyatt, 1994).

O *Fusarium verticillioides* é o fungo produtor de dezesseis tipos de fumonisina: A1, A2, A3, AK1, B1, B2, B3, B4, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1A E PH1B (Musser & Plattner, 1997; Ah-Seo & Won Lel, 1999). A Fumonisina B1 é a forma molecular mais produzida pelo fungo. O mecanismo de ação das fumonisinas está relacionado com o bloqueio na síntese dos esfingolipídeos, substância importante para a integridade da membrana celular e transporte iônico através das células. Os esfingolipídios são predominantes no sistema nervoso

central e periférico, principalmente como lipídeo da mielina, estando localizados nos oligodendrócitos e células de Schwann (Wang et al., 1991), causando sérios problemas na alimentação de aves e suínos (Osweiler et al., 1992; Henry & Wyatt, 1994).

Altas temperaturas e pluviosidade intensa são capazes de favorecer o acúmulo de fumonisinas B1 e B2 em grãos de milho, principalmente se estiverem contaminados com *F. verticilloides*, sendo que os maiores acúmulos são registrados na safra de verão. Alguns estudos avaliaram os diferentes tipos de endosperma do grão e também o ciclo dos cultivares de milho, porém não foram encontradas nenhuma correlação destas características com a produção de fumonisina B1 e B2 (Machinski Jr. et al., 2000).

Vários trabalhos de pesquisa tem demonstrado que existem diferenças no comportamento de cultivares de milho, quanto ao acúmulo de fumonisinas, o que evidencia a resistencia de alguns cultivares, sugerindo a possibilidade de seleção destes para locais específicos (Camargos et al., 2000; Hermanns et al., 2006 e Pinto et al., 2007). Até então sabe-se que a fase de grão farináceo é crítica no que diz respeito à produção de fumonisinas, servindo de alerta para a necessidade da adoção de medidas preventivas do ponto de vista micotoxicológico.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a porcentagem de grãos ardidos, a incidência pelo método de “blotter test” e quantificar os teores de fumonisina B1 e B2 em híbridos de milho, com e sem inoculação do fungo *Fusarium verticilloides*, em dois sistemas de cultivo, convencional e sistema de plantio direto e em dois anos agrícolas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das áreas experimentais a campo

A caracterização das áreas experimentais, bem como, a condução dos experimentos foi à mesma descrita anteriormente nos item 4.1, na página 20 do capítulo 2.

4.2 Tratamentos e delineamento experimental a campo

Os tratamentos e delineamentos experimentais utilizados a campo foram os mesmo descritos anteriormente nos item 4.2, na página 22 do capítulo 2.

Posteriormente, no laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, foram instalados dois novos experimentos, para avaliação do teste de sanidade “blotter test”. Para a realização destes testes, foram utilizadas amostras de grãos compostas, oriundas das três repetições de cada tratamento conduzido em campo. O primeiro experimento foi conduzido, visando avaliar a severidade do fungo *F. verticillioides*, e o segundo, a incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (10 x 2), sendo os dez híbridos e os dois tratamentos, sendo o primeiro (inoculado com o fungo *F. verticillioides* e o tratamento testemunha), e o segundo (inoculado com o fungo *S. maydis* e o *S. macrospora*), o tratamento testemunha foi conduzido até o 15º dia para análise de incidência de *S. maydis* e *S. macrospora*.

4.3 Obtenção, produção do inóculo e métodos de inoculação.

A descrição da obtenção, produção de inóculo e os métodos de inoculação esta descrita anteriormente nos item 4.3, na página 23 do capítulo 2.

4.4 Determinação de fumonisinas

Para as análises de fumonisinas B1 e B2, 80 amostras compostas de 500g de grãos, oriundas das três repetições realizadas a campo, foram encaminhadas ao laboratório LAMIC, no campus da UFSM, em Santa Maria, RS. Estas amostras são provenientes dos tratamentos inoculados com o fungo *F. verticillioides* e testemunha (sem inoculação), referentes aos dois anos agrícolas dentro de cada sistema de cultivo, sendo que, para determinar os teores de fumonisinas nas amostras, foram realizadas análises em duplicata.

A metodologia utilizada foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) acoplada a um detector de massas (LC-MS). Esta técnica permite além da separação e análise dos compostos de uma amostra, a confirmação da identidade e peso molecular destes compostos pelos fragmentos gerados no detector de massa. Sendo possível fazer a separação no detector de massas duas vezes, por esse motivo recebe o nome de LC – MS/MS.

Para a realização das análises de fumonisina, as amostras foram primeiramente moídas, e em seguida, pesadas 10 g de cada amostra e colocada em um Becker. Foram adicionadas 50 ml de uma solução de ACN:H₂O (1:1, v/v) para extração. Sendo as amostras homogeneizadas por 3 minutos, com o blender ligado. Posteriormente, as amostras foram filtradas, em papel de filtro, e pipetadas 1 mL extrato para um frasco de vidro. Foram retiradas 20µL de cada amostra, sendo adicionado a esta uma alíquota de 980 µL de ACN:água 1% ác. fórmico (50:50, v/v) para análises.

Para a realização das análises por LC-MS/MS, foi utilizada a coluna: Eclipse XDB C8 125 X 4mm, sendo a fase móvel o Ácido Fórmico 1 % / Acetonitrila / ácido fórmico 1% (65:35, v/v). O tempo médio para a análise da cromatografia foi de 10 minutos, sendo feitas análises em duplicata. Os dados obtidos foram expressos em ppb.

4.5 Análise estatística

Realizou-se a análise de variância individual para os teores de fumonisina, sendo os dados transformados em log x, quando necessário. Os dados obtidos foram submetidos ao teste médias Skott Knott, através do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2002).

Posteriormente, procedeu-se análise conjunta envolvendo os dois anos agrícolas dentro de cada sistema de cultivo, para a variável analisada.

Obtiveram-se também, correlações simples de Pearson, entre as características (porcentagem de grãos ardidos, teste de sanidade “blotter test” e teores de fumonisinas). Para isso, foram importados os dados médios de porcentagem de grãos ardidos, do Capítulo 2, Tabelas 5 e 9, páginas 37 e 44, e do teste de sanidade “blotter test”, do Capítulo 3, Tabelas 14 e 17, páginas 68 e 75, sendo que, ambos foram do tratamentos com o fungo *F. verticilioides* e o tratamento testemunha. Foi utilizado o programa estatístico GENES (Cruz, 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sistema convencional

De acordo com os resultados de análise de variância individuais para os teores de fumonisina, observou-se diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre os híbridos, inoculações e para a interação híbridos x inoculações, dentro de cada safra (2006/07 e 2007/08) (Tabela 8A). A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) variou entre as características. O maior valor de coeficiente de variação (CV) foi para a primeira safra (2006/07) com 89 % e o menor para a segunda safra (2007/08) com 31%. Isto ocorreu devido a várias parcelas apresentarem-se com valores nulos na análise em laboratório.

Os resumos das análises de variância conjunta envolvendo as duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08), estão apresentados na Tabela 19. Houve significância ($P \leq 0,01$) para híbridos, inoculações e safras e para as interações híbridos x inoculações, híbridos x safras e: híbridos x inoculações x safras. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) foi de 46 %.

TABELA 19 Resumo da análise de variância conjunta envolvendo as duas safras agrícolas (2006/07 e 2007/08) em sistema convencional, para a avaliação dos teores de fumonisinas B1 e B2 (FUMO), em ppb.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL ¹	QM
		FUMO
Bloco (Safrá)	1	346969,74
Híbridos (H)	9	2565458,66**
Inoculações (I)	1	11257126,12**
Safras (S)	1	12407456,63**
H*I	9	1248159,57**
H*S	9	295509,48**
I*S	1	153168,75 ^{NS}
H*I*S	9	1765612,72**
Erro	38	142293,26
CV (%)		46,42
Média Geral		812,69

¹ graus de liberdade para os teores de fumonisinas.

** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

A seguir são apresentados os resultados médios para os teores de fumonisina dentro de cada safra agrícola, considerando a significância das fontes de variação na análise conjunta.

5.1.1 Teores de fumonisina B1 e B2

Com relação à produção de fumonisina B1 e B2, na primeira safra (2006/07) não foram detectadas a presença de micotoxinas nas parcelas testemunhas (sem inoculação), onde ocorreu infecção natural. Porém em 70%

dos híbridos inoculados as amostras foram positivas para a micotoxina, sendo o maior valor encontrado no híbrido P 30F53 (4.633 ppb). Este dado é alarmante, visto que, este valor é superior ao limite tolerável a exposição a seres humanos, que é de 3.000 ppb (Sydenham et al.,1991). Os valores médios encontrados foram de 837,8 ppb, também considerados elevados, sendo que, estes valores capazes de causar edema pulmonar, em suínos e necrose hepática, em aves (Marasas et al., 1988 e Leudox et al., 1992).

Na segunda safra (2007/08) a presença de micotoxina foi bem superior, sendo detectadas em 100% das amostras, tanto nos tratamentos inoculados quanto no tratamento testemunhas (sem inoculação) (Tabela 20). O híbrido que apresentou os maiores valores, tanto para o tratamento inoculado com o fungo *F. verticillioides*, quanto no tratamento testemunha, foi NB 7210, sendo 4.595 e 2.074 ppb, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 20 Teores de fumonisina B1 e B2 em 10 híbridos de milho inoculados artificialmente com o fungo *Fusarium verticillioides* (F) e no tratamento testemunha (T), no sistema de manejo convencional, nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08. *

Híbrido	SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
	F	T	F	T
AG 6018	0,0 aA	0,0 aA	1899,0 bB	557,5 aA
AG 8021	96,5 aB	0,0 aA	813,5 aA	352,2 aA
DKB 199	54,0 aB	0,0 aA	551,0 aA	573,9 aA
2 A 525	1007,0 bB	0,0 aA	1380,5 aB	364,5 aA
NB 7215	0,0 aA	0,0 aA	2492,0 bB	531,5 aA
DKB 350	0,0 aA	0,0 aA	1617,5 bB	395,3 aA
DKB 390	1333,5 bB	0,0 aA	584,0 aA	232,8 aA
P 30F53	4633,0 cB	0,0 aA	998,0 aA	628,0 aA
2 B 710	281,5 aB	0,0 aA	1925,5 bB	924,5 aA
NB 7210	972,0 bB	0,0 aA	4595,0 cB	2704,0 bA
MÉDIA	837,8 A	0,0 B	1685,6 A	726,4 B

[†] Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Rottingaus et al. (1992) nos Estados Unidos, onde encontrou concentrações de FB1 e FB2 entre 100 e 5000 ppb, em 15% de amostras de milho analisadas. De maneira geral, estes resultados estão acima da resistência máxima de 1.000 ppb, imposta pelos padrões internacionais (Lazzari, 1997).

5.2 Sistema plantio direto

Na Tabelas 9A, estão apresentados os resumos das análises de variância individuais para os teores de fumonisinas B1 e B2, nas duas safras agrícolas. Foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,01$) entre os híbridos, inoculações e para a interação híbridos x inoculações. Sendo que o coeficiente de variação (CV) foi de 25,47% na primeira safra (2006/07) e de 21,06, para a segunda safra (2007/08).

Na tabela 21, estão apresentados os resumos das análises de variâncias conjuntas envolvendo as duas safras. Para as duas características, houve significância ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$) para todas as fontes de variação. A precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) apresentou valores abaixo de 22%.

A seguir são apresentados os resultados médios para os teores de fumonisina dentro de cada safra agrícola, considerando a significância das fontes de variação na análise conjunta.

TABELA 21 Resumo das análises de variância conjunta envolvendo as duas safras agrícolas em sistema plantio direto, para a avaliação dos teores de fumonisinas B1 e B2 (FUMO), em ppb. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL ¹	QM
		FUMO
Bloco (Saфра)	1	99620,17
Híbridos (H)	9	2480820,52**
Inoculações (I)	1	2215349,77**
Safras (S)	1	23145944,59**
H*I	9	2501872,54**
H*S	9	1643283,13**
I*S	1	6828889,41**
H*I*S	9	1821896,66**
Erro	38	59007,99
CV (%)		24,38
Média Geral		996,46

¹ graus de liberdade para os teores de fumonisina.

* P≤0,05 ** P≤0,01; ^{NS} Não significativo.

5.2.1 Teores de fumonisina B1 e B2

Para as análises de quantificação de fumonisina B1 e B2 em sistema de plantio direto, na primeira safra (2006/07), não foi possível detectar a presença das micotoxinas nas amostras oriundas dos tratamentos testemunhas (sem inoculação) (Tabela 22). Já nos tratamentos inoculados, em 70% dos híbridos foi identificada a presença da micotoxina.

TABELA 22 Teores de fumonisina B1 e B2 em 10 híbridos de milho inoculados artificialmente com o fungo *Fusarium verticillioides* (F) e no tratamento testemunha (T), em sistema plantio direto, nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08. Luminárias, MG, 2009.

Híbrido	SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
	F	T	F	T
AG 6018	0,0 aA	0,0 aA	1999,0 cB	636,1 aA
AG 8021	97,5 aB	0,0 aA	3117,5 bB	1114,5 bA
DKB 199	0,0 aA	0,0 aA	545,0 aA	243,0 aA
2 A 525	82,0 aB	0,0 aA	2033,5 cB	195,0 aA
NB 7215	1062,0 bB	0,0 aA	2555,5 dB	1582,5 bA
DKB 350	0,0 aA	0,0 aA	901,0 bA	637,5 aA
DKB 390	2465,5 cB	0,0 aA	565,5 aA	718,5 aA
P 30F53	128,5 aB	0,0 aA	2790,0 dA	2603,5 cA
2 B 710	2950,0 dB	0,0 aA	4065,0 eB	1081,0 bA
NB 7210	2387,0 cB	0,0 aA	2975,0 dB	328,5 aA
MÉDIA	917,3 A	0,0 B	2154,7 A	914,0 B

¹ Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna e maiúscula na linha pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

O híbrido 2 B 710 apresentou o maior nível de fumonisina (2950 ppb), este nível é alarmante, visto que esta concentração é capaz de causar efeitos toxicológicos em eqüinos, como a leucoencefalomalacia (LEME) e edemas pulmonares em suínos, aves e bovinos (Sydenham et al., 1991 e Scott et al., 1994). Segundo estes mesmos autores, níveis de fumonisinas superior a 100 ppb são capazes de causar problemas em aves e suínos.

Na segunda safra (2007/08) em 100% das amostras foram detectadas a presença da micotoxina. Sendo o híbrido que apresentou maior nível de fumonisina o 2 B 710, com 4.065 ppb (Tabela 22), considerando os tratamentos inoculado com o fungo *F. verticillioides*.

Quando não foi feita a inoculação do fungo *F. verticillioides*, o híbrido que apresentou o maior nível de contaminação com as micotoxinas foi o P 30F53, com 2603,5 ppb. Com base nos dados repassados pelas empresas produtoras de sementes, os híbridos 2 B 710 e P 30F53, estão enquadrados no

grupo dito como susceptíveis a grãos ardidos, por isso vale salientar a necessidade de estudos que visem elucidar melhor os mecanismos de resistência destes materiais a infecção causada por fungos causadores de micotoxinas, como o fungo *F. verticillioides* (Tabela 22).

Osteores de fumonisina detectados nos experimentos conduzidos na área de plantio direto foram superiores aqueles observados no experimento conduzido na área de plantio convencional. Este dado é importante, pois o simples fato do fungo *F. verticillioides* estar presente nos grãos, não é necessariamente um indicativo de estar produzindo a micotoxina. Porém a alta severidade, associada a condições climáticas propícias ao fungo, e um fator primordial para a maior produção da micotoxina.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que há diferença significativa entre as cultivares de milho em relação a produção de grãos ardidos e que a produção de fumonisina B1 e B2 é decorrente da interação entre o híbrido, o ambiente e a fungo *Fusarium. Verticillioides (sacc) nirenb.*

5.3 Correlação entre características

O estudo das correlações torna-se importante quando se deseja analisar o grau de associação entre dois conjuntos de *scores* referentes a um determinado grupo de indivíduos. A medida usual de correlação é o coeficiente (r) de correlação de Pearson. Se positivo indica que o aumento de uma determinada característica implicará no aumento da outra, e se negativo, o aumento de uma determinada característica implica na diminuição da outra. A relação é perfeita quando o valor do r for igual a +1 ou -1.

As correlações entre as características avaliadas (porcentagem de grãos ardidos, severidade pelo método “blotter test” e teores de fumonisina) foram todas significativas com mais de 95% de probabilidade (Tabela 23).

TABELA 23 Coeficiente de correlação (r) para a porcentagem de grãos ardidos (GA), para o teste de sanidade “blotter test”(BLOTTER) e os teores de fumonisina (FUMO) envolvendo os tratamentos inoculados artificialmente com os fungos *Fusarium verticillioides* e o tratamento testemunha (sem inoculação), nas safras agrícolas de 2006/07 e 2007/08, em dois sistema de cultivo (convencional e plantio direto).

	FUMO	BLOTTER
GA	0,55**	0,28*
FUMO		0,45**

[†]* P≤0,05 ** P≤0,01

Embora tenha sido possível constar a correlação positiva e significativa entre a porcentagem de grãos ardidos e a severidade pelo método do “blotter test”, esta foi de baixa magnitude (Tabela 23). Este fato já era de ser esperado, visto que, são considerados grãos ardidos, todo grão que tenha mais de ¼ da sua superfície com alterações na coloração, danificados ou quebrados. Neste caso, o fungo pode estar contaminado por vários fungos, e não so pelo fungo *F. verticillioides*, como avaliado pelo teste de sanidade “blotter test”. Por este motivo, torná-se importante a avaliação pelo “blotter test” para identificar a presença de fungos produtores de micotoxina, como o fungo *F. verticillioides*.

Foi verificada também correlação positiva e significativa, porém de baixa magnitude, entre a porcentagem de grãos ardidos e os teores de fumonisinas. Sendo evidenciado à necessidade da utilização de testes laboratoriais para determinar os níveis desta micotoxina em grãos de milho. O fato de ter havido uma alta porcentagem de grãos ardidos, não necessariamente teremos altos teores de micotoxina nos grãos produzidos.

Estes parâmetros são de grande importância quando se visa à seleção de genótipos resistentes ao ataque do fungo *F. verticillioides*. Porém, vale lembra que genótipos resistentes podem apresentar produção de micotoxinas, mostrando resultados divergentes, de acordo com o local e o ano analisado (Ramos et al., 2008, Scott & Zummo, 1990 e Zuber & Lillehoj, 1979).

Alguns pesquisadores têm utilizados outros parâmetros de interesse para se determinar a resistência de híbridos a contaminação pelos fungos causadores de podridão de espigas, como o endosperma rico em lisina ou amilose, presença de hidroxamatos cíclicos e fenóis (Hammerschmidt & Nicholson 1977, Klun et al., 1970), inibidor de tripsina (Chen & Mitchell 1973), conteúdo de voláteis C6-C12 (Zeringue Jr., 1997), superfície do grão (Brown et al., 1993, Guo et al., 1998) e inibidores de proteínas (Huang et al., 1997, Guo et al., 1996).

6 CONCLUSÕES

A inoculação artificial a campo, com o fungo *Fusarium verticillioides*, favoreceu o aumento da produção de fumonisinas B1 e B2 em grãos de milho, sendo influenciada pela safra agrícola, independente do sistema de cultivo.

Há correlação positiva e significativa, porém de baixa magnitude, entre a porcentagem de grãos ardidos e os teores de fumonisinas, evidenciando a necessidade da utilização de testes laboratoriais para determinar os níveis desta micotoxina em grãos de milho.

Existe correlação entre a porcentagem de grãos ardidos e o teste de sanidade “blotter test”, embora significativa, esta foi de baixa magnitude, isto evidência, a necessidade de realização do teste de sanidade, visando identificar e selecionar híbridos mais resistentes ao ataque do fungo *Fusarium verticillioides*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AH SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p.1331-1334, 1999.

BROWN, R.L. Living maize embryo influences accumulation of aflatoxin in maize kernels. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v.56, n.11, p.967-971, 1993.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L.M.V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.3, p.226-229, 2000.

CHEN, I.; MITCHELL, H.L. Trypsin inhibitors in plants. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.12, n.2, p.327-330, 1973.

CRUZ, C.D. **Programa GENES**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2007. 648p.

FERREIRA, D.F. **SISVAR Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA/DEX, 2002. Software.

GUO, B.Z. Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.8, p.824-829, 1996.

GUO, B.Z. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptible to *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v.61, n.1, p.98-102, 1998.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R.L. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, n.2, p.251-258, 1977.

HENRY, M.H.; WYATT, R.D. A review of fumonisin production by *Fusarium moniliforme* and fumonisin toxicoses in animals. **Applied Poultry Science**, v.2, p.188-192, 1994.

HERMANN, G.; PINTO, F.T.; KITAZAWA, S.E.; NOLL, I.B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.7-10, jan./mar. 2006

HIROOKA, E.Y.; YAMAGUCHI, M.M.; AOYAMA, S. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. **Food Addit Contam**, v.13, p.173-183, 1996.

HUANG, Z.; WHITE, D.G.; PAYNE, G. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. **Phytopathology**, St. Paul, v.87, n.6, p.622-627, 1997.

KLUN, J.A. Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven maize inbred. **Crop Science**, Madison, v. 10, n. 1, p. 87-90, 1970.

LEDOUX, D.R.; BROWN, T.P.; WEIBKING, T.S. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal Vet Diagn Invest**, v.4, p.330-333, 1992.

MACHINSKI JR., M.; VALENTE SOARES, L.M. Fumonisins B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v.17, n.10, p.875-879, 2000.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLUM, W.C.A. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort J Vet Res**, v.55, p.197-203, 1988.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **J Food Prot**, v.52, p.737-742, 1989.

MUSSER, S.M.; PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. **J Agri Food Chem**, v.45, p.1169- 1173, 1997.

ORSI, R.B.; CORRÊA, B.; POZZI, C.R. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **J Stored Prod Res**, v.36, p.75-87, 2000.

OSWEILER, G.D.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine in corn screening. **J Vet Diagn Invest**, v.4, p.53-59, 1992.

- PINTO, N.F.J. de A.; VARGAS, E.A.; PREIS, R. de A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v.33, n.3, p.304-306, 2007.
- POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interation, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Addit Contam**, v.12, n.3, p.313-319, 1995.
- RAMOS, C.R.B.A.; BRASIL, E.M.; GERALDINE, R.M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.38, n.2, p.95-102, jun. 2008.
- ROTTINGHAUS, G.E., COATNEY, C.G., MINOR, H.C. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2. **J Vet Diagn Invest** v.4, p.326-330, 1992.
- SCOTT, G.E.; ZUMMO, N. Preharvest kernel infection by *Aspergillus flavus* for resistant and susceptible maize hybrids. **Crop Science**, Madinson, v.30, n.2, p.381-383, 1990.
- SCOTT, P.M.; DELGADO, T.; PRELUSKY, D.B. Determination of fumonisins in milk. **J Environm Sci Health**, v.29, p.989-998, 1994.
- SILVA, J.B.; POZZI, C.R.; MALLOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of brazilian sorghum. **J Agri Food Chem**, v.48, p.4352-4356, 2001.
- SYDENHAM, E.W.; GELDERBLOM, W.C.A. THIEL, P.G. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1 a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. **J.Agric Food Chem**, v.39, p.2014-2018, 1991.
- ZERINGUE JR., H.J. Volatile antifungal compounds in maize kernels: effect of ear position on aflatoxin production. **Journal of AOAC Internacional**, Arlington, v.80, n.2, p.341-344, 1997.
- ZUBER, M. S.; LILLEHOJ, E. B. Status of the aflatoxin problem in corn. **Journal of Environmental Quality**, Madinson, v.8, n.1, p.1-5, 1979.
- WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W. I nhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal Biology Chemistry**, v.266, p.1486-1490, 1991.

ANEXOS		PÁGINAS
TABELA 1A	Resumo da análise de variância para as médias de produtividade de grãos (Prod.)em kg.ha ⁻¹ e grãos ardidos (GA) em porcentagem, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.....	103
TABELA 2A	Resumo da análise de variância para as médias de produtividade de grãos (Prod.)em kg.ha ⁻¹ e grãos ardidos (GA) em porcentagem, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.	103
TABELA 3A	Resumo da análise de variância para teores de ácidos graxos, nas safras (2006/07) em sistema de cultivo de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.	104
TABELA 4A	Resumo da análise de variância para a severidade do fungo <i>Fusarium verticillioides</i> (F), frente ao tratamento testemunha (T), sem inoculação, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.....	104
TABELA 5A	Resumo da análise de variância para a incidência do fungo de <i>Stenocarpella maydis</i> (M) e <i>Stenocarpella macrospora</i> (MA), nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.	105
TABELA 6A	Resumo da análise de variância para a severidade do fungo <i>Fusarium verticillioides</i> (F), frente ao tratamento testemunha (T), sem inoculação, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema de plantio direto. Fazenda palheta Luminárias, MG, 2009.	105

TABELA 7A. Resumo da análise de variância para a incidência do fungo de <i>Stenocarpella maydis</i> (M) e <i>Stenocarpella macrospora</i> (MA), nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema de plantio direto. Fazenda palheta, Luminárias, MG, 2009..	106
TABELA 8A. Resumo da análise de variância para a severidade do fungo <i>Fusarium verticillioides</i> (F), frente ao tratamento testemunha (T), sem inoculação, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo...	106
TABELA 9A. Resumo da análise de variância para a incidência do fungo de <i>Stenocarpella maydis</i> (M) e <i>Stenocarpella macrospora</i> (MA), nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.....	107

TABELA 1A Resumo da análise de variância para as médias de produtividade de grãos (Prod.)em kg.ha⁻¹ e grãos ardidos (GA) em porcentagem, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM			
		SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
		PROD	GA	PROD	GA
Blocos	2	2960154,77	11,60	89461,55	1,35
Híbridos (H)	9	7151755,43**	14,85*	6038412,10**	299,63**
Inoculações (I)	3	1351349,49 ^{NS}	2,76 ^{NS}	2434389,89 ^{NS}	501,71**
H*I	27	1295745,33 ^{NS}	6,34 ^{NS}	2831998,31*	90,34**
Erro	78	1024554,90	6,69	1681479,31	2,87
CV (%)		10,32	54,86	14,16	12,32
Média Geral		9.803	4,71	9.156	13,75

* P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; ^{NS} Não significativo.

TABELA 2A Resumo da análise de variância para as médias de produtividade de grãos (Prod.)em kg.ha⁻¹ e grãos ardidos (GA) em porcentagem, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

Fonte de variação	GL	QM			
		SAFRA 2006/07		SAFRA 2007/08	
		PROD	GA	PROD	GA
Blocos	2	3177487,46	16,45	248603,11	12,56
Híbridos (H)	9	8070950,03**	15,98**	6984805,00**	527,43**
Inoculações (I)	3	6157473,99 ^{NS}	43,50**	3692095,32 ^{NS}	750,53**
H*I	27	3177487,46 ^{NS}	11,78**	1335797,03 ^{NS}	94,50**
Erro	78	2961584,13	5,32	2021834,98	2,55
CV (%)		18,55	63,42	13,00	13,21
Média Geral		9.278	3,63	10.937	12,10

P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; ^{NS} Não significativo.

TABELA 3A Resumo da análise de variância para teores de ácidos graxos, nas safras (2006/07) em sistema de cultivo de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

Fonte de variação	GL	QM			
		PAL	EST	OLE	LINO
Blocos	1	0,0026	0,0004	0,0092	0,0061
Híbridos (H)	9	0,0237 ^{NS}	0,0003 ^{NS}	0,1466 ^{NS}	0,1904 ^{**}
Erro	9	0,0019	0,0001	0,0098	0,0170
CV (%)		10,73	15,67	9,04	8,68
Média Geral		0,41	0,04	1,09	1,50

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

TABELA 4A Resumo da análise de variância para a severidade do fungo *Fusarium verticillioides* (F), frente ao tratamento testemunha (T), sem inoculação, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM	
		SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08
Blocos	3	16,36	8,58
Híbridos (H)	9	129,90 ^{**}	32,69 ^{**}
Inoculações (I)	1	484,12 ^{**}	189,73 ^{**}
H*I	9	102,22 ^{**}	88,80 ^{**}
Erro	57	20,27	17,69
CV (%)		12,31	8,56
Média Geral		36,56	49,14

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

TABELA 5A Resumo da análise de variância para a incidência do fungo de *Stenocarpella maydis* (M) e *Stenocarpella macrospora* (MA), nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM	
		SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08
Blocos	3	31,67	16,53
Híbridos (H)	9	532,11**	147,64**
Inoculações (I)	1	5445,00**	583,20**
H*I	9	501,88**	73,42**
Erro	57	34,89	20,46
CV (%)		46,33	34,27
Média Geral		12,75	13,20

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

TABELA 6A Resumo da análise de variância para a severidade do fungo *Fusarium verticillioides* (F), frente ao tratamento testemunha (T), sem inoculação, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema de plantio direto. Fazenda Palheta Luminárias, MG, 2009.

Fonte de variação	GL	QM	
		SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08
Blocos	3	48,26	27,16
Híbridos (H)	9	87,29**	116,16**
Inoculações (I)	1	3710,08**	1984,03**
H*I	9	148,23**	57,89 ^{NS}
Erro	57	24,62	30,81
CV (%)		9,36	10,56
Média Geral		53,03	52,58

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

TABELA 7A Resumo da análise de variância para a incidência do fungo de *Stenocarpella maydis* (M) e *Stenocarpella macrospora* (MA), nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema de plantio direto. Fazenda Palheta, Luminárias, MG, 2009.

Fonte de variação	GL	QM	
		SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08
Blocos	3	6,93	28,46
Híbridos (H)	9	218,75**	900,91**
Inoculações (I)	1	288,80**	245,00*
H*I	9	219,91**	251,67**
Erro	57	24,61	53,45
CV (%)		40,67	41,42
Média Geral		12,20	17,65

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

TABELA 8A Resumo das análises de variância para teores de fumonisina B1 e B2, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema convencional de cultivo.

Fonte de variação	GL	QM	
		SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08
Blocos	1	181845,22	512094,27
Híbridos (H)	9	2030551,55**	3490416,57**
Inoculações (I)	1	7018250,62**	4392044,26**
H*I	9	2030551,57**	983220,72**
Erro	19	139328,86	145257,66
CV (%)		89,11	31,59
Média Geral		418,88	1206,51

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

TABELA 9A Resumo das análises de variância para teores de fumonisina B1 e B2, nas safras (2006/07 e 2007/08) no sistema de plantio direto. Fazenda palheta, Luminárias, MG, 2009.

Fonte de variação	GL	QM	
		SAFRA 2006/07	SAFRA 2007/08
Blocos	1	48650,62	150589,71
Híbridos (H)	9	1469219,39**	2654884,27**
Inoculações (I)	1	8411641,22**	632597,95**
H*I	9	1469219,39**	2854549,81**
Erro	19	13641,20	104374,78
CV (%)		25,47	21,06
Média Geral		458,57	1534,35

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; ^{NS} Não significativo.

PROTOCOLOS

PROTOCOLO 1A Protocolo de extração lipídica

1. Pesar e macerar 0,5g de amostra liofilizada, em balança de precisão (0,1mg).
2. Adicionar 1,0 mL de H₂O, 3,0 mL de metanol, 1,6 mL de clorofórmio e transferir para o tubo de 10 mL com tampa roscável.
3. Agitar 30 segundos no vórtex.
4. Colocar no banho ultrasônico, por 15 minutos, a 40°C.
5. Adicionar 1,4 mL de clorofórmio e 1,4 mL de H₂O.
6. Agitar, por 30 segundos, no vortex.
7. Centrifugar, a 3.500 rpm, por 15 minutos.
8. Solução trifásica: descartar o sobrenadante (H₂O + metanol).
9. Romper a massa de amostra com pipeta pasteur e pipetar, com cuidado, a parte do clorofórmio.
10. Reservar o material coletado, protegendo da luz e do calor, para posterior filtração.
11. Repetir todo o processo com o resto de amostra que sobrou no tubo.
12. Filtrar o material com papel filtro apropriado para C.G e secar o material com ar de nitrogênio.

PROTÓCOLO 2A Protocolo de esterificação

1. Adicionar 2 mL de NaOH 0,5M em metanol ao extrato de lipídeos.
2. Colocar em banho fervente por 5 minutos (vedar a tampa do tubo com fita teflon) e depois resfriar com água gelada.
3. Adicionar 2,5 mL de reagente esterificante (10g de cloreto de amônio, 15 mL H₂SO₄, 300 mL metanol).
4. Colocar em banho fervente por 5 minutos e, depois, resfriar com água gelada.
5. Adicionar 2 mL de solução de NaCl saturada e agitar no vórtex, por 10 segundos.
6. Adicionar 2,5 mL de hexano e agitar, por 10 segundos, no vórtex.
7. Centrifugar a 3.000 rpm, por 10 minutos, para separação;
8. Filtrar a mistura de hexano e lipídeos, e transferir para frasco âmbar.
9. Secar a mistura de hexano com ácidos graxos esterificados em ar de nitrogênio.
10. Adicionar 0,6 mL de hexano no frasco.
11. Injetar 1µL no cromatógrafo e fazer a leitura.

