

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

LORENA CLARA CRUZ

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Fusarium graminearum* EM
PLANTAÇÕES DE TRIGO NA REGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ E
ADAPTAÇÕES NUTRICIONAIS E FÍSICAS DE MEIOS DE CULTURA PARA
INDUÇÃO DE MACROCONÍDIOS E PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS - PR

2018

LORENA CLARA CRUZ

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Fusarium graminearum* EM PLANTAÇÕES
DE TRIGO NA REGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ E ADAPTAÇÕES
NUTRICIONAIS E FÍSICAS DE MEIOS DE CULTURA PARA INDUÇÃO DE
MACROCONÍDIOS E PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS**

Trabalho de Conclusão do Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos, como requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa

DOIS VIZINHOS - PR

2018

RESUMO

CRUZ, L.C. **Isolamento e identificação de *Fusarium graminearum* em plantações de trigo na região sudoeste do Paraná e adaptações nutricionais e físicas de meios de cultura para indução de macroconídios e produção de micotoxinas.** 2018. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

O cultivo de trigo contribui de maneira expressiva para o crescimento econômico do Brasil uma vez que serve de matéria prima para a alimentação humana e de animais de produção. O Estado do Paraná se destaca na produção tritícola devido ao clima favorável. No entanto, doenças importantes, como a fusariose causada principalmente pelo fungo *Fusarium graminearum* Schwabe, afetam essas culturas prejudicando a produção e contaminando os grãos com micotoxinas nocivas à saúde humana e animal, especialmente o desoxinivalenol. Diante desta problemática, o presente trabalho tem como objetivo isolar, identificar e caracterizar o fungo *F. graminearum* em amostras de trigo e promovendo meio/substrato de cultura para indução de macroconídios e micotoxinas. Um total de 19 amostras de trigos foram coletadas no sudoeste do Paraná e avaliadas quanto à presença de *Fusarium graminearum*. As análises morfológicas foram realizadas utilizando meio folha de eucalipto-BDA a fim de identificar a espécie de interesse através da presença e morfologia de macroconídios. Uma vez identificada, as colônias isoladas de *F. graminearum* e uma cepa controle *F. graminearum* ATCC 335 trigo, foram inoculadas em arroz pré-cozido em duas etapas de encubação, uma com a presença de oxigênio e outra sem presença de oxigênio, totalizando 20 potes para cada tratamento. Esta etapa serviu para padronização de cultivos para investigação micotoxigênica dos isolados. Os resultados obtidos com a utilização do meio folha de eucalipto-BDA foram muito satisfatórios, uma vez que induziu a esporulação e conseqüentemente a produção de macroconídios. Os dados adquiridos no cultivo em arroz no tratamento com oxigênio em comparação com o tratamento sem oxigênio demonstraram que a presença deste gás é um fator extremamente importante para o desenvolvimento dos fungos, uma vez que no tratamento com oxigênio os fungos cresceram por todo o cultivo e sem oxigênio não houve crescimento micelial. Conclui-se que todas as áreas amostrais de culturas tritícolas estavam contaminadas pelo fungo fitopatogênico e toxicogênico *F. graminearum*, sendo necessário realizar a manutenção adequada dos grãos a fim de minimizar a presença de contaminantes bióticos, uma vez que os mesmos são produtores de micotoxinas. A técnica de indução de esporulação para obtenção de macroconídeos utilizando o ágar folha de eucalipto trata-se de uma boa alternativa ao ágar cravo usualmente aplicado na esporulação de fungos. Além disso, o cultivo de *F. graminearum* em arroz para potencial

produção de micotoxinas foi satisfatória uma vez que o fungo se desenvolveu adequadamente. Para se obter resultados a respeito da análise da produção de micotoxinas em cultivo padronizado em arroz há a necessidade de quantificação por análise de cromatográfica líquida de alta eficiência.

Palavras-chave: Fungo. Micotoxinas. Saúde.

ABSTRACT

CRUZ, L.C. **Isolation and identification of *Fusarium graminearum* in wheat plantations in the southwest region of Paraná and nutritional and physical adaptations of cultural means for macroconidial induction and mycotoxin production.** 2017. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2018.

Wheat crops contributes significantly to the Brazil's economic growth as it serves as raw material for food and feedstuffs. The state of Paraná stands out in wheat production due to the favorable climate. However, important diseases such as fusariosis, caused mainly by the fungus *Fusarium graminearum* Schwabe, affect these crops, damaging the production and contaminating the grains with mycotoxins harmful to human health, especially the deoxynivalenol. In view of this problem, the present research aims to isolate, identify and characterize the *F.* species in wheat samples and promote medium/substrate culture for induction of macroconidia and mycotoxins. A total of 19 wheat samples were collected in the southwest of Paraná and evaluated for the presence of *F. graminearum*. The morphological analyzes were used leaf of Eucalyptus-BDA, as a way to identify a species of interest through the presence of macroconidia and mycotoxins. Once identified, as isolated colonies of *F. graminearum* and a control strain, were found in two stages of incubation, one with the presence of oxygen and another without the presence of oxygen, totaling 20 pots for each treatment. This stage served for the standardization of cultures for the mycotoxigenic investigation of the isolates. The results obtained with the medium Eucalyptus-BDA were very satisfactory, since it induced a sporulation and consequently a production of macroconidia. The data obtained in the rice cultivation in the oxygen treatment in comparison to the non-oxygen treatment showed that the presence of this gas is an extremely important factor for the development of the fungi, since in the oxygen treatment the fungi grew throughout the crop and without oxygen there was no mycelial growth. It is concluded that all sampled areas of wheat crops were contaminated by the phytopathogenic and toxicogenic fungus *F. graminearum*, and it is necessary to carry out the proper maintenance of the grains in order to minimize the presence of biotic contaminants, since they are mycotoxin producers. The technique of induction of sporulation for the cascade of macroconides used is the plan of eucalyptus, it is an alternative to the use of a sporulation tool of fungi. In addition, cultivation of *F. graminearum* in rice for potential production of mycotoxins was satisfactory once the fungus developed. To obtain the

information, the analysis of mycotoxin production in a rice standardized culture should be quantified by high performance liquid chromatography analysis.

Keywords: Fungus. Mycotoxins. Health.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 OBJETIVOS	09
2.1 GERAL.....	09
2.2 ESPECÍFICOS	09
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 TRIGO	10
3.2 FUSARIOSE OU GIBERELA NO TRIGO.....	11
3.2.1 <i>Fusarium</i> sp.....	12
3.2.2 Epidemiologia.....	13
3.3 MICOTOXINAS	15
3.3.1 Micotoxinas produzidas por <i>Fusarium</i> sp	16
3.3.2 Caracterização e efeitos tóxicos do desoxinivalenol (DON)	16
3.4 DETECÇÃO DE DESOXINIVALENOL.....	18
3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>FUSARIUM</i> SP.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE TRIGO	20
4.2 ISOLAMENTO FÚNGICO DAS AMOSTRAS DO TRIGO.....	20
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GÊNERO <i>Fusarium graminearum</i>	21
4.4 PADRONIZAÇÃO E CULTIVO DE <i>Fusarium graminearum</i> PARA INVESTIGAÇÃO MICOTOXIGÊNICA.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 ISOLADOS COLETADOS.....	24
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	25
5.3 CULTIVO DE <i>Fusarium graminearum</i> PARA INVESTIGAÇÃO MICOTOXIGÊNICA.....	28
6 CONCLUSÕES.....	30
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	31

1 INTRODUÇÃO

O setor agrícola, desde 2000, vem contribuindo expressivamente para o crescimento econômico do Brasil. O trigo se encontra em quarto lugar na produção de grãos no Brasil sendo que na safra de 2016 a produção foi de 6.726,8 mil toneladas, com um consumo nacional de 11.517,7 mil toneladas, tendo o Paraná como líder na sua produção juntamente com o Rio Grande do Sul (CONAB, 2017). No entanto, os cultivares de trigo bem como o setor agrícola de maneira geral, sofre com grandes perdas na produtividade devido ao clima e, principalmente, a fatores bióticos como fungos, bactérias e insetos.

A giberela ou fusariose do trigo, causada pelo fungo *Gibberella zeae* (Schw) Petch. (anamorfo *Fusarium graminearum* Schwabe) é uma doença que acomete as culturas tritícolas de modo generalizado no mundo, principalmente em regiões úmidas e quentes, com precipitações pluviais elevadas (CASA et al., 2004). No Brasil, a fusariose possuía importância secundária e partir do ano de 2000, devido as grandes perdas na produção e aos casos de intoxicação alimentar, a fusariose passou a ter importância primária principalmente na região Sul do país (ALMEIDA, 2006; ZOLDAN; REIS, 2008).

Apesar dos fatores climáticos serem fundamentais para a infecção do fungo que se dá através das anteras das espigas do trigo (CASA et al., 2004), outros fatores como, manutenção dos resíduos culturais e controle no armazenamento dos grãos contribuem para a sobrevivência do patógeno e aumento do inóculo (DEL-PONTE et al., 2004).

Além de causar danos na produtividade dos grãos, afetando a economia, as espécies de *Fusarium* também tem se tornado um problema de segurança do alimento, uma vez que produzem substâncias que são tóxicas para a maioria dos animais, incluindo o homem.

Essas substâncias conhecidas como micotoxinas são metabólitos secundários de alguns fungos ou moldes filamentosos que podem causar danos a saúde (MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIC, 2010).

As espécies do gênero *Fusarium* são responsáveis por produzir micotoxinas do grupo dos tricotecenos, dentre os quais pode-se citar o Desoxinivalenol, que em certas concentrações possui efeito deletério no sistema digestivo de animais e provoca sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e dores de cabeça em humanos (HUSSEIN; BRASEL, 2001; APS, 2017)

Devido aos problemas causados por *Fusarium*, estudos envolvendo técnicas clássicas moleculares e cromatográficas buscam designar medidas de controle para os danos causados na agricultura e conseqüentemente à saúde humana (BUSSO, 2005).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo isolar e caracterizar a espécie *F. graminearum* de amostras de diferentes plantações tritícolas no sudoeste do Paraná e identificar a espécie através de técnicas moleculares. Além disso, pretende-se detectar a presença de desoxinivalenol por meio de cromatografia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, identificar e caracterizar o fungo *F. graminearum* em amostras de trigo e promovendo meio/substrato de cultura para indução de macroconídios e micotoxinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, identificar e caracterizar espécies de *F. graminearum* no trigo coletado em diferentes pontos da região sudoeste do Paraná;
- Analisar a eficiência do meio de cultura com folha de eucalipto para indução de esporulação;
- Avaliar fatores físicos e químicos no desenvolvimento dos isolados e promover a padronização de um substrato a base de arroz para produção de micotoxinas;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TRIGO

Presente há mais de 11 mil anos na história da humanidade, o trigo foi um dos mais importantes cereais utilizado para alimentação devido aos valores nutricionais e facilidade de armazenagem por longo período. Com expressão de mudança social e ideológica, o cultivo do trigo modificou a relação do homem com o meio (CONAB, 2017; EMBRAPA, 2017; ABITRIGO, 2017).

O trigo é uma planta anual autógama classificado como cultura de primavera ou inverno, de acordo com seu fotoperíodo e temperatura ideal. Pertencente à família Poaceae, a planta de trigo é uma gramínea com sistema radicular fasciculado fazendo com que, em condições favoráveis de clima e solo, brotem inúmeros afilhos relacionados à planta-mãe (MORI et al., 2016).

O ciclo de desenvolvimento do trigo se dá por quatro estágios principais: o primeiro é o perfilhamento, onde ocorre o crescimento principalmente da área foliar; o segundo estágio é a alongação, demarcado pelo aparecimento do primeiro nó na base da planta até o aparecimento da última folha e sua alongação; no terceiro estágio ocorre o espigamento, que é o aparecimento da espiga sem grãos, nesse estágio as estruturas foliares e radiculares então formadas dando início ao florescimento e a formação do grão; a última etapa é a de maturação, demarcada pelo enchimento do grão e seu amadurecimento até o ponto de colheita (OSÓRIO, 1992)

No Brasil, os processos que envolvem de semeadura até a maturação ocorrem com amplitude média de 100 a 160 dias. Mundialmente cerca de 80% deste cereal é destinado à alimentação humana, sendo utilizado na produção de pães, biscoitos, tortas, bolos, massas e cereais matinais. Este cereal também é destinado para fabricação de misturas adesivas e colas, fármacos, cosméticos, álcool, bem como na forma de forragem (pastejo direto) para alimentação de animais (EMBRAPA, 2017).

Devido à gama de produtos oriundos da farinha de trigo, foram delimitados diversos parâmetros para determinar a qualidade tecnológica/industrial deste produto e de misturas de farinhas. A verificação desta qualidade é realizada normalmente através de características químicas da farinha de trigo (umidade, acidez, proteínas, glúten, teor de amido danificado, cor

e cinzas), de análises reológicas da farinha de trigo, atividade enzimática da farinha de trigo e da atividade interativa (NITZKE; THYS, 2017).

No ano de 2016 a produção mundial de trigo foi de 754,101 milhões de toneladas e atualmente no Brasil, são produzidos cerca de seis milhões de toneladas por ano (ABITRIGO, 2017). O caráter econômico da cultura do trigo é notório e assim como outras culturas também é atacado por doenças que prejudicam seu desenvolvimento e, conseqüentemente, em sua produtividade e na qualidade dos grãos. Além dos fatores abióticos, em condições favoráveis de ambiente os agentes bióticos (fungos, bactérias, vírus, entre outros) podem ser nocivos à cultura do trigo (EMBRAPA, 2017).

3.2 FUSARIOSE OU GIBERELA NO TRIGO

Uma das principais doenças que acometem as culturas de trigo e demais culturas de inverno é a fusariose, conhecida também como giberela, causada principalmente pelo fungo *Gibberella zeae* (Schw.) Petch forma anamórfica *F. graminearum* (Schwabe). De expressão econômica mundial, a fusariose é responsável por demasiados danos nas culturas tritícolas e demais cereais da América do Sul, principalmente no Rio Grande do Sul. Outros países como Japão, Argentina, China, México, Austrália, EUA, Canadá e a Europa, tiveram grandes perdas devido a epidemias pelo fungo (ALMEIDA, 2006; BUSSO, 2005; LIMA; FERNANDES, 2000).

No Brasil, segundo estudo realizado pela EMBRAPA de Passo Fundo, RS, entre 1984 e 1994, os danos de rendimentos de grãos variaram de 0,4% a 14%, com média de 5,4%. Nesse momento a fusariose era considerada importância secundária devido às epidemias esporádicas, mas a partir de 2000 passou a ter importância primária pelo fato das epidemias estarem cada vez mais frequentes e pelas vastas perdas de culturas (NETO, 2004).

A fusariose é altamente dependente de condições ambientais para poder se estabelecer. Regiões onde ocorre precipitação pluvial de 48h consecutivas, na fase de floração do trigo e temperaturas entre 20°C e 25°C, tendem a sofrer mais danos na cultura tritícola (ZOLDAN; REIS, 2008; DEL-PONTE et al., 2004).

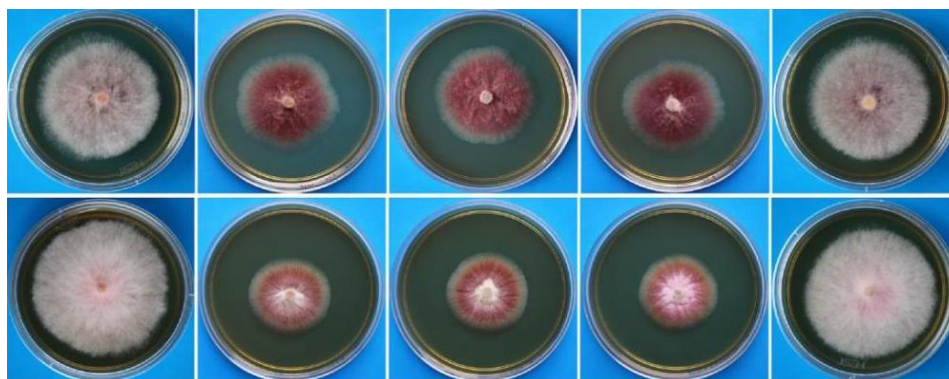
3.2.1 *Fusarium* sp.

Segundo o Index Fungorum (2017), o gênero *Fusarium* pertence ao Reino Fungi, divisão Ascomycota, Subdivisão Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Sub-classe Hypocreomycetidae, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae.

As espécies de *Fusarium* são saprófitos comuns do solo e fitopatógenos, comumente encontrado em grãos de cereais (VESONDER; GOLINSKI, 1989). Duas espécies fitopatógenas, *F. graminearum* e *F. verticillioides*, estão entre as mais importantes e estudadas na cultura de cereais, principalmente na cultura do trigo e do milho, respectivamente (MUNKVOLD, 2003).

A cultura desses fungos em sua maioria é caracterizada por apresentarem micélios aveludados e esbranquiçados podendo apresentar pigmentação do micélio variando de cor rosa, púrpura, cinza ou amarela, quando encubados a 25°C (Figura 1) (LEAL et. al., 2009).

Figura 1 – Característica morfológica de *F. graminearum*



Fonte: ZHENG (2012).

Fusarium sp. produzem três tipos de esporos: macroconídios, microconídios e clamidósporos. A chave para a identificação do gênero e espécies de *Fusarium* são os macroconídios, pois em condições naturais podem variar consideravelmente entre os indivíduos, contudo tal característica deve ser usada com cautela como critério taxonômico (NELSON; DIGNANI; ANAÏSSIE, 1994).

Os métodos usuais de identificação de espécies do gênero *Fusarium* sp. envolvem a análise morfológica de suas estruturas vegetativas e reprodutivas. Dentre estas estruturas, os macroconídeos, que são esporos resultantes do ciclo assexuado, são de extrema importância utilizados no processo de identificação (BURGESS; SUMMERELL; NELSON, 1991).

No entanto, meios de cultura ricos em carboidratos, tais como Batata Dextrose Ágar (BDA) apresentam pouco ou nenhuma indução da formação desses esporos. Ágar cravo tem sido uma alternativa para indução de esporulação, porém, a folha é difícil disponibilidade, bem como manipulação (HASSAN e BULLERMAN, 2009).

Segundo POZZI et al. (2002), *Fusarium* sp. pode causar diversas doenças, como a podridão de sementes, podridão da radicular, a protuberância nos grãos de cereais, as murchas vasculares, e outras doenças como pokkah-boeng na cana-de-açúcar e doença de bakanae do arroz, causando danos na produtividade e na qualidade dos grãos. (POZZI et al., 2002; ZOLDAN; REIS, 2008).

A contaminação mundial de alimentos por fungos representa um problema significativo uma vez que além dos impactos na cultura de cereais, algumas espécies de *Fusarium* produzem micotoxinas que são tóxicas para animais e para humanos, se tornando um problema de segurança alimentar (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZOLDAN; REIS, 2008).

3.2.2 Epidemiologia

Durante o inverno, o fungo *G. zeae* pode sobreviver em restos culturais como: colmos de milho, palhas de trigo e outros hospedeiros. Nestes resíduos, o fungo produz esporos assexuais, macroconídios, que são dispersados por respingos de chuva e pelo vento para outros resíduos ou plantas. Sob condições úmidas e quentes, peritécios negros começam a se formar sobre estes resíduos ou plantas infectadas, e ocorre a liberação de ascóporos, esporos sexuais, no ambiente. Os ascóporos podem ser levados a longas distâncias da fonte de origem, se tornando um grande problema para toda a cultura (SCHMALE III; BERGSTROM, 2003; DEL-PONTE et al., 2004).

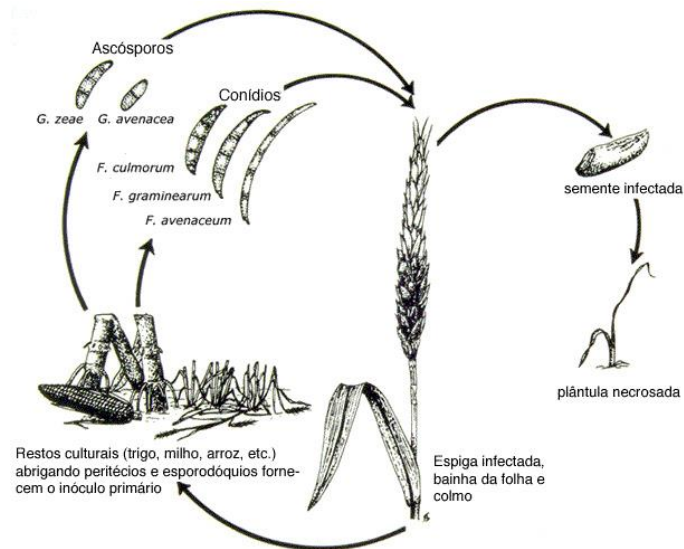
Segundo os mesmos autores, sob condições ótimas de temperatura e umidade, tanto os ascóporos quanto os macroconídios, se depositam sobre as espigas e durante o florescimento as anteras extrusadas são consideradas o sítio primário de infecção (Figura 2).

Com a germinação dos esporos, logo após a extrusão, ocorre a penetração na flor do trigo e o ovário é atingido (DANELLI; ZOLDAN; REIS, 2006). Nesse caso a colonização do fungo mata as inflorescências e não há desenvolvimento dos grãos. Porém, se as inflorescências forem infectadas tardiamente, haverá produção de grãos que serão chochos e enrugados (SCHMALE III; BERGSTROM, 2003).

Os sintomas são espiguetas despigmentadas, esbranquiçadas ou cor de palha, além das aristas arrepiadas que torna fácil o reconhecimento da doença (Figura 3) (BUSSO, 2005). Sob

condições ideais de temperatura e umidade, os macroconídios produzem estruturas que formam uma massa alaranjada nas espigas (LIMA, 2016).

Figura 2 - Ciclo Reprodutivo da Giberela ou Fusariose da espiga do Trigo



Fonte: SCHMALE III e BERGSTROM (2003).

Figura 3 - Sintomas de Giberela no trigo



Fonte: LAU (2013).

3.3 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos principalmente pela estrutura micelial de fungos filamentosos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Muitos desses produtos podem ser encontrados em alimentos tendo potencial nocivo quando ingeridos em grandes quantidades ou por períodos longos (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2014).

Após epidemias de doenças no Japão em 1963, no Canadá e EUA em 1980-82 e na Índia em 1987, iniciou-se estudos sobre diversos alimentos, principalmente sobre os compostos presentes no trigo e em outros cereais. Descobriu-se que espécies de *Fusarium* e *Aspergillus* ali presentes produziam substâncias que afetavam grande parte dos indivíduos que os consumiam e que todas as espécies de *Fusarium* encontradas eram toxigênicos em potencial (CHELKOWSKI, 1989; BHAT et al., 1989).

Outros casos de intoxicação alimentar provenientes de micotoxinas produzidas por *Fusarium* sp. e *A. flavus*, surgiram em diferentes países, como Argentina, Europa, nas Américas e em toda Ásia (RODRIGUES; NAEHRER, 2012; SOLOVEY et al., 1999).

Os efeitos dessas micotoxinas em humanos eram diferentes de acordo com a quantidade ingerida de alimentos contaminados. No estudo de BHAT (1989), constatou-se que mulheres e crianças que consumiam diariamente em quase todas as refeições derivados do trigo, apresentavam além de dor abdominal, irritação na garganta, diarreia com sangue nas fezes, vômito e processos alérgicos na pele.

Em animais os efeitos podem ser ainda piores, esses metabólitos podem provocar ganho de peso reduzido, imunossupressão e a morte (STREIT et al., 2013). Em porcos foi constatado edema pulmonar e em equinos observou-se a ocorrência de leucoencefalomalacia, doença degenerativa da substância branca do sistema nervoso central (SOLOVEY et al., 1999).

Os diversos efeitos tóxicos relacionados à exposição às micotoxinas justificam a criação de legislações que limitem as quantidades destas toxinas em alimentos e rações. Atualmente diversos países e blocos de países possuem legislações que limitam as quantidades de toxinas em produtos destinados ao consumo humano e animal. Esses limites são baseados em estudos controlados e na medida em que novos estudos são desenvolvidos pode ser necessário revisar tais legislações.

3.3.1 Micotoxinas produzidas por *Fusarium* sp.

O gênero *Fusarium* é responsável por produzir substâncias do grupo dos tricotecenos, sendo que as principais são desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2, e a fusarenon-X (BUSSO, 2005).

Os tricotecenos foram usados como arma biológica, em algumas guerras nos anos de 1974 a 1981. Estas micotoxinas já foram testadas em animais em diversas concentrações e constatou-se que em menores concentrações de exposição pode haver lesões graves na pele e nos olhos, já em maiores quantidades pode haver total incapacidade e morte do indivíduo em poucas horas (WANNEMACHER; WIENER, 1997).

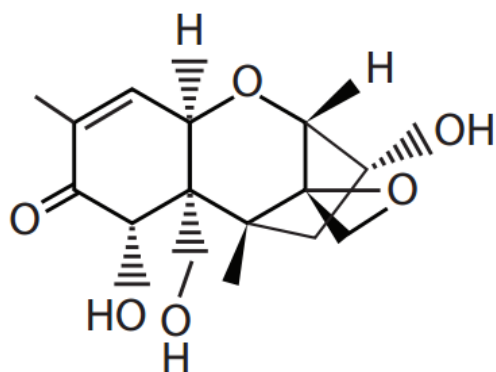
A fumonisina é outra micotoxina produzida por várias espécies do gênero *Fusarium*, mas principalmente por *Fusarium verticillioides*, descritas e caracterizadas em 1988 por Bezuidenhout et al. e Gelderblom et al. (ROCHA et al., 2013).

Segundo Marroquín - Cardona et al. (2014), a Fumonisina B1 (FB1) é nefrotóxica e hepatotóxica em várias espécies e possível carcinógeno humano, devido a interrupção geral do metabolismo lipídico. Essa substância tem sido associada ao câncer no esôfago e fígado, além de ser um fator de risco para defeitos do tubo neural.

3.3.2 - Caracterização e efeitos tóxicos do desoxinivalenol (DON)

O Deoxinivalenol (DON) é uma das micotoxinas mais encontrada nas culturas de grãos (AUDENAERT et al., 2013). Prevalente no grupo dos tricotecenos, o DON é um subproduto produzido principalmente por *Fusarium graminearum*. Estruturalmente é um composto orgânico polar pertencente aos tricotecenos do tipo B e seu nome químico é 12,13-epoxy-3 α ,7 α ,15-trihydroxytrichothec-9-en-8-on (SOBROVA et al., 2010) (Figura 4). Segundo o mesmo autor essa micotoxina pode suportar altas temperaturas dentro de um intervalo entre 170°C a 350°C, reduzindo sua concentração apenas após trinta minutos a 170°C.

Figura 4 - Estrutura química do Desoxinivalenol (DON)



Fonte: SOBROVA et al., (2010).

A nível molecular, o DON interrompe a função celular normal inibindo a síntese de proteínas através da ligação ao ribossomo e ativando cinases celulares críticas envolvidas na transdução de sinal relacionada à proliferação, diferenciação e apoptose (PESTKA; SMOLINSKI, 2011). Em um estudo com animais de estimação, cães e gatos, observou-se que a presença de DON em níveis consideráveis na alimentação provocou vômitos e recusa alimentar (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Segundo o Hussein e Brasel (2001), os estudos de caso em humanos são escassos, mas, foram observados vários surtos por micotoxicoses, principalmente devido à contaminação de grãos de cereais. No geral, os efeitos de DON podem provocar náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, hiperemia de mucosas, laringite, asfixia, gastroenterite e vertigem.

SANTOS et al. (2013) analisando 113 amostras de trigo produzidas no Estado do Paraná, entre 2008 e 2009, detectou a presença de desoxinivalenol em 66,4% das amostras, com nível de contaminação variando entre 206,3 e 4.732,3 µg/kg. Com estes dados, os autores estimaram que a ingestão diária de DON pelos habitantes da cidade de Londrina é de 1,13 µg/kg, portanto acima da ingestão diária máxima recomendada para seres humanos que é de 1 µg/kg. ALMEIDA et al. (2016) conduziu um estudo sobre a presença de DON em 134 amostras de farinha de trigo, macarrão instantâneo e biscoitos adquiridas no comércio da cidade de São Paulo entre 2010-2014. O DON foi detectado em mais de 90% das amostras em níveis que chegavam a 1.720,0 µg/kg. Esses estudos demonstram que a população brasileira está exposta ao DON pelo consumo de alimentos contaminados.

No Brasil, em 2006 o Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, instituiu o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal, a fim de avaliar e estabelecer critérios para o controle de micotoxinas. Mas, somente no dia 22

de fevereiro de 2011 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou a resolução nº 07 sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (ANVISA, 2011). O Quadro 1 traz os limites estabelecidos por esta resolução para o DON em diversos alimentos.

Quadro 1 - Limites máximos tolerados (LMT) para Desoxinivalenol (DON) em alimentos, segundo a resolução - RDC Nº 07, DE 18 de fevereiro de 2011.

Alimentos	LMT (µg/kg)			
	2011	2012	2014	2016
Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância).	200	200	200	200
Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.		2000	1500	1000
Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.		1750	1250	750
Trigo e milho em grãos para posterior processamento.			3000	3000

Fonte: ANVISA (2011)

Mesmo com limites estabelecidos de micotoxinas para alimentos derivados do trigo ainda se observa níveis acima dos limites pré-estabelecidos. Essa problemática se deve certamente a períodos de chuvas durante o processo de cultivo deste cereal culminando para uma maior reprodução de *Fusarium* sp. e para a produção de micotoxinas.

3.4 DETECÇÃO DE DESOXINIVALENOL

O desoxinivalenol bem como outras micotoxinas dos grupos dos tricotecenos podem ser quantificados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), Cromatografia de Ultra Rendimento ou Cromatografia de Camada Fina.

A cromatografia líquida de alta eficiência, é o método mais utilizado e compreende na separação de compostos de uma amostra através de processos físicos e químicos, onde duas fases participam do processo, uma fase estacionária e uma fase móvel. A detecção é efetuada com uma frequência de fluorescência ultravioleta (KOTAL; RADOVÁ, 2002).

Segundo Santos et al. (2010), o método HLPC com técnicas de detecção por UV proporciona uma maior sensibilidade e procedimentos de purificação mais simples que os necessários para outros tipos de cromatografia e mesmo para outros detectores.

3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium* sp.

As espécies do gênero *Fusarium* possuem pequenas diferenças morfológicas, assim a técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) é uma metodologia específica, confiável, rápida e amplamente utilizada na identificação de espécies potencialmente produtoras de micotoxinas (MULÈ et al., 2004).

Do ponto de vista epidemiológico e evolutivo a variabilidade fitopatogênica e genética é importante para determinação o potencial de adaptação do organismo e no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas (MICHEREFF et al., 2003).

A região Internal Transcribed Spacer (ITS) é a mais utilizada para identificação de fungos por se tratar de genes mais conservados filogeneticamente e assim, mais adequados para o estudo de biodiversidade (REIS JUNIOR et al., 2006)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE TRIGO

As amostras de trigo utilizadas neste estudo foram coletadas no mês de novembro de 2016 em diferentes localidades no entorno da região sudoeste do Paraná. Os pontos amostrais foram estabelecidos com o uso de um equipamento Global Positioning System (GPS) e anotadas as suas respectivas coordenadas geográficas. O material coletado foi identificado e armazenado em freezer -20°C no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos.

4.2 ISOLAMENTO FÚNGICO DAS AMOSTRAS DO TRIGO

As amostras de trigo foram manipuladas assepticamente e observadas sob lupa estereoscópica para averiguação da presença do patógeno. As espigas que apresentavam manchas características da doença Giberela (figura 5), foram separadas e para cada área analisada foram empregados 24 grãos (8 grãos/placa) em placa de Petri contendo meio de cultura Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (ágar-DRBC), um meio seletivo para fungos.

As placas foram incubadas em uma estufa a 25°C durante 7 dias e posteriormente as estruturas macroscópicas do micélio foram observadas com uso de lupa estereoscópica. Os micélios característicos do gênero *Fusarium* foram transferidos para o meio BDA, para crescimento e purificação das colônias.

Figura 5 – Manchas associadas a doença Giberela.



Fonte: Gagkaeva, 2008.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO GÊNERO *F. graminearum*

Uma vez obtidas colônias puras, estas foram transferidas para um meio de cultura contendo folhas de eucalipto (figura 6) e incubados a 25°C durante 21 dias.

Para a elaboração do meio folha de eucalipto em BDA, foi retirado folhas saudáveis de árvores jovens e colocadas em tiras em placa de Petri de vidro. Posteriormente as placas com as folhas foram autoclavadas e em seguida foi adicionado meio BDA sobre as folhas e esperou-se solidificar o meio para a inoculação das cepas.

Figura 6 – Meio de cultura ágar batata com folha de eucalipto



Fonte: Cruz, 2017.

Após o período de incubação, foi pipetado 2ml de água peptonada estéril sobre a colônia e com uma alça de drigalski espalhou-se a água e juntamente com as hifas. Em seguida pipetou-se cerca de três gotas dessa amostra da placa em uma lâmina. Por fim, foi adicionado uma gota de corante azul de algodão para corar as células presentes na amostra da lâmina e dispôs uma lamínula sobre a amostra.

As lâminas com as amostras foram etiquetadas de acordo com a placa utilizada e levadas ao laboratório de botânica para a visualização no microscópio trinocular com câmera embutida. As lâminas com amostras que continham células segundo os critérios estabelecidos por Leslie e Summerell, (2006), tiveram os macroconídios fotografados em um aumento de 100x.

Os critérios considerados para a identificação do fungo *F. graminearum* foram: a ausência de clamidósporo, tipo de célula conidiogênica, tipo de células reprodutivas (macroconídio e microconídio) e estrutura de formação dos macroconídios (esporodóquio ou micélio aéreo).

4.4 PADRONIZAÇÃO E CULTIVO DE *F. graminearum* PARA INVESTIGAÇÃO MICOTOXIGÊNICA

Para avaliar o desenvolvimento fúngico sob diferentes condições de estresse foram preparados e autoclavados 20 potes de vidro com 100g de arroz pré-cozido cada (figura 7).

Em seguida, foram inoculados cinco discos de 1cm de diâmetro de agar BDA com crescimento fúngico correspondente as cepas de *F. graminearum* identificadas na análise morfológica, sendo que cada cepa correspondia a uma das áreas de coleta do trigo, em 19 potes e em 1 pote foi inoculado uma cepa de *F. graminearum* ATCC 335 do trigo, da qual já se tem conhecimento de potencial produção de micotoxinas.

Após a inoculação os potes foram fechados com papel kraft e com tampa de vedação para permitir um ambiente com e sem oxigênio respectivamente, em seu interior.

Esta etapa ocorreu em dois momentos, sendo que o primeiro foi realizado o teste sem presença oxigênio com os 20 potes e após os resultados realizou-se o experimento com presença de oxigênio utilizando novamente os 20 potes sobre as mesmas condições de cultivo e incubação.

Figura 7 – Potes contendo arroz pré-cozido e inóculos de *F. graminearum* ATCC 335 do trigo.



Fonte: Cruz, 2018.

Os potes foram incubados a 25°C e dispostos a um fotoperíodo de 12h sob luz negra (40W) para indução de esporulação e estresse das cepas. O crescimento das hifas foi monitorado a cada três dias adicionando-se água estéril para manutenção de umidade em torno de 80%.

Após 21 dias de incubação os frascos com o material contaminado em seu interior foram autoclavados e colocados em estufa a 60°C durante 3 dias para secagem.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 ISOLADOS COLETADOS

Foram obtidas 19 áreas amostrais de trigo provenientes do Sudoeste do Paraná, sendo que para cada área foram isoladas três repetições, resultando em um total de 57 colônias características do gênero *Fusarium* (tabela 2).

A técnica de isolamento e posterior cultivo dos isolados em laboratórios são em geral processos longos e complexos, uma vez que mesmo em condições controladas as cepas podem apresentar dificuldades de desenvolvimento frente a algum fator limitante.

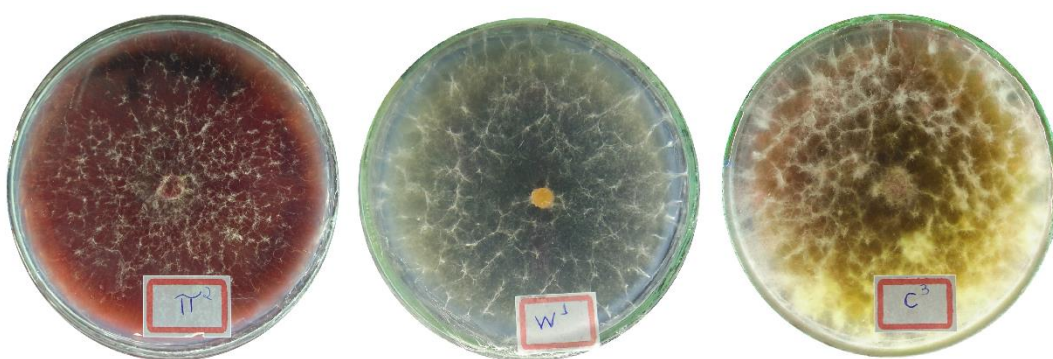
Tabela 2 – Coordenadas dos pontos de coleta dos isolados fúngicos no sudoeste do PR.

Identificação	Município	Coordenadas	Elevação (m)
C	São Jorge D'Oeste	25°57983' - 53°05317'	752
D	Rio Bonito do Iguaçu	25°49786' - 52°57758'	508
E	Coronel Vivida	26°02980' - 52°47288'	560
G	Três Barras do Paraná	25°48238' - 53°29891'	455
H	Três Barras do Paraná	25°49603' - 53°28119'	497
I	Três Barras do Paraná	25°49121' - 53°15621'	582
J	Quedas do Iguaçu	25°47987' - 53°02122'	567
K	Quedas do Iguaçu	25°47831' - 53°07772'	563
L	Quedas do Iguaçu	25°43986' - 53°04846'	587
M	Rio Bonito do Iguaçu	25°54763' - 52°52538'	491
N	Rio Bonito do Iguaçu	25°52169' - 52°55686'	578
P	Três Barras do Paraná	25°49591' - 53°25219'	547
Q	Quedas do Iguaçu	25°49349' - 53°08449'	632
R	Quedas do Iguaçu	25°51985' - 53°07243'	658
S	Francisco Beltrão	26°04557' - 53°17192'	849
T	Honório Serpa	26°14740' - 52°49430'	762
W	Três Barras do Paraná	25°48852' - 53°20473'	574
Y	Três Barras do Paraná	25°48163' 53°16602'	607
II	Candói	25°50146' - 50°07931'	664

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Com a caracterização morfológica utilizando os critérios de Leslie e Summerell, (2006), obteve-se a confirmação de que todos os isolados se tratavam da espécie *F. graminearum*. Os isolados apresentaram culturas com pigmentações avermelhadas, amareladas e alaranjadas, com micélios densos e aéreos. (figura 8).

Figura 8 – Característica morfológica dos isolados em meio BDA.

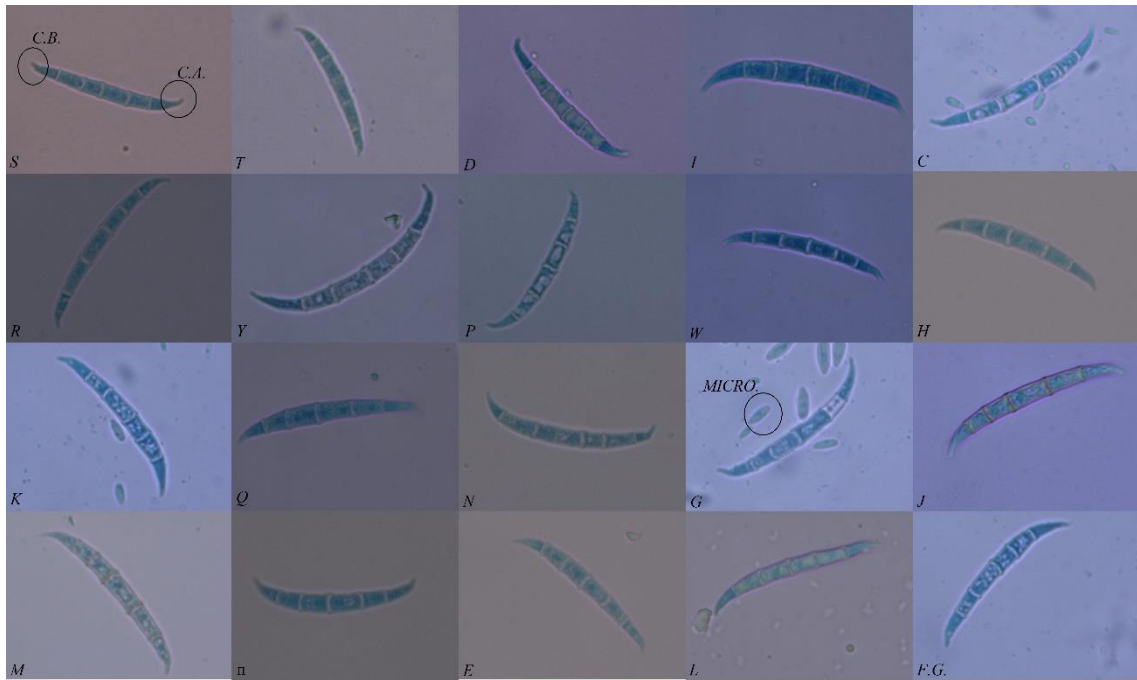


Fonte: Cruz, 2018.

Para a identificação da espécie é de extrema importância a presença de macroconídios, já que estas células apresentam particularidades de acordo com cada espécie do gênero *Fusarium* (BURGESS, et al. 1942). Porém, em condições ambientais favoráveis, a taxa de esporulação na maioria dos fungos é baixa, sendo necessário a utilização de fatores estressantes para aumentá-la.

Assim, a utilização de folhas de eucalipto no meio de cultivo serviu para substituir o usual meio folha de cravo-ágar (CLA) para auxiliar na produção de macroconídios (figura 9), pois os metabólitos encontrados em suas folhas servem de agente estressante para o fungo. Schultz e Auer (2010) testaram o uso da folha de eucalipto para a esporulação de fungos folícolas, e observaram que o método teve êxito nas três espécies utilizadas no estudo. Porém, esta é a primeira vez em que se utiliza este método para o fungo *F. graminearum*.

Figura 9 – Macroconídios de isolados de *F. graminearum* de cada área, em aumento de 100x, formado em meio folha-de-eucalipto. Célula basal (C.B.); Célula apical (C.A); Microconídio (MICRO.)



Fonte: Cruz, 2018

Para o processo de visualização das células foram feitas 3 lâminas para cada área que correspondiam as placas de isolados dos pontos amostrais, totalizando 57 lâminas. Em todas as amostras foi possível a observação de macroconídios bem desenvolvidos.

Os macroconídios encontrados possuíam células apicais cônicas e células basais em formato de pé, além disso, possuíam cinco septos em sua estrutura (figura 10), características correspondentes a espécie *F. graminearum*.

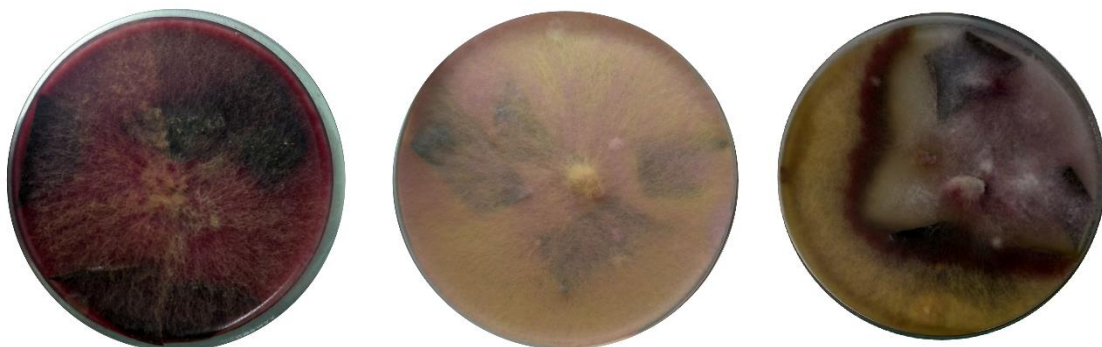
Figura 10 – Características estruturais de macroconídio de um isolado de *F. graminearum*



Fonte: Cruz, 2018.

Em relação ao período de incubação usualmente os fungos em geral levam de 5 a 7 dias para seu desenvolvimento, porém, para a produção de células ou até mesmo de metabólitos leva cerca de 14 a 21 dias. Após o período de incubação de 21 dias em meio folha de eucalipto-BDA, os micélios apresentavam colorações avermelhadas e amarelo/laranjadas (figura 11).

Figura 11 – Características morfológicas de isolados em meio folha de eucalipto-BDA.

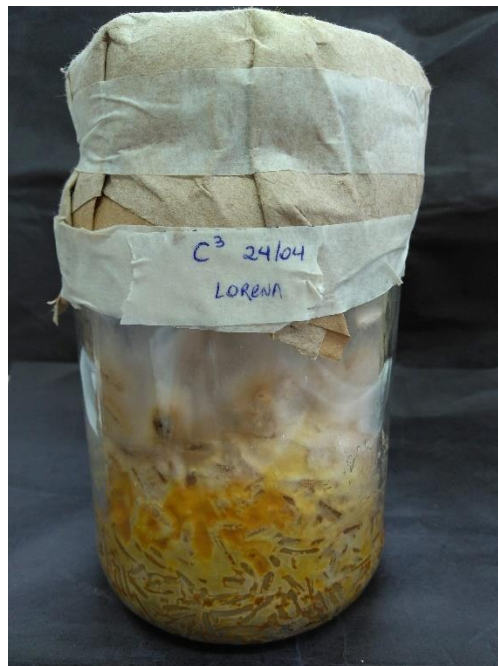


Fonte: Cruz, 2018.

5.3 CULTIVO DE *F. graminearum* PARA INVESTIGAÇÃO MICOTOXIGÊNICA

O cultivo dos isolados no arroz possibilitou um crescimento muito satisfatório onde os frascos estavam apenas com papel kraft (figura 12), permitindo a ocorrência de trocas gasosas. Em um período de 10 dias os micélios haviam crescido por todo o substrato e já apresentavam coloração amarelada.

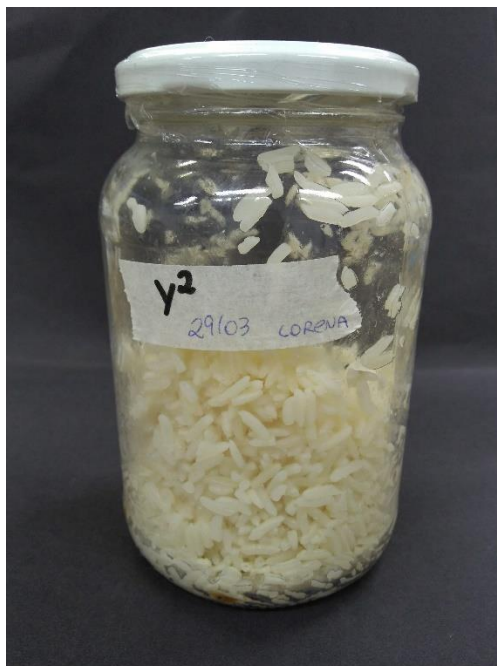
Figura 12 – Cultivo de *F. graminearum* em arroz pré-cozido após incubação de 21 dias com presença de O².



Fonte: Cruz, 2018.

Já nos frascos que estavam tampados com tampa de alumínio, onde havia se formado vácuo, observou-se um crescimento micelial apenas na primeira semana de incubação, em seguida o crescimento cessou (figura 13).

Figura 13 - Cultivo de *F. graminearum* em arroz pré-cozido após incubação de 21 dias com ausência de O₂.



Fonte: Cruz, 2018.

Heidtmann-Bemvenuti et al. (2012), discute sobre a relação entre o desenvolvimento fúngico e fatores abióticos, bem como a produção de micotoxinas. Dentre esses fatores está a atividade da água, temperatura, oxigênio e o substrato.

O fator oxigênio foi extremamente importante para o desenvolvimento dos isolados nos cultivos em arroz. Uma vez que a maioria dos fungos filamentosos, incluindo o *F. graminearum* são aeróbios, a ausência de O₂ se torna um fator para o controle fúngico. Fato confirmado por Baptista, Horii e Baptista (2004), que discute a inibição do desenvolvimento fúngico quando as concentrações de dióxido de carbono estão elevadas e as de oxigênio abaixo de 1%.

Em relação a produção de micotoxinas, os fungos toxicogênicos dependem dos mesmos fatores abióticos, além da linhagem do fungo contaminante e do estresse causado nele para produzirem esses metabólitos.

Segundo Gonçalves, Pinto e Felício (2001), a produção de micotoxinas está inteiramente ligada ao desenvolvimento do fungo, porém, apenas a presença fúngica não garante a presença de micotoxinas.

Assim, o uso da luz negra serviu como fator estressante na indução de produção de micotoxinas pelos isolados. Teixeira et al. (2001), analisou que o efeito da luz negra sobre *F. graminearum* induziu a uma alta taxa de esporulação, demonstrando que o fungo estava extremamente estressado diante de sua exposição à radiação da luz.

6 CONCLUSÕES

Os resultados observados permitem concluir que todas as áreas amostrais de culturas tritícolas estavam contaminadas pelo fungo fitopatogênico e toxicogênico *F. graminearum*. Em termos de produção e qualidade do alimento deve-se realizar a manutenção adequada dos grãos a fim de minimizar a presença de contaminantes bióticos.

A técnica de indução de esporulação para obtenção de macroconídios em *F. graminearum* é geralmente utilizada em ágar cravo, pela primeira vez foi utilizado o ágar folha de eucalipto para esta espécie e os resultados indicaram a presença de grande quantidade destes esporos, ou seja, trata-se de uma boa alternativa ao ágar cravo.

Além disso, o cultivo de *F. graminearum* em arroz para potencial produção de micotoxinas foi satisfatória uma vez que o fungo se desenvolveu adequadamente. Posterior a esta etapa, há a necessidade de quantificação por análise de cromatográfica líquida de alta eficiência, da presença de micotoxinas produzida pelos isolados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABITRIGO - Associação Brasileira da Indústria do Trigo. **O trigo na História:** há 10 mil anos na história da humanidade. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/trigo-na-historia.php>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

ALMEIDA, A. P. de; LAMARDO, L. C. A.; SHUNDO, L.; SILVA S. A. da; NAVAS S A, ALABURDA J.; RUVIERI V.; SABINO, M. Occurrence of deoxynivalenol in wheat flour, instant noodle and biscuits commercialised in Brazil. **Food Additives & Contaminants: parte B**, v. 9, p. 251-255, 2016.

ALMEIDA, R. R. de. **Ocorrência de *Fusarium graminearum* e desoxinivalenol em grãos de trigo utilizados no Brasil.** Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz Queiroz', Universidade de São Paulo, 2006.

ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 07, 18 Fevereiro 2011.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/afe3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966>. Acesso em: 14 set. 2017.

APS. **Micotoxinas nas lavouras (culturas, pt): um perigo à saúde humana e de animais domésticos: tricotecenos.** Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Micotoxinas/Pages/TrichothecenesPort.aspx>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.** ed. 15. v. 2. Arlington: IAL - 779 A.O.A.C., 1990.

AUDENAERT, K.; VANHEULE, A.; HÖFTE, M.; HAESAERT, G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. **Toxins**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2013.

BAPTISTA, A. S.; HORRI, J.; BAPTISTA, A. S.; Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos.** v. 22, p. 1-14, 2004.

BHAT, R. V.; BEEDU S. R.; RAMAKRISHNA, Y.; MUNSHI, K. L. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, India. **The Lancet**, v. 333, p. 35-37, 1989.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; NELSON, P. E. An evaluation of several media for use in identification of some *Fusarium* species. **Australasian Plant Pathology.** v. 20, p. 86-88, 1991.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. Laboratory manual for *Fusarium* research. ed. 3. Sydney: University of Sydney, 1942.

BUSSO, C. **Caracterização genética de isolados patogênicos de *Pyricularia grisea* e *Fusarium graminearum* do trigo (*Triticum aestivum*) e do triticale (*X. triticosecale*) no Estado do Paraná.** Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, 2005.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; BLUM, M. M. C.; BOGO, A.; SCHEER, O.; ZANATA, T. Danos causados pela infecção de *Giberella zeae* em trigo. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, p. 289-293, 2004.

CHELKOWSKI, J. **Mycotoxins associated with corn cob fusariosis.** In: *Fusarium: Mycotoxins, taxonomy and Pathogenicity.* ed. 1, v. 2. Amsterdam: Elsevier. 1989.

CONAB. **A cultura do Trigo.** Brasília: Conab, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_03_16_09_46_a_cultura_do_trigo-versao_digital_nova_logo.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2017.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2017.

DANELLI, A. L. D.; ZOLDAN, S.; REIS, E. M. **Giberela - ciclo da doença.** OR Melhoramento de Sementes. Disponível em: <<http://www.orsementes.com.br/sistema/anexos/artigos/20/Ciclo%20giberela.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2017.

DEL PONTE, E. M., FERNANDES, J. M. C.; PIEROBOM, C. R.; BERGSTROM G. C. Giberela do trigo: Aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 587-605, 2004.

EMBRAPA. **Trigo.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/trigo1>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no instituto biológico de 1989 a 1999. **Biológico**. v. 63, p. 15-19, 2001.

HASSAN, Y. I.; BULLERMAN, L. B. Wheat bran as an alternative substrate for macroconidia formation by some *Fusarium* species. **Journal of Microbiological Methods**. v. 77, p. 134-136, 2009.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; HACKBART, H. C. DOS S.; SOUZA, M. M. DOS; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e hplc/uv-fl. **Química Nova**. v. 35, p. 1244-1249, 2012.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167(2), p. 101-134, 2001.

INDEX FUNGORUM. *Fusarium*. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=211139>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

KOTAL, F.; RADOVÁ, Z. A simple method for determination of deoxynivalenol in cereals and flours. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 20, p. 63-68, 2002.

LAU, D. **Multimídia**: Banco de Imagens. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/836001/sintomas-de-giberela-em-espiga-de-trigo>>. Acesso em: 27 set. 2017.

LEAL, A.; VELOSO, L.; PEDI, N.; LEMOS, S.; MACÊDO, D.; MAGALHÃES, O.; NEVES, R. Onicomioses por espécies de *Fusarium*: revisão bibliográfica. IN: **IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão - Jepex**, Recife, Anais, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

LEE S.O.; CHOI G.J.; CHOI Y.H.; JANG K.S.; PARK D.J.; KIM C.J.; KIM J.C. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Microbiol and Biotechnol**, v.18, p. 1741– 1746, 2008.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Iowa: Blackwell Publishing, 2006.

LIMA, M. I. P. M. **Reduzindo perdas por Giberela**. EMBRAPA. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13347958/artigo---reduzindo-perdas-por-giberela>>. Acesso em: 07 set. 2017.

LIMA, M. I. P. M.; FERNANDES, J. M. C. **Giberela**: um problema de todos. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/giberela-um-problema-de-todos>>. Acesso em: 07 set. 2017.

MARROQUÍN-CARDONA, A.G.; JOHNSON, N. M. PHILLIPS, T. D. HAYES, A. W. Mycotoxins in a changing global environment: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220-230, 2014.

MICHEREFF, S. J.; NORONHA, M. A.; ROCHA-JR, O. M.; SILVA, J. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Variabilidade de isolados de *Alternaria brassicicola* no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 656-663, 2003.

MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIĆ, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. **Toxins**, v. 2, p. 572-592, 2010.

MORI, C. de.; ANTUNES, J. M.; FAÉ G. S.; ACOSTA, A. da S. **Trigo: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v. 2, p. 705-713, 2003.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p. 479-504, 1994

NETO, F. X. de B. T. **Transmissão e controle de *Fusarium graminearum* em sementes e danos causados pela Giberela em trigo**. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, 2004.

NITZKE, Julio A.; THIS, Roberta C. S. **Avaliação da qualidade tecnológica/industrial da farinha de trigo**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/napead/repositorio/objetos/avaliacao-farinha-trigo/index.php>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

OSÓRIO, E. A. **A cultura do trigo**. 1. ed. São Paulo: Globo, 1992.

PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: toxology and potential effects on humans. **Journal of Toxology and Environmental Health**, v. 8, p. 39-69, 2011.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; JÚNIOR, I. A.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 431-438, 2006.

ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. da C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 8(4), p. 159-165, 2013.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, p. 663-675, 2012.

SANTOS, J. S. DOS.; ONO, E. Y. S.; ITANO, E. N.; HIROOKA, E. Y. Zearalenone and deoxynivalenol in Brazilian wheat – cenary requesting for analytical monitoring. **Biosaúde**, Londrina, v. 12, n. 1/2, p. 31-46, 2010.

SANTOS, J.S. dos.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y. S.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.; MIRANDA, M. Z. de.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of deoxynivalenol in heat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat products. **Food Chemistry**, v. 138, p. 90-95, 2013.

SCHULTZ, B.; AUER, C. G. Método para auxiliar a identificação de fungos foliícolas do eucalipto. **IX EVINCI**. Colombo, 2010.

SCHMALE III, D. G.; BERGSTROM, C.G. **Giberela ou fusariose**. Tradução de DEL-PONTE, E. M. The plant health instructor. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/FusariumPort.aspx>>. Acesso em: 07 set. 2017.

SOBROVA, P.; ADAM, V.; VASATKOVA, A.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity. **Toxicology**, v. 3, p. 94-99, 2010.

SOLOVEY, M. M. S.; SOMOZA, C.; CANO, G.; PACIN, A.; RESNIK, S. A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and Aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, p. 325-329, 1999.

STREIT, E.; NAEHRER, K.; RODRIGUES, I.; SCHATZMAYR, G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93(12), p. 2982-2899, 2013.

TEIXEIRA, H.; CHITARRA, L. G.; ARIAS, S. M. S.; MACHADO, J. DA C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação in vitro de fungos fitopatogênicos. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 25, p. 1314-1320, 2001.

VESONDER, R. F.; GOLINSKI, P. **Metabolites of Fusarium**. In: CHELKOWSKI, J. *Fusarium: Mycotoxins, taxonomy and Pathogenicity*. ed. 1, v. 2. Amsterdam: Elsevier. 1989.

WANNEMACHER, R.W; WIENER, S. L. Trichothecene mycotoxins. In: SIDELL, F. R. et al. **Medical aspects of chemical and biological warfare**. WASHINGTON, 1997.

ZHENG D, ZHANG S, ZHOU X, WANG C, XIANG P, ZHENG Q, XU, JING-KONG. **The fghog1 pathway regulates hyphal growth, stress responses, and plant infection in *Fusarium graminearum***. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049495>>. Acesso em: 26 set. 2017.

ZOLDAN, S. M.; REIS, E. M. **Regiões de risco, caracterização da antese em cereais de inverno e sistema de alerta para a Giberela, em trigo**. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2008.