



**IARA ELEUTÉRIA DIAS**

**INTERAÇÃO DE *Penicillium* spp E *Aspergillus*  
*flavus* COM SEMENTES E GRÃOS DE MILHO E  
SOJA**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**IARA ELEUTÉRIA DIAS**

**INTERAÇÃO DE *Penicillium spp* E *Aspergillus flavus* COM SEMENTES E  
GRÃOS DE MILHO E SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Patologia de Sementes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. José da Cruz Machado

Orientador

Dr. Theo van der Lee

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Dias, Iara Eleutéria.

Interação de *Penicillium* spp e *Aspergillus flavus* com sementes  
e grãos de milho e soja / Iara Eleutéria Dias. – Lavras: UFLA, 2016.  
150 p.

Tese (doutorado)—Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. Taxonomy, multigene phylogeny and variability. 2.  
Patologia de sementes, qualidade de sementes, fungos de  
armazenamento e teste de vigor. 3. : Fungos de armazenamento,  
condições abióticas e aflatoxinas. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

**IARA ELEUTÉRIA DIAS**

**INTERAÇÃO DE *Penicillium spp* E *Aspergillus flavus* COM SEMENTES E  
GRÃOS DE MILHO E SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Patologia de Sementes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de abril de 2016

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza	UFLA
Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA
Prof. Dr. Flávio Meira Borém	UFLA
Dra. Maria Heloisa Salustiano	EPAMIG

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

Dr. Theo van der Lee  
Coorientador

**LAVRAS-MG**

**2016**

*Aos amores da minha vida, meu porto seguro, fontes de amor, luz e alegrias, meus pais Ione e Gabriel, minha irmã Isabela, que sempre me apoiaram e me ajudaram em todas as situações e que, muitas vezes, se privaram de coisas para me ajudar a ir ao encontro dos meus ideais; ao meu cunhado Daniel e às minhas lindas sobrinhas, Ana Carla e Helena, é com eterna gratidão e amor que lhes agradeço e lhes.*

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Fitopatologia, ao Laboratório de Patologia de Sementes, pela oportunidade da realização deste trabalho. A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor, Dr. José da Cruz Machado, por ter me aceitado como sua orientada, pelos valiosos ensinamentos, amizade e atenção que sempre me dedicou durante o doutorado. Ao Theo van der Lee de Wageningen, por me receber, pela atenção e disposição em me ajudar. E por perceber e dar valor à minha dedicação e trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos antigos e mais novos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes, Ângela Fátima, Elenice, Mirian Salgado, Bruno Moretti, Bárbara, Carol, Marina, Sueny, Stelio, Jonas, Gabriel, Paulo e Pedro que ajudaram, com tanta disposição, para a realização deste trabalho e pela amizade. Em especial, às minhas amigas e irmãs, Mirella Figueiró de Almeida, Poliana Lima e Carla Correa, que nunca mediram esforços para me ajudar, principalmente, nesta fase final do doutorado, agradeço-lhes de todo coração. Às minhas amigas de casa, minha família, Angélica, Mariana, Kedma, Susan, Nicele, Marina, Viviany, Daynara que sempre estiveram dispostas a me ajudar e pelo carinho. Aos amigos que conheci em Lavras e que, durante estes anos, fizeram parte da minha vida, nos momentos de alegrias e tristezas, Flávia Mara, Érica Beluti, Willian Terra, Gustavo Mateus, Helon Santos, Thaís Ramalho, Camila, Felipe Moretti.

À minha linda e amada família, que sempre me apoiou e torceu por mim. Às minhas amigas e amigos que conheci na Holanda que, mesmo longe, sempre estiveram comigo em pensamento e sempre torceram por mim. E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

## RESUMO GERAL

No Brasil, poucos trabalhos, referentes à diversidade, à transmissão sementes-plantas e ao comportamento destas espécies, em ambientes de estresse, têm sido realizados. Os objetivos desta pesquisa foram identificar as espécies de *Penicillium* em milho, produzido em algumas regiões do Brasil. Avaliar a relação das espécies de *Talaromyces wortimannii* e *Penicillium* nov. sp nas sementes de milho. Estudar o comportamento de espécies de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* e a interação destas espécies com grãos de milho e soja. Para realizar o estudo da diversidade de *Penicillium*, utilizou-se de análises filogenéticas, baseadas nos genes ITS, Beta-tubulina e RPB2. Na avaliação das relações de *T. wortimannii* e *Penicillium* nov sp. Utilizaram-se dois procedimentos de contaminação, sendo os resultados avaliados pelos testes de sanidades (Método Blotter), germinação, índice de velocidade de emergência, altura, peso fresco e peso seco e estande final e inicial. Para o estudo do comportamento dos isolados de *Penicillium* e *Aspergillus*, os fungos foram cultivados em meio BDA, modificado pelos solutos glicerol, manitol e NaCl, em três níveis de potenciais hídricos e acondicionados em diferentes temperaturas. Após um período de incubação, os isolados foram analisados pelo índice de crescimento micelial e pela produção de conídios. Em seguida, os grãos de milho e soja foram contaminados, separadamente com cada isolado, e acondicionados nas mesmas condições de estresse hídrico e temperatura. As sementes contaminadas e não contaminadas foram analisadas quanto ao seu teor de água e à produção de aflatoxinas. Dos isolados coletados, 107 espécies foram identificadas, dentre elas, duas novas espécies. A incidência das espécies de *Talaromyces* e *Penicillium* foi de 100%, não houve interferência na porcentagem de germinação das sementes de milho. Com base nos resultados de IVE e estande inicial e final observou-se uma redução de ambos no potencial de 96 horas. À medida que se aumentou o período de exposição, houve uma redução de altura e peso fresco das plantas. A maior incidência ocorreu no cotilédone em comparação com a inserção, por sua vez, a incidência de *T. wortimannii* foi maior do que a incidência de *Penicillium* nov. sp. No estudo do comportamento, observou-se que, em nenhum dos potenciais, houve inibição de crescimento micelial e produção de conídios, sendo registrado maior crescimento micelial nos potenciais de -1,0, -5,0 e -10,0 Mpa e à temperatura de 20, 25 e 30 °C. O aumento no teor de água dos grãos de milho e soja contaminados com isolados de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* e uma alta concentração das aflatoxinas nos grãos contaminados com o isolado de *Aspergillus*.

**Palavra chave:** Diversidade. Qualidade de sementes. Fungos de armazenamento. Micotoxinas.

## GENERAL ABSTRACT

In the Brazil few studies have been conducted performed in relation to diversity, the transmission in the seeds and plants and to behavior of these species in stressful environments. The aim of this research was to identify the species of *Penicillium* in maize produced in some regions of Brazil. To evaluate the relation of the species *Talaromyces wortimannii* and *Penicillium* nov. sp on maize seeds. Studying the behavior of *Penicillium polonicum* and *Aspergillus flavus* isolates and the interaction of these species with maize and soybean grain. The phylogenetic analyzes based on the ITS, beta-tubulin and RPB2 genes were used for studying the diversity. In the effects of *T. wortimannii* and *Penicillium* sp nov. two contamination procedures of maize grain were used, and the results were evaluated used sanitary test (blotter method), germination, emergence speed index, fresh and dry height, and initial and final stand. To study the behavior of the isolated *Penicillium polonicum* and *Aspergillus flavus*, the fungi were grown on PDA medium, modified by solutes glycerol, mannitol and NaCl in three potential of water and different temperatures. After incubation period isolates were analyzed by mycelial growth rate and the production of conidia. The maize and soybeans grain were contaminated separately with each isolate, and storage in the same conditions of water stress and temperature. The contaminated and uncontaminated seeds were analyzed for water content and aflatoxins concentration. The 107 isolates collected were identified, among them species of *Penicillium* and *Talaromyces* and two new species. The incidence of the *Talaromyces* and *Penicillium* species was 100%, the high incidence of these species not affected the percentage of maize seed germination. Based on the results of IVE and initial and final of the stand observed a reduction of both in the potential of 96 hours. The increased of exposition period reduced the height and fresh weight of the plants. The highest incidence was in the maize stalk and the incidence of *T. wortimannii* was higher than the incidence of *Penicillium* nov. sp. In the study of the behavior and effect of *Penicillium polonicum* and *Aspergillus flavus* species observed that there was not inhibition of growth and production of conidia in any potential, being, that the greater mycelial growth in the potential of -1.0, -5,0 and - 10.0 Mpa and temperature of 20, 25 and 30 ° C. The same conditions of water stress and temperature provided the increase in water content of maize and soybean grain contaminated with *Penicillium polonicum* and *Aspergillus flavus* isolates and the high concentration of aflatoxin in grain contaminated with *Aspergillus* isolate.

**Key words:** Diversity. Seed Quality. Storage fungi. Mycotoxin.



## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Produção de sementes e grãos no Brasil</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Associação de fungos com sementes e grãos</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Aspectos gerais das espécies de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i></b> .....	18
<b>2.3.1</b>	<b>Morfologia e Taxonomia de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i></b> .....	19
<b>2.3.2</b>	<b>Morfologia e taxonomia de espécie de <i>Aspergillus</i></b> .....	20
<b>2.3.3</b>	<b>Identificação morfológica de <i>Penicillium</i>, <i>Talaromyces</i> e <i>Aspergillus</i></b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Métodos moleculares para identificação de espécies de <i>Penicillium</i> e <i>Talaromyces</i></b> .....	21
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
	<b>CAPÍTULO 2 DIVERSITY OF <i>Penicillium</i> AND RELATED SPECIES IN MAIZE GRAIN AND SEED IN BRAZIL</b> .....	31
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	35
<b>2</b>	<b>MATERIAL E METHODS</b> .....	39
<b>2.1</b>	<b>Isolates and collection procedures</b> .....	39
<b>2.2</b>	<b>Preservation of the fungal isolates</b> .....	39
<b>2.3</b>	<b>DNA Extraction</b> .....	40
<b>2.4</b>	<b>PCR amplification and sequencing</b> .....	40
<b>2.5</b>	<b>Phylogenetic analysis</b> .....	40
<b>3</b>	<b>RESULTS</b> .....	43
<b>3.1</b>	<b><i>Penicillium</i> species collected from maize</b> .....	43
<b>3.2</b>	<b><i>Talaromyces</i> species collected from maize</b> .....	46
<b>4</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	53
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	55
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
	<b>APPENDICES - SUPPLEMENTARY MATERIAL: BAYESIAN PHYLOGENETIC TREE BASEAD ON ITS, BETA-TUBULIN AND RPB2</b> .....	64
	<b>CAPÍTULO 3 RELAÇÕES ENTRE <i>Penicillium nov sp.</i> E <i>Talaromyces wortimannii</i> COM SEMENTES DE MILHO CONTAMINADAS POR DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE INOCULAÇÃO</b> .....	71
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	75
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	77

2.1	Avaliação dos efeitos das espécies de <i>Penicillium</i> nov sp. e <i>Talaromyces wortimannii</i> nas sementes de milho contaminadas por dois procedimentos de inoculação .....	77
2.1.1	Procedimento 1: Inoculação das sementes de por meio de mistura de massa seca do inóculo fungico com as sementes .....	77
2.1.2	Procedimento 2: Contaminação pelo método de condicionamento fisiológico das sementes na presença dos fungos.....	78
2.2	Avaliações dos ensaios.....	79
2.2.1	Teste de Germinação em Laboratório.....	79
2.2.2	Teste de emergência em substrato de solo.....	79
2.2.2.1	Índice de velocidade de emergência (IVE) .....	79
2.2.2.2	Contagem de estandes inicial e final .....	80
2.2.2.3	Pesos fresco e seco.....	80
2.2.2.4	Determinação da taxa de contaminação das sementes inoculadas com os isolados de <i>T. wortimannii</i> e <i>Penicillium</i> nov. sp.....	80
2.3	Análises dos dados .....	81
3	<b>RESULTADOS</b> .....	83
3.1	Incidência das espécies de <i>T. wortimannii</i> e <i>Penicillium</i> nov sp no cotilédone e inserção das plantas de milho.....	95
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	97
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103
	<b>CAPÍTULO 4 COMPORTAMENTO, INTERAÇÃO E EFEITOS DE ESPÉCIES DE <i>Penicillium polonicum</i> E <i>Aspergillus flavus</i> EM GRÃOS DE MILHO E SOJA, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E NÍVEIS DE RESTRIÇÃO HÍDRICA</b> .....	105
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	109
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	113
2.1	Obtenção de isolados fúngicos.....	113
2.2	Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos fungos submetidos à restrição hídrica e diferentes temperaturas.....	113
2.3	Efeitos da interação de <i>Penicillium polonicum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> com grãos de milho e soja submetidos a diferentes temperaturas e níveis estresse hídricos.....	114
2.3.1	Determinação do teor de água nos grãos.....	115
2.3.2	Determinação da aflatoxina nos grãos de milho e soja .....	116
2.3.3	Delineamento experimental .....	116
2.4	Análises estatísticas .....	116
3	<b>RESULTADOS</b> .....	117

3.1	Comportamento das espécies de <i>Penicillium polonicum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> em meio de cultura sólido com restrição hídrica.....	117
3.1.1	Índice de Crescimento Micelial (ICM) dos isolados de <i>Penicillium polonicum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> .....	117
3.1.2	Produção de conídios dos isolados de <i>Penicillium polonicum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> .....	121
3.2	Efeito da interação dos isolados de <i>Penicillium polonicum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> com grãos de milho e soja.....	126
3.2.1	Teor de água dos grãos de milho contaminados com os isolados de <i>Penicillium polonicum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> .....	126
3.2.2	Teor de água dos grãos de soja contaminados com os isolados de <i>Penicillium polonicum</i> e <i>Aspergillus flavus</i> . ....	130
3.2.3	Concentração de aflatoxinas em grãos de milho e soja contaminados com <i>Aspergillus flavus</i> .....	134
4	DISCUSSÃO.....	139
5	CONCLUSÃO.....	143
	REFERÊNCIAS.....	145

## CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola brasileira vem alcançando aumentos significativos nos últimos anos, sendo registrados índices acima de 1,3% e com uma expansão da área cultivada em torno de 1% de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016). A agricultura tradicional ou familiar, representada por pequenos produtores, e a agricultura empresarial, representada por grandes produtores e empresas envolvidas nesta cadeia, têm enfrentado sérios problemas de natureza fitossanitária. É importante salientar que a qualidade das sementes e grãos constitui matéria básica, para a produção de alimentos e derivados, sendo ponto chave para o sucesso desses empreendimentos na cadeia agrícola.

A principal via de disseminação de fungos fitopatogênicos, a exemplo de outros grupos de patógenos estudados, é a semente, por meio da qual estes agentes podem ser veiculados externamente, na forma de conídios, ou internamente, na forma de micélio dormente (AGUIAR et al., 2001; MASSOLA JÚNIOR; BEDENDO, 2005). O nível de inóculo nas sementes, assim como temperatura e umidade, é um dos importantes fatores que influenciam o progresso da incidência e da severidade das doenças no campo (ARAÚJO et al., 2006).

A elevada diversidade de espécies em sementes combinada com a sua distribuição mundial tem exigido um estudo taxonômico, filogenético e o entendimento de fatores que propiciam o desenvolvimento destes organismos, a fim de proporcionar ferramentas mais apropriadas para uma identificação rápida e precisa (KRIMITZAS et al., 2013).

A incidência de fungos, como espécies de *Penicillium*, vem aumentando em muitas áreas de cultivo de milho, aumento este que tem sido observado,

principalmente, em análises de rotina. O conhecimento da diversidade, da taxonomia, fisiologia e o monitoramento da ocorrência destes fungos e de fatores que predispõem a contaminação é a maneira mais eficaz de prevenir ou reduzir a incidência das espécies de *Penicillium* e, possivelmente, a produção das toxinas.

As espécies de *Penicillium* e, também, as de *Aspergillus* são responsáveis pelas deteriorações dos grãos. Ambas as espécies podem causar perdas de rendimento e redução da qualidade de sementes, além de serem capazes de produzir uma grande variedade de toxinas que constituem um perigo potencial para a saúde de animais e seres humanos (FREIRE et al., 2007; HOUBRAKEN; SAMSON, 2011; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

A presença de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, nas sementes e grãos, pode indicar o grau da deterioração (MILLER, 1995), sendo este processo dependente da atividade das variáveis bióticas que, por seu turno, são afetadas, principalmente, pela interação da temperatura e umidade. A deterioração pode ser baixa no início, porém, quando ocorrem combinações dessas variáveis, podem ser geradas perdas significativas na qualidade dos produtos (D'ARCE, 2009).

A temperatura e a umidade do ambiente são fatores importantes que podem favorecer o crescimento e a produção de micotoxinas (PEREIRA et al., 2008), a variação de clima das regiões pode ajudar no desenvolvimento, na contaminação e consequente produção de toxinas (FRANCO, 2008; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION, 2004).

Atualmente, a busca pela qualidade dos grãos e subprodutos é prioridade para produtores, processadores, para os distribuidores desses produtos e governos. No Brasil, poucos trabalhos, referentes à diversidade, à transmissão sementes-plantas e ao comportamento destas espécies, em ambientes de estresse, têm sido realizados. Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar as espécies de *Penicillium* sementes de milho, produzidas em

algumas regiões do Brasil. Avaliar a relação das espécies de *Talaromyces wortimannii* e *Penicillium* nov. sp. nas sementes de milho. Estudar o comportamento de espécies de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* e a interação destas espécies com grãos de milho e soja submetidos às diferentes condições de estresse hídrico e de temperatura.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Produção de sementes e grãos no Brasil

O agronegócio brasileiro é um dos segmentos que mais tem contribuído com a economia do país, participando, neste sentido, com uma parcela de 30%. No âmbito mundial, este setor situa-se entre os líderes mundiais de produção e exportação de várias *comodities*. A produção de grãos prevista para a safra 2015/2016 foi estimada com crescimento de 1,3% em relação à safra anterior, com uma área agrícola cultivada superior em 1,0% em relação à safra de 2014/2015 (CONAB, 2016).

Nos últimos anos, a crescente participação do Brasil no mercado internacional tem sido resultado da combinação de fatores como: clima favorável, investimento em tecnologia, extensão territorial cultivável e qualidade dos insumos (CONAB, 2016; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016). A projeção do Ministério da Agricultura é que, até 2030, um terço dos produtos comercializados tenha origem brasileira em função da crescente demanda dos países asiáticos (MAPA, 2016).

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de milho e o segundo maior produtor de soja. O milho é cultivado, principalmente, nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MAPA, 2016) sendo Paraná, Minas Gerais e São Paulo os principais estados produtores (AGRIANUAL, 2016; CONAB, 2016). Para a cultura da soja, a região Centro-Oeste é a principal produtora no país, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor (CONAB, 2016).

As culturas de milho e de soja, no Brasil, estão sujeitas à ocorrência de várias doenças que podem comprometer seus rendimentos em consequência do estreitamento das relações patógeno-hospedeiro-ambiente nestes patossistemas (STEFANELLO et al., 2012).



As sementes e grãos, quando contaminados com fungos, além dos danos físicos e químicos, como descolorações, reduções nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais, podem conter substâncias denominadas de micotoxinas, tóxicas ao homem e animais. As principais espécies, produtoras destes metabólitos, são conhecidas como fungos toxigênicos, entre eles encontram-se espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* *Penicillium* e *Talaromyces* (BUIATE et al., 2008).

Estas espécies são conhecidas por apresentarem impactos positivos e negativos sobre as atividades humanas (HOUKBRAKEN; SAMSON, 2011). A incidência destes organismos e os consequentes riscos de produção de toxinas têm assumido cada vez mais importância e gerado preocupações em todo mundo.

## **2.2 Associação de fungos com sementes e grãos**

A associação fúngica tem sido apontada como uma das principais causas da perda da qualidade de sementes e grãos, durante o plantio e colheita, bem como no armazenamento. Os fungos representam um dos grupos mais ricos em espécies, sendo importantes na decomposição e reciclagem de nutrientes vegetais (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008). Os agentes causais mais comumente encontrados em sementes e grãos de milho são: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium* e *Stenocarpella* (PINTO, 2005).

A maioria das doenças que incide nas sementes e grãos tem seus agentes causais transmitidos pelas sementes que, desta maneira, são importantes e eficientes veículos de disseminação de patógenos. Alguns desses patógenos, uma vez introduzidos no local, podem sobreviver no solo, aumentando o potencial de inóculo já existente, infetando as plântulas de cultivos posteriores (PEREIRA, 1997; PINTO, 1996; PINTO, 1998).

A intensidade dos danos causados pelos patógenos associados às sementes e grãos depende do seu nível de infecção, das condições de beneficiamento e armazenamento, bem como das variáveis edafoclimáticas do local de plantio (BACON; HINTON; RICHARDSON, 1994; PINTO, 1996; OCHOR; TREVATHAN; KING, 1987). A incidência desses agentes em sementes e grãos representa, ainda, um problema adicional pela produção de micotoxinas. No Brasil, os relatos de fungos toxigênicos apontam a predominância dos gêneros *Fusarium*, seguidos por *Aspergillus* e *Penicillium* (KAWASHIMA; SOARES, 2006).

Muitos estudos relatam os fungos de armazenamento, com destaque para as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* como agentes importantes no processo de deterioração (BELLETTINI et al., 2005; BERJAK, 1987; BORÉM et al., 2006; HENNING, 2005; PARRELLA et al., 2012).

A incidência de *Penicillium* vem aumentando em muitas áreas de cultivo de milho, principalmente, nos grãos, nos últimos anos. Borém et al. (2006) demonstraram a ocorrência de *Penicillium* às sementes recém-colhidas, e o aumento do índice de ocorrência ao longo do armazenamento, resultando em uma intensa deterioração das sementes.

Os efeitos de patógenos na qualidade das sementes são variáveis e podem ser percebidos durante o processo de germinação e nas fases subsequentes ao desenvolvimento das plantas (MACHADO, 2012). A perda do seu poder germinativo e do vigor são alguns dos efeitos causados pela interação de agentes fitopatogênicos com sementes de plantas hospedeiras (CARVALHO, 1999).

Entre os danos causados pelos fungos aos grãos está a diminuição do poder germinativo, o emboloramento visível, a descoloração, o odor desagradável, a perda de matéria seca, o aquecimento, o cozimento, mudanças

químicas e nutricionais, além da produção de compostos tóxicos, as micotoxinas (ALMEIDA et al., 2000; LAZZARI, 1997).

A presença de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* é um indicativo da deterioração e para ocorra depende da atividade das variáveis bióticas que, por seu turno, é afetada, principalmente, pela interação da temperatura e umidade (MILLER, 1995). A deterioração pode ser baixa no início, porém, quando ocorrem combinações dessas variáveis, podem gerar perdas significativas na qualidade dos produtos (D'ARCE, 2009).

Os testes fitossanitários, utilizados para se determinar a sanidade de sementes e grãos, são baseados em métodos de incubação ou microscopia (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997), que são, atualmente, mais difundidos em todo o mundo. Estes testes permitem, além de uma melhor avaliação da incidência destes fungos nas sementes e grãos, estudar a interação de cada espécie de fungo separadamente (MARIO; REIS, 2001).

### **2.3 Aspectos gerais das espécies de *Penicillium* e *Talaromyces***

Espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* são altamente prejudiciais às sementes e associam-se a condições inadequadas de colheita e armazenamento, podendo causar perda do poder germinativo, descoloração e apodrecimento, aquecimento da massa de sementes e produção de micotoxinas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

As espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* responsáveis por perda em produtos agrícolas, agentes dos popularmente chamados de mofos e bolores que ocorrem em substratos (KIMATI, 1978), são patógenos fracos, em certas ocasiões, incidem sobre órgãos de reserva, como sementes e grãos. Em ambos os casos podem produzir micotoxinas. *Penicillium* sp. é o agente causal dos bolores de coloração azul ou verde em frutos cítricos e podem causar podridões de frutos comuns nas condições de pós-colheita (KIMATI, 1978).

As colônias de *Penicillium*, geralmente, são de crescimento rápido, de coloração esverdeada, às vezes branca, consistindo, principalmente, de uma massa de conidióforos. As principais características culturais, utilizadas na identificação de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces*, são a cor e textura da colônia, taxa de crescimento, tolerância térmica, grau de esporulação, presença de pigmentos solúveis e exsudados. A presença de cleistotécios ou gimnotécios ao final de uma a três semanas e a aparência dos ascósporos são os principais elementos para identificação de teleomorfos (SAMSON et al., 2000).

### **2.3.1 Morfologia e Taxonomia de *Penicillium* e *Talaromyces***

O gênero *Penicillium* é caracterizado pela produção de conídios em cadeias a partir de verticilos das fiálides (PITT, 2000).

A taxonomia de *Penicillium* foi, inicialmente, baseada na forma da fiálide e ramificação dos conidióforos, sendo o gênero dividido em 10 seções e 18 séries (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011). Pitt (2000) classificou as espécies monoverticiladas de *Penicilium* no subgênero *Aspergilloides*, as espécies biverticiladas foram classificadas no subgênero *Furcatum*. As espécies biverticiladas, que demonstravam um arranjo regular, com as métulas localizadas, terminalmente, à estirpe, foram classificadas no subgênero *Biverticillium*.

A delimitação, composição e classificação taxonômica das espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* foram modificadas em subseqüentes monografias, culminando com o reconhecimento generalizado do subgênero *Biverticillium*. Por meio da filogenia molecular, espécies anamórficas de *Penicillium* biverticilados foram reclassificadas em *Talaromyces*, além de outras espécies estreitamente relacionadas com estes dois gêneros (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011; SAMSON et al., 2011).

### 2.3.2 Morfologia e taxonomia de espécie de *Aspergillus*

O nome *Aspergillus* foi definido, de acordo com sua característica microscópica, por Micheli (1729). De acordo com o autor, seu conidióforo era semelhante um apergillum ou asperge, um objeto utilizado pela igreja para aspergir água benta (BENNET, 2010; GIBBONS; ROKAS, 2012).

Dentre as espécies isoladas de sementes e grãos, *Aspergillus flavus* é o mais frequente, possuindo uma colônia de coloração verde oliva e as sementes, em geral, apresentando coloração verde amarela (KLICH, 2002; SAMSON, 2000).

As espécies do gênero *Aspergillus* são encontradas em diversos habitats e são conhecidas pela habilidade em produzir grande número de metabolitos secundários. Apesar de produzir diversos de metabólitos prejudiciais ao homem e animal, o gênero *Aspergillus* tem um grande potencial biotecnológico e é largamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica (PALENCIA; HINTON; BACON, 2010).

O gênero *Aspergillus* foi subdividido por Raper e Fennell (1965), em 18 grupos, de acordo com as características morfológicas. Atualmente, o gênero apresenta 339 espécies formalmente descritas (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011; PETERSON, 2006; SAMSON et al., 2014), agrupadas em quatro subgêneros e 19 seções. Esta modificação na taxonomia foi pela adoção do sistema único de nome para fungos, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, que atribuiu ao gênero espécies de forma sexual e assexual.

### 2.3.3 Identificação morfológica de *Penicillium*, *Talaromyces* e *Aspergillus*

*Penicillium*, *Talaromyces* e *Aspergillus* são cultivados e analisados sob condições laboratoriais padronizadas. Os meios de cultura tradicionais

empregados são: Czapek ágar (CZ) e o Extrato de malte (MEA) (SAMSON et al., 2014).

Atualmente, os meios de cultura recomendados como padrão para cultivo das espécies de ambos os gêneros são Czapek levedura ágar autolisado (CYA) e extratos de malte ágar (MEA, Oxoid ou Difco) (SAMSON et al., 2014; VISAGIE et al., 2014). Para a observação de caracteres taxonômicos adicionais, meios de cultura alternativos podem ser utilizados, como Czapek ágar (CZ), CYA a 20 % de sacarose (CY20S), MEA 20% de sacarose (MEA20S), extrato de levedura sacarose ágar (YES), Dicloran glicerol ágar 18 % (DG18), aveia ágar (OA) e creatina sacarose ágar (CREA) (SAMSON et al., 2014; VISAGIE et al., 2014). As temperaturas utilizadas como padrão para incubação são de 25, 30 e 37 °C, durante 7 dias, com cultivo em meio CYA. As temperaturas de 30 e 37 °C são utilizadas para a distinção entre espécies (VISAGIE et al., 2014).

#### **2.4 Métodos moleculares para identificação de espécies de *Penicillium* e *Talaromyces***

A biologia molecular apresenta-se como uma ferramenta importante, para identificação de fungos, de modo geral. A taxonomia, utilizada para espécies de *Aspergillus*, também, é aplicada à espécie de *Penicillium* e *Talaromyces* (SAMSON et al., 2007).

Atualmente, a identificação, com base em características morfológicas, patogênicas, técnicas bioquímicas e moleculares são utilizadas na identificação e no estudo de variabilidade de populações. A elevada diversidade de espécies combinada com a sua distribuição mundial exige estudo taxonômico e filogenético, a fim de proporcionar ferramentas mais apropriadas para uma identificação rápida e precisa (KRIMITZAS et al., 2013).

A análise filogenética das características variáveis do ácido nucleico, atualmente, é a técnica mais viável utilizada para reconhecer as espécies de

acordo com sua evolução (TAYLOR et al., 2000). Como uma ferramenta integrada à abordagem polifásica, a filogenia tem auxiliado nas questões taxonômicas, delimitando as fronteiras entre as espécies evidenciadas em vários táxons, (SAMSON; VARGA, 2009).

Atualmente, a identificação das espécies de qualquer eucarioto se faz possível com uso de uma sequência de DNA e um banco de dados de referências (VISAGIE et al., 2014). A região ITS do rDNA foi aceita como barcode para a identificação de fungos (SCHOCH et al., 2012). Em virtude das limitações da região ITS, genes codificadores de proteínas como as RNA polimerases (RPB1 e RPB2),  $\beta$ -tubulina e camodulina têm provado ser bons marcadores para o reconhecimento das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011).

Houbraken e Samson (2011) analisaram isolados de *P. citrinum* e espécies afins, utilizando a técnica molecular. Os dados moleculares revelaram que seis espécies eram relacionadas com *P. citrinum*, quatro delas, *P. hetheringtonii*, *P. gorlenkoanum*, *P. sizovae* e *P. steckii*, eram, estritamente, anamorfas e duas formavam um teleomorfo, *P. tropicoides* e *P. tropicum*. Os autores concluíram que essas sete espécies pertenciam à série *Citrina*.

A diversidade de fungos, encontrados nas sementes e grãos, depende de vários fatores como região geográfica, clima e método de armazenamento e processamento (PERRONE et al., 2006).

Como a identificação, com base apenas em características morfológicas e patogênicas, não possibilita diferenciar isolados, em âmbito subespecífico, técnicas bioquímicas e moleculares, atualmente, são as mais utilizadas para tal finalidade e no estudo de diversidade de populações (KRIMITZAS et al., 2013).

As características moleculares fornecem um grande número de características viáveis, para a taxonomia de fungos, que são gerados, utilizando

tecnologia, amplamente, disponível, tendo um papel fundamental no reconhecimento das espécies fúngica (GEISER et al., 2007).

Análise multigênica, em um estudo sobre a filogenia e taxonomia de *Penicillium sclerotiorum*, assinala que esta morfoespécie é um complexo de sete espécies filogenéticas distintas. De acordo com os autores, características ecológicas e a distribuição geográfica destas espécies podem ter caracterizado algumas espécies (RIVERA; SEIFERT, 2011).

É importante considerar que, para uma identificação mais precisa, é necessária a combinação destas técnicas moleculares com as características morfológicas, fisiológicas e ecológicas (SAMSON; VARGA, 2009).





## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2016. 480 p.
- AGUIAR, R. H. et al. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de girassol de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 134-139, abr. 2001.
- ALMEIDA, A. P. et al. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 321-326, 2000.
- ARAÚJO, D. V. et al. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 35-40, out. 2006.
- BACON, C. W.; HINTON, D. M.; RICHARDSON, M. D. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 3, p. 302-305, Mar. 1994.
- BEDENDO, I. P. Víroses. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos: volume 1**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1955. p. 899-906.
- BELLETTINI, N. M. T. et al. Patogenicidade de fungos associados às sementes e plântulas de amendoim cv. Tatu. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 167-172, jun. 2005.
- BENJAMIN, C. R. Ascocarps of *aspergillus* and *penicillium*. **Mycologia**, New York, v. 47, n. 5, p. 669-687, Sept./Oct. 1955.
- BENNET, J. W. **An overview of the genus *aspergillus***. New York: CRC Press, 2010. 576 p. Disponível em: <<http://www.open-accessbiology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2016.
- BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by microorganisms. In: **ADVANCED INTERNATIONAL COURSE ON SEED PATHOLOGY**, 1987, Passo Fundo. **Proceedings...** Passo Fundo: Embrapa, 1987. p. 93-112.

BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, United Kingdom, v. 137, n. 3/4, p. 265–282, July 2007.

BORÉM, F. M. et al. Controle de fungos presentes no ar e em sementes de feijão durante armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 651-659, dez. 2006.

BUIATE, E. A. S. et al. Reação de híbridos de milho e levantamento dos principais fungos associados ao complexo de patógenos causadores de “grão ardido” em Minas Gerais. **Horizonte Científico**, Uberlândia, v. 2, n. 1, p. 14, jul. 2008.

CARVALHO, J.C.B. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Série histórica de produção safras 2014/15 a 2016**. Brasília: Conab, 2016. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=131>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

D'ARCE, M. A. B. R. **Pós-colheita e armazenamento de grãos**. São Paulo: Departamentode Agroindústria, Alimentos e Nutrição, 2009. 17 p. Material Didático.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION - FAO. **Almacenaje**. América Latina: AGRIS, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FREIRE, F. C. O. et al. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p.

GEISER, D. M et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 1-10, 2007.

- GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **Current Biology**, USA, v. 22, p. 1403–1409, 2012.
- HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52 p. (Documentos, 264).
- HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 1, p. 1-51, July 2011.
- KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonsina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 516-521, jul./set. 2006.
- KIMATI, H. Fungicidas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: volume 1. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1978. Cap. 18, p. 325-373.
- KLICH, M. A. **Identification of common *aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002.
- KRIMITZAS, A. et al. Phylogenetic analysis of greek isolates of *aspergillus* species based on morphology and nuclear and mitochondrial gene sequences. **BioMed Research International**, Oxford, v. 2013, p. 1-18, 2013.
- LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Editora do Autor, 1997. 140 p.
- MACHADO, J. C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP, 2012. 590 p.
- 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**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 670-672, jul./set. 2001.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da mamoneira (*Ricinus communis* L.). In: KIMATI, M. et al. **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 445-447.

MCNEILL, J.; BARRIE, F. F.; BUCK, W. R. et al. (Ed.). **International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)**. Austrália: Koeltz Scientific Books, Königstein, 2012. 140 p.

MCNEILL, J.; TURLAND, N. J. Major changes to the code of Nomenclature-Melbourne. **Taxon**, USA, v. 60, n. 18, p. 1495–1497, July 2011.

MICHELI, P. A. **Nova platarum genera**. Florence: Gyan Books, 1729. 234 p.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, USA, v. 31, n. 1, p. 1-16, Jan. 1995.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Brasil projeções do agronegócio 2014/2015 a 2015/2016**. Brasília: MAPA, 2016. 133 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Editora da UFLA, 2008. 768 p.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556- 565, June 1997.

OCHOR, T. E.; TREVATHAN, L. E.; KING, S. B. Relationship of harvest date and host genotype to infection of maize kernels by *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, p. 311-313, Sept. 1987.

PALENCIA, E. R.; HINTON, D. M.; BACON, C. W. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 3, p. 399–416, Mar. 2010.

PARRELLA, N. N. L. D. et al. **Qualidade fitossanitária de sementes**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2012. 6 p. (Circular Técnica, 156).

PEREIRA, C. E. et al. Peso específico do milho e sua relação com ergosterol, micotoxinas e energia. **Revista Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 186-188, ago. 2008. Suplemento.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 538-555.

PERRONE, G. et al. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Apply Environmental Microbiology**, USA v. 72, n. 1, p. 680-685, Jan. 2006.

PETERSON, S. W. Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Eupenicillium* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 23, n. 3, p. 134-138, Sept. 2006.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, New York, v. 100, n. 2, p. 205-226, Feb. 2008.

PETERSON, S. W. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. **Mycologia**, New York, v. 100, n. 2, p. 205-226, Apr./Mar. 2008.

PINTO, N. F. J. A. Tratamento de sementes de milho. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4., 1996, Gramado. **Anais...** Gramado: Fundacao Cargill, 1996. p. 52-57.

PINTO, N. F. J. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 6 p. (Circular Técnica, 66).

PINTO, N. F. J. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1998. 44 p. (Circular Técnica, 29).

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research, 2000. 184 p.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965. 686 p.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Lages: Graphel, 2004. 44 p.

RIVERA, K. G, SEIFERT, K. A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 70, p. 139-158, Nov. 2011.

SAMSON, R. A. et al. Identification of the common food and airborne fungi, *Aspergillus*. In: SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food and airborne fungi**. Utrecht: Centraalbureau Voor Schimmekultures, 2000. p. 64-97.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 70, p. 159–183, Nov. 2011.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, p. 141–173, June 2014.

SAMSON, R. A. et al. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 71–73, 2007.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 13-20, Feb. 2009. Suplemento.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America**, USA, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, Feb. 2012.

STEFANELLO, J. et al. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 476-481, out./dez. 2012.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiol Letter**, Oxford, v. 175, n. 2, p. 149-63, June 1999.

TAYLOR, J. W. et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Genetics and Biology**, USA, v. 31, n. 1, p. 21–32, Sept. 2000.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, p. 343–371, 2014.

**CAPÍTULO 2 DIVERSITY OF *Penicillium* AND RELATED SPECIES IN  
MAIZE GRAIN AND SEED IN BRAZIL**



## RESUMO

No Brasil, o milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais importantes, sendo um componente importante de ambas as dietas humana e animal. Durante o cultivo e armazenamento as sementes e grãos podem ser afetados por uma diversidade de fungos que podem causar perdas qualitativas e quantitativas. A incidência destes fungos em sementes e grãos de milho tem, ainda, um problema adicional devido à produção de micotoxinas. Membros do gênero *Penicillium* estão entre os principais organismos deterioradores de sementes e grãos, sendo algumas espécies patogênicas ao homem e animais. A diversidade de *Penicillium* e espécies relacionadas ocorrem comumente em sementes e grãos de milho. Nos últimos anos, houve um aumento significativo da incidência *Penicillium* nos campos de milho, principalmente nas sementes e grãos em amostras recebidas para análise. No entanto, ainda não há uma exata compreensão do por que a contaminação ocorre durante determinados anos, mas não em outros, e quais espécies de *Penicillium* são mais comuns em sementes e grãos de milho. O objetivo deste estudo foi à identificação de espécies de *Penicillium* em milho, produzido em algumas regiões do Brasil, utilizando-se da técnica de molecular baseada em análise multigênica de ITS, beta-tubulina e RPB2. As análises filogenéticas demonstraram claramente a diversidade de *Penicillium* e espécies relacionadas. Os resultados demonstraram a predominância das espécies *Talaromyces*, 83 isolados do total de 107 isolados coletados das sementes e grãos de milho, entre as espécies encontradas estão *Talaromyces stollii*, *T. amestolkiae*, *T. funiculosus* e espécies com potencial de controle biológico, como *Talaromyces wortimannii*. Vinte e quatro diferentes espécies de *Penicillium*, tais como *Penicillium citrinum*, *P. brevicompatum*, *P. crustosum*, *P. polonicum* também foram identificados neste estudo, bem como, cinco, possíveis, espécies novas.

**Palavras-chave:** Taxonomia. Filogenia multigênica. Variabilidade.

## ABSTRACT

In Brazil maize (*Zea mays* L.) is the most important cereal, being an important component of both human and animal diets. During the cultivation and storage the grains and seeds can be affected for diversity of fungi that can cause quantitative and qualitative losses. The incidence of these fungi in maize grain and seed still is an additional problem due to the production of mycotoxins. Members of the genus *Penicillium* are among the main organisms deteriorating of grain and seed and some species are pathogenic to humans and animals. The diversity of *Penicillium* and related species occurs commonly in maize grain and seed. In the last years, there was an increased of the *Penicillium* incidence in the maize fields, mainly in the seeds and grains and in the sample received to analyze. However, there is still not understanding of why contamination occurs and increased during certain years, but not in others and what *Penicillium* species are more common in maize seeds and grains. The aim of this study was the identify *Penicillium* species in maize, produced in different regions in Brazil, using molecular tools based on multigene phylogeny of the ITS,  $\beta$ -tubulin and RPB2 genes. Phylogenetic analyses showed clearly the diversity of *Penicillium* and related species. The results showed that *Talaromyces* species was predominant, 83 isolates of the 107, among the species found are *Talaromyces stollii*, *T. amestolkiae*, *T. funiculosus* and species with potential to biological control agents, such as *Talaromyces wortimannii*. Twenty four species of *Penicillium*, such as *Penicillium citrinum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. polonicum* were also identified in this study, as well as, two potential new species of *Penicillium*.

**Keywords:** Taxonomy. Multigene phylogeny. Variability.



## 1 INTRODUCTION

In Brazil maize (*Zea mays* L.) is the most important cereal, being an important component of both human and animal diets (MAPA, 2016). During the cultivation and storage the grains and seeds can be affected for diversity of fungi that can cause quantitative and qualitative losses. Fungus incidence depends on a number of abiotic and biotic factors, they affect the quality, increase the fatty acid, reduce the seed germination resulting in the production depreciation (Buiate et al., 2007; Bullerman & Bianchini, 2011).

The main fungi reported in maize grain and seeds produced in Brazil are *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cephalosporium* and *Stenocarpella* (Pinto, 2005). The incidence of these fungi in grain and seed maize yet is an additional problem due to the production of mycotoxins. In Brazil, toxigenic fungi incidence in maize indicates the predominance of the genus *Fusarium*, followed by *Aspergillus* and *Penicillium* (Kawashima, L.M and Soares, L.M.V., 2006; Sweeney and Dobson 1999; Binder et al., 2007).

Members of the genus *Penicillium* are among the main organisms deteriorating grain and seed and some species are pathogenic to humans and animals (Houbraken & Sanson; 2011). They are highly harmful to the seeds and grains when these products are harvested and stored in inadequate conditions. *Penicillium* sp. is the causative agent of blue or green mold in citrus fruits and can cause rot common in post-harvest conditions (Kimati et al., 1978).

The genus *Penicillium* was described in 1809 in Germany. Since first of January 2013 the single name nomenclature for fungi was enforced in the International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (ICN) (McNeill & Turland 2011, McNeill et al., 2012). The new nomenclature resulted in changes in the taxonomy of *Penicillium*, Houbraken & Sanson, (2011) based on four gene phylogeny, segregate the Trichomoceae into three families: *Aspergillaceae*, *Thermoascaceae* and the *Trichomaceae*. *Penicillium* species

belong to family *Aspergillaceae*.

Species belongs to the subgenus *Biverticillium* were transferred into *Talaromyces*, now this means that *Talaromyces* sp contains sexually (ascomata) and/or asexually (conidiophores) species (Samson et.al, 2011; Yilmaz et al, 2014). Younger teleomorph *Eupenicillium* species were transferred into subgenus *Penicillium* and the infrageneric classification was divided in two subgenus *Aspergilloides* and *Penicillium*, and 25 sections.

The genus *Talaromyces* was introduced by Benjamin (1955) as a sexual state of *Penicillium* that produces soft walled ascomata covered with interwoven hyphae. *Talaromyces* species have been reported to be medically important, for example *Talaromyces stolli* and *Talaromyces amestolkiae* were isolated from the lungs a sputum of immunocompromised patients (Yilmaz et al., 2012). They are also important in the food industry, like the species *T. macrosporus*, *T. flavus*, *T. wortmannii* which are heat resistant and cause spoilage of pasteurised juice and other fruit based products (Pitt & Hocking, 1997; Dijksterhuis, 2007).

*Talaromyces* contains also important species with potencial antagonism such as *T. flavus* used as bio-control agent of soil-borne pathogens such as *Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* (Marois et al., 1984; Punja, 2001; Brunner et al., 2005; Gohel et al. 2006). Potential antagonism is cited in some studies as in Noraghi et al (2010b and 2012) which are able to supress *Verticillium* wilt of tomato, potato, coton and green house cucumber.

*Pencillium* and *Talaromyces* also contain species able to produce toxins in food products. *Penicillium* species produced toxins such as ochratoxin, citrinin, patulin, PR-toxin, botrydioploidin which are produced by *Penicillium verrucosum*, *P. citrinum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum* and *P. brevicompactum*, respectively. *Talaromyces* species be able to produce toxins such as rubratoxin produced by *T. purpurogenus*, cyclochlorotine, islanditoxin

produced by *T. islandicus* and rugulosin and skyrin produced by *T. islandicus*, *T. radicus*, *T. rugulosus* and *T. wortmannii*.

The new classification of *Penicillium* and *Talaromyces* species was based on a combination of various characters, such as growth rates in standard conditions, colony morphology, microscopical characters and phylogenetic relationship (Houbraken et al. 2011a,b, Visagie & Jacobs 2012, Visagie et al. 2012, Yilmaz et al. 2012, Manoch et al. 2013, Visagie et al. 2013, Peterson & Jurjevic 2013, Fujii et al. 2013, Frisvad et al. 2013, Dufosse et al. 2014, Kanse et al. 2014).

In the last years, there was an increased of the *Penicillium* incidence in the maize fields, mainly in the seeds and grains and in the sample received to analyze. Borém et al. (2006) demonstrated the occurrence of *Penicillium* newly harvested seeds, and increased rate of this fungus occurrence during storage, resulting in a severe deterioration of seeds.

However, there is still no firm understanding of why contamination occurs and increase during certain years, but not in others and what *Penicillium* species are more common in maize seeds and grains. A limited number of studies has investigated the identification of *Penicillium* at species level in maize grains/seeds. The identification of fungi at species level, with distinction between those producing toxins and those no producing toxins is a major focus all over the world, mainly in crops like maize, soybean, wheat and others which are the bases for food and feed production.

The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and to identify *Penicillium* and related species in maize seed and grains produced in some regions in Brazil, using molecular tools, based on a multigene phylogeny of the ITS,  $\beta$ -tubulin and RPB2.



## **2 MATERIAL E METHODS**

### **2.1 Isolates and collection procedures**

In this study 107 isolate were obtained from maize seeds and grains analysed at the Seed Pathology Laboratory of Federal University of Lavras (UFLA). The fungi recovering was made by transferring mycelium developed on the incubated seeds and grains to plated medium following methodology described in Machado (2000). Plates were kept in an incubation chamber under light (radiation in the range of 320-400 nm), with a photoperiod of 12 h at 20 °C ± 2 °C for seven days. Portions of mycelium and conidial masses characteristic of *Penicillium sp* were transferred to new Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA), using histological sterile needle. These plates were placed in a growth chamber at 25°C and a photoperiod of 12 h for seven days.

Monosporic cultures were made with mycelium portions of fungal isolation in PDA. Mycelium portions were transferred to a test tube with 5 ml of sterile distilled water, a small aliquot was transferred to water - agar and spread with a handle Drigalski. Twenty four hours after that the plates were observed in a stereoscopic microscope and the conidia that there is a germ tubes were transferred to PDA medium, followed by incubation at 25 °C and photoperiod of 12 h for seven days.

### **2.2 Preservation of the fungal isolates**

Fungal isolates were preserved by two procedures: Mycelium discs were transferred to Eppendorf tube and preserved at 4 °C and using cryopreservation method at -80 °C. Microtubes containing isolates were deposited in the Fungi collection of Seed Pathology Laboratory of UFLA.



### 2.3 DNA Extraction

Genomic DNA extraction was made from 7 days old colonies grown on PDA. The biomass was put in Eppendorf tube and the DNA extraction was proceeded using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) according to the DNA extraction protocol recommended by the manufacturer.

### 2.4 PCR amplification and sequencing

PCR reaction was conducted in the Plant Research International Laboratory, Holland, following description by Houbraken & Samson (2011) with some modification. For that reaction the standard thermal cycle was used, which ran 35 cycles and had a 55 °C annealing temperature. The gene regions coding for Internal Transcribed Spacers of rDNA (ITS) were amplified using the primers V9G (Hoog & Gerrits van den Ende 1998) and LS266 (Masclaux et al. 1995).  $\beta$ -tubulin was amplified using the primer pair Bt2a and Bt2b (Glass & Donaldson 1995) and RNA polymerase II second largest subunit (RPB2) were amplified using primers RPB2P-F and RPB2-R development in this study (Table 1). Sequencing of PCR amplification was performed by MacroGen Europe bi-directional and consensus sequence were assembled using CLC Main Workbench 7.5.1 and the sequences were compared using NCBI and CBS database.

### 2.5 Phylogenetic analysis

Multigene phylogeny analyses were carried out using CLC Main Workbench 7.5.1 software and MEGA 6.0® program (Tamura et al., 2011). Additional sequences of *Penicillium* and *Talaromyces* reference isolates from different hosts were obtained from GenBank (Figure 1 and 2). The Bayesian inference method (BI) phylogeny was performed by on all sequences using the Monte Carlo chain method (MCMCMC). Mr Modeltest 2.3 (Posada & Buckley,

2004) was used to determine the evolutionary model of the nucleotides that best fit the data. The models used for tree *Penicillium* were GRT + I +G for ITS, SYM + I + G for BenA and GRT + G for RPB2. The models used for tree *Talaromyces* were GRT + G for ITS, SYM + G for BenA and RPB2.

Phylogenetic analysis was performed at the CIPRES web portal (Miller et al., 2010) using MrBayes version v. 3.2. (Ronquist et al., 2011). Markov chains were run simultaneously from random trees to 10,000,000 generations. Trees were sampled every 1,000th generation for a total of 10,000 trees. The first 2,500 trees were discarded as burn-in in each analysis, and the remaining 7,500 trees were used to calculate the posterior probabilities of the branches that were determined based on the consensus of most sampled trees. Trees were visualized using Figtree (Rambaut, 2009) and exported to a graphics program

The probability values above 0.70 were showed at the nodes of the phylogenetic trees. As outgroup of filograma related to genus of *Penicillium* and *Talaromyces* was chosen *Talaromyces flavus* and *Penicillium citrinum* species, respectively.

Table 1 - Primers used in this study

<b>Locus</b>	<b>Primer</b>	<b>Reference</b>
β-Tubulin (BenA)	Bt <sub>2</sub> a	Glass & Donaldson 1995
	Bt <sub>2</sub> b	
Internal Transcribed Spaces (ITS)	V9G	Whit et al. 1990
	LS266	
RNA polymerase II second largest subunit (RPB2)	RPB2P-F	This study
	RPB2P-R	



### 3 RESULTS

Phylogenetic study based on multigene of BenA and ITS was conducted to identify *Penicillium* and related species in maize. These genes were used to identify 107 generated sequences. RPB2 (Unpublished data) gene was used to delimit phylogenetic species that in ITS and BenA was not sufficiently variable for making a species identification. Alignment data had a total length 1869 bp, the length of BenA, ITS and RPB2 barcodes were 461, 550, 858 base pairs long, respectively.

#### 3.1 *Penicillium* species collected from maize

The results showed that 24 isolates collected from maize seeds and grains, belong to the *Penicillium* genus (Table 2).

Phylogenetic analysis showed that the species collected on maize seed and grain belong to subgenus *Aspergiloides* and *Penicillium*. In those two subgenus there are 25 sections, eight sections were found in this study. In the phylogenetic trees based on combined sequence data on ITS and BenA region was made for isolate identification in their respective sections. Phylogenetic analysis was supported by probability values above 0.70 in most nodes (Figure 1).

Nine isolates form a clade with subgenus *Aspergiloides*, being, six isolates from *Citrina* section, two isolated from *Exilicaulis* section and one from *Lanata-Divaricata* section (Figure 1, Supplementary Material Figure 5). In the *Citrina* section four isolates were identified as *Penicillium citrinum* and two isolates *P. sizovae* species. In the *Exilicaulis* section it was found two isolates closely related with *P. corylophilum* species and in the *Lanata-Divaricata* section one isolated was identified as *Penicillium wotroi*.

Fourteen isolates identified in this study belong to the *Penicillium* subgenus, five isolates form a clade with *Brevicompacta* and *Ramosa* section

and nine form a clade with *Penicillium* and *Faciculata* section (Figure 1, Supplementary material Figure 5). In the *Brevicompacta* and *Ramosa* section three isolates belong to *P. brevicompactum* species and two isolates formed a distinct clade the other species of *Penicillium* with high support (Bayesian probability = 1) and formed a sister group with *P. smile*. In the *Penicillium* and *Faciculata* section seven isolates were identified as *P. crustosum* and two isolates closely related with *P. polonicum*. The isolate BR LAPS 272 not was resolved in any section and appeared to represent novel phylogenetic species (Figure 1).

Table 2 - Details of *Penicillium* isolates collected in maize seeds and grains produced in some region in Brazil

Species	Access number	Locality	State
<i>Penicillium citrinum</i>	BR LAPS 653	Campo Mourão	PR
<i>Penicillium citrinum</i>	BR LAPS 654	Campo do Meio	MG
<i>Penicillium citrinum</i>	BR LAPS 655	Perdizes	MG
<i>Penicillium citrinum</i>	BR LAPS 656	Londrina	PR
<i>Penicillium sizovae</i>	BR LAPS 657	Campo do Meio	MG
<i>Penicillium sizovae</i>	BR LAPS 658	Campo do Meio	MG
<i>Penicillium brevicompactum</i>	BR LAPS 659	Campos Júlio	MT
<i>Penicillium brevicompactum</i>	BR LAPS 660	Brasnorte	MT
<i>Penicillium brevicompactum</i>	BR LAPS 661	Brasnorte	MT
<i>Penicillium crustosum</i>	BR LAPS 662	Campo Mourão	PR
<i>Penicillium crustosum</i>	BR LAPS 663	Lavras	MG
<i>Penicillium crustosum</i>	BR LAPS 664	Campos Júlio	MT
<i>Penicillium crustosum</i>	BR LAPS 665	Campos Júlio	MT
<i>Penicillium crustosum</i>	BR LAPS 666	Campos Júlio	MT
<i>Penicillium crustosum</i>	BR LAPS 667	Lavras	MG
<i>Penicillium crustosum</i>	BR LAPS 668	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Penicillium polonicum</i>	BR LAPS 669	Campo Verde	MT
<i>Penicillium polonicum</i>	BR LAPS 670	Mato Grosso	MT
<i>Penicillium nov. sp</i>	BR LAPS 672	Campo Verde	MT
<i>Penicillium wotroi</i>	BR LAPS 673	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Penicillium corylophilum</i>	BR LAPS 673	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Penicillium corylophilum</i>	BR LAPS 674	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Penicillium nov. sp</i>	BR LAPS 675	Mato Grosso	MT
<i>Penicillium nov.sp</i>	BR LAPS 676	Mato Grosso	MT



In the phylogenetic trees based on combined sequence data on ITS and BenA region was made for isolate identification in their respective sections. Phylogenetic analysis was supported by probability values above 0.70 in most nodes (Figure 2).

In the *Islandici* section 23 isolates were identified as *T. wortmannii* species, one isolate was identified as *T. funcilosus*, nine isolates form a clade closely related with *T. amestolkiae*, and 50 isolates were identified as *T. stollii*. In this study, the phylogeny showed an infraspecie variation in the *T. wortmannii* clade (Figure 2, Supplementary material Figure 8).



Table 3 - Details of *Talaromyces* isolates collected in maize seeds and grains produced in some region in Brazil.

<i>Species</i>	Access number	Locality	Estate
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 570	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 571	Lavras	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 572	Conquista	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 573	Rio Verde	GO
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 574	Clavinhos	SP
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 575	Jardinópolis	SP
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 576	Campos Júlio	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 577	Campos Júlio	MT
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 578	Rio Verde	GO
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 579	Campos Júlio	MT
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 580	Campos Júlio	MT
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 581	Campo do Meio	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 582	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 583	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 584	Jardinópolis	SP
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 585	Perdões	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 586	Campo do Meio	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 587	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 588	Rio Verde	GO
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 589	Campos Júlio	MT
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 590	Rio Verde	GO
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 591	Perdões	MG
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 592	Londrina	PR
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 593	Santa Camen	MT
<i>Talaromyces stollii</i>	BR LAPS 594	Rondonópolis	MT

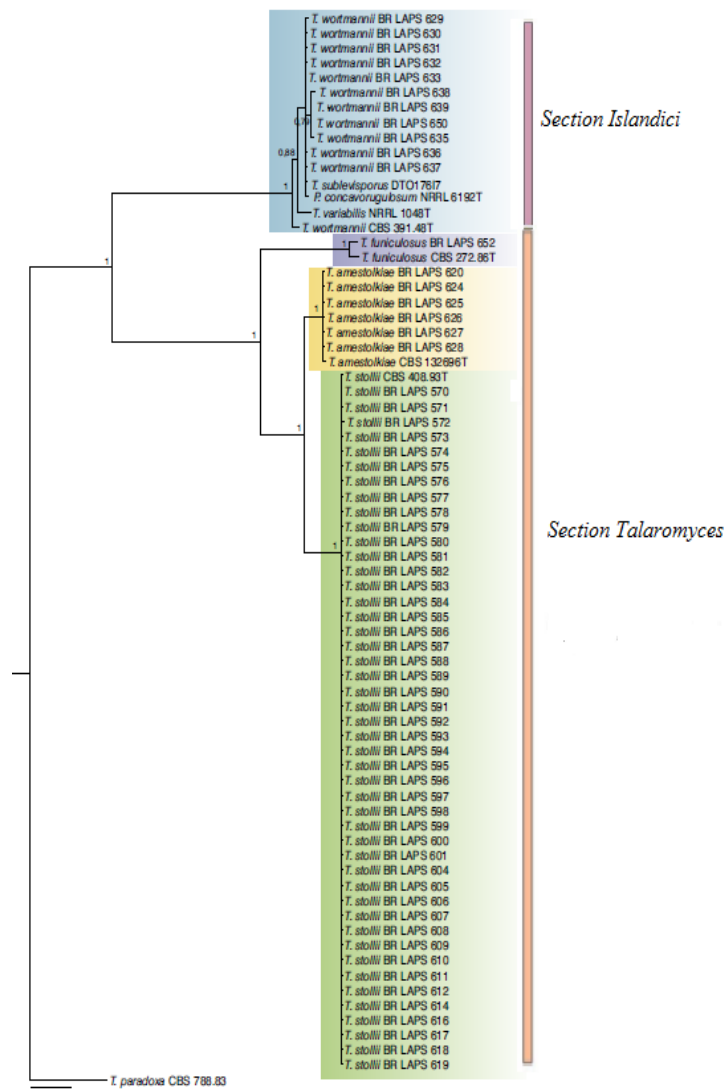
**Table 3 conituation:** Details of *Talaromyces* isolates collected in maize seeds and grains produced in some region in Brazil.

Species	Access number	Locality	Estate
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 595	Rondonópolis	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 596	Londrina	PR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 597	Londrina	PR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 598	Londrina	PR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 599	Londrina	PR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 600	Belém	PA
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 601	Sapezal	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 602	Perdizes	MG
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 603	Rondonópolis	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 604	Rondonópolis	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 605	Roraima	RR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 606	Roraima	RR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 607	Roraima	RR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 608	Roraima	RR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 609	Belém	PA
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 610	Roraima	RR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 611	Roraima	RR
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 612	Belém	PA
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 613	Mato Grosso	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 614	Mato Grosso	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 615	Rondonópolis	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 616	Rondonópolis	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 617	Mato Grosso	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 618	Rondonópolis	MT
<i>Talaromyces stolli</i>	BR LAPS 619	Mato Grosso	MT

**Table 3 continuation:** Details of *Talaromyces* isolates collected in maize seeds and grains produced in some region in Brazil.

<b>Species</b>	<b>Access number</b>	<b>Locality</b>	<b>Estate</b>
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 629	Campo do Meio	MG
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 630	Londrina	PR
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 631	Lavras	MG
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 632	Sapezal	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 633	Rio Verde	GO
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 634	Rio Verde	GO
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 635	Sapezal	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 636	Mato Grosso	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 637	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 638	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 639	Campo Verde	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 640	Campo Verde	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 641	Campo Verde	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 642	Campo Verde	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 643	Campos Júlio	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 644	Campo do Meio	MG
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 645	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 646	Mato Grosso	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 647	Campo do Meio	MG
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 648	Belém	PA
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 649	Roraima	RR
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 650	Santa Camen	MT
<i>Talaromyces wortmannii</i>	BR LAPS 651	Belém	PA
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 620	Santa Camen	MT
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 621	Londrina	PR
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 622	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 623	Belém	PA
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 624	Rondonópolis	MT
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 625	Londrina	PR
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 626	Mato Grosso	MT
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 627	Londrina	PR
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	BR LAPS 628	Embrapa Sete Lagoas	MG
<i>Talaromyces funiculosus</i>	BR LAPS 652	Belém	PA

Figure 2 - Bayesian phylogenetic tree of the concatenated dataset of the ITS and  $\beta$ -tubulin regions showing the phylogenetic relationship of the *Talaromyces* isolates collected of maize seeds and grains. Posterior probability values  $>0.7$  are indicated above the nodes. The coloured blocks indicate the different species found in the study. Sequences from type strains are indicated (T). The tree is rooted with *Trichoma paradoxa* CBS 788.83.





#### 4 DISCUSSION

Maize grain and seeds are colonised by a diversity of spoilage fungi pre- and post-harvest, the dominant species depend on a number of abiotic and biotic factors. In this study it was showed the highdiversity of *Penicillium* and *Talaromyces* species associated to maize grains and seeds collected in different regions in Brazil.

*Penicillium* and *Talaromyces* species are considered among commonest genera, which are often associated to specific food stuff (Frisvad & Samson 2004, Pitt & Hocking 2009, Samson et al. 2010).

This research reported important *Penicillium* which are producers of toxin, such as *P. brevicompactum* and *P. citrinum* be able to produce *Botryodiplodin* and *Citrinin*, respectively. *Talaromyces* sp, including *T. wortimannii* are important enzyme producer, such as urethanase (Zhou et al., 2013) and bioactive natural compounds. Six compounds, reported by Bara et al (2013), isolated from *T. wortimannii* showed antibacterial activity, several others compounds were isolated, such as compound-C which is effective antimicrobial with anti-inflammatory properties (Pretsch et al., 2014).

Many species of *Penicillium* are associated with biodeterioration of specific foods stuff, example include *P. digitatum* and *P. italicum* cause rots of citrus, *P. brevicompactum* produces mycophenolic acid, *P. citrinum* and *P. oxalicum* are *penicillin* producers (Frisvad & Samson, 2004; Houbraken et al., 2012). *Talaromyces* sp which includes *T. funiculosu*, *T. rugulosus*, *T. wortimannii* are able to produce rugulosin and skyrin (Brian et al., 1957; Samson et al., 2010).

Previous studies developed in the same line of this research have also reported the high diversity that can occur in different processes and product of maize produced in Brazil, depending on several factors like places, analyses methods, environment (Marín et al., 1998a; Farias et al., 2000; Tanaka et al.,

2001; Ribeiro et al., 2003; Pinto et al., 2007; Campos et al., 2008; Antonello et al., 2009; Rosa et al., 2009; Ramos et al., 2010; Henning et al., 2011., Keller et al., 2013).

The majority of those authors mentioned *Penicillium* species as a common contaminant, but they did not indicate the identification of the fungi at species level (Ono et al., 2008; Antonello et al., 2009). In most of those studies only morphological tools were used.

The newly described species *T. stollii* and *T. amestolkiae* (Yilmaz et al. 2012), found in this research, are potentially pathogenic to immunocompromised person. However, that condition is not clear so far, requiring additional investigation. Yilmaz et al (2012), reported that *T. stollii* and *T. amestolkiae* are quite common on textiles, paper, soil, dung, plant debris, coffee-berries, corn (such as in this study), being also detected worldwide air and dust of open and indoor environment.

In this research *T. wortmannii* showed clear the variability within the clade. This variation had been reported also by Yilmaz et al (2014) in their study they used ITS, BenA, calmodulin (CaM) and RPB2 and reported different topologies and variability of *T. wortmannii* species.

From these results it turns clear the diversity of *Penicillium* sp. in maize seeds and grains and the importance of phylogenetic analysis for species recognition in the fungus genus and for placing isolates into a species.

## 5 CONCLUSIONS

This investigation shows clearly that *Penicillium* and *Talaromyces* present a high diversity in contaminated maize grains and seeds produced in different regions in Brazil including two news species of *Penicillium*. Some isolates of those genera presented antagonism properties against plant pathogens and then they should be further investigated for future benefits in plant diseases control.

The use of molecular techniques in the routine identification of the fungi considered in this investigation should be recommended.





## REFERÊNCIAS

- ANTONELLO, L. M.; MUNIZ, M. B.; BRAND, S. C.; VIDAL, M. D.; GARCIA, D.; RIBEIRO, L.; SANTOS, V. DOS. **Qualidade de sementes de milho armazenadas em diferentes embalagens**. *Ciência Rural*, v.39, n.7, out, 2009.
- BARA, R; ALY, A. H; WRAY, V. **Talaromins A and B, new cyclic peptides from the endophytic fungus *Talaromyces wortmannii***. *Tetrahedron Letters* 54: 1686–1689, 2013.
- BINDER, E. M.; TAN, L. M; CHIN, L. J; HANDL, J; RICHA, J. **Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients**. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137:265–282, 2007.
- BENJAMIN, C. R. **Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium***. *Mycologia* 47: 669–687, 1955.
- BORÉM, F.M.; RESENDE, O.; MACHADO, J.C.; FONTENELLE, I.M.R.; SOUZA, F.F. **Controle de fungos presentes no ar e em sementes de feijão durante armazenamento**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 651-659, 2006.
- BRIAN, P. W; CURTIS, P. J; HEMMING, H. G. **Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmanni***. *Transactions of the British Mycology Society* 40: 365–368, 1957.
- BUIATE, E. A. S. **Reaction of maize hybrid and survey of the major fungi associated to the pathogen complex causing ear rot in Minas Gerais**. *Horizonte Científico*, v. 01, n. 08, p. 1-14, 2008.
- BULLERMAN, L.B. A; BIANCHINI, M.A; HANNA, L.S; JACKSON, J; JABLONSKI, AND D RYU. 2008. **Reduction of fumonisin B1 in corn grits by single-screw extrusion**. *J. Agric. Food Chem.* 56(7):2400-2405, 2008.
- BRUNNER, K; ZEILINGER, S; CILIENTO, R. **Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance**. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3959–3965, 2005.
- CAMPOS, S. G.; CAVAGLIERI, L. R.; JURI, M. G. F.; DALCERO, A. M.; KRUGER, C.; KELLER, L. A. M. **Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil**. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* , 2008.

- HOOG, G. S. DE; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. **Molecular diagnostic of clinical strains of filamentous Basidiomycetes.** *Mycoses* 41: 183–189, 1998.
- DEVI S.S., SREENIVASULU Y., RAO K.V.B. ***Talaromyces verruculosus*, a novel marine fungi as a potent polyhydroxybutyrate degrader.** *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 7:433–438, 2014.
- DIJKSTERHUIS, J. **Heat resistant ascospores.** In: Food mycology. A multifaceted approach to fungi and food (Dijksterhuis J, Samson RA, eds). CRC Press, Boca Raton: 101–117, 2007.
- DUFOSSE, L; FOUILLAUD, M; CARO, Y; MAPARI, A. S; SUTTHIWONG, N. **Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry.** *Curr. Opin Biotechnol.* 26:56-61, 2014.
- FARIAS, A. X De.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; PAUL MARIUS ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S.; **CONTAMINAÇÃO ENDÓGENA POR *ASPERGILLUS* SPP.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.35, n.3, p.617-621, mar. 2000.
- FRISVAD, J. C; SAMSON, R. A. **Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins.** *Studies in Mycology* 49: 1–173, 2004.
- FRISVAD, J. C.; HOUBRAKEN, J.; POPMA, S. **Two new *Penicillium* species *P. buchwaldii* and *P. spathulatum*, producing the anticancer compound asperphenamate.** *FEMS Microbiology Letters* 339: 77–92, 2013.
- FUJII T.; HOSHINO, T.; INOUE, H. **Taxonomic revision of the cellulose degrading fungus *Acremonium cellulolyticus nomen nudum* to *Talaromyces* based on phylogenetic analysis.** *FEMS Microbiology Letters* 351: 32–41, 2013.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. **Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes.** *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330, 1995.
- GOHEL, V.; SINGH, A.; VIMAL, M. **Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms.** *African Journal of Biotechnology* 5: 54–72, 2006.

HENNING, F. A.; JUNIOR, E. A. J.; MERTZ, L. M.; PESKE, S. T. **Qualidade sanitária de sementes de milho em diferentes estádios de maturação.** *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 33, nº 2 p. 316 - 321, 2011.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. **Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families.** *Studies in Mycology* 70: 1–51, 2011.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.; SAMSON, R. A. **Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*.** *IMA Fungus* 2: 87–95, 2011a.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. **Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*.** *Studies in Mycology* 70: 53–138, 2011b.

HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; FRISVAD, J. C. **Rasamsonia, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species.** *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 403–421, 2012.

KANSE O.S.; WHITELAW-WECKERT M.; KADAM T.A. **Phosphate solubilization by stress-tolerant soil fungus *Talaromyces funiculosus* SLS8 isolated from the Neem rhizosphere.** *Annals of Microbiology*. 2014.

KAWASHIMA, L.M.; VALENTE SOARES, L.M. **Incidência de fumonsina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho.** *Ciênc. Tecnol. Alimento* v.26, n.2, p.516-521, 2006.

KELLER, L. A. M.; PEREYRA, M. L. G.; KELLER, K. M.; ALONSO, V. A.; OLIVEIRA, A.C.A.; ALMEIDA, T. X.; BARBOSA, T. S.; NUNES, L. M. T.; CAVAGLIERI, L. R.; ROSA, C. A. R. **Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation.** *Journal of Stored Products Research*. p. 42 e 47, 2013.

KIMATI, H. Fungicidas. In: **Manual de Fitopatologia**. 2 ed. São Paulo: Ceres. Piracicaba, v.1, cap. 18, p. 325-373, 1978.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Editora UFLA, Lavras-MG, 2000. 134 p.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brasil projeções do agronegócio 2014/2015 a 2015/2016.** Brasília, abr. 2016

MCNEILL, J. & TURLAND, N. J. **Synopsis of Proposals on Botanical Nomenclature - Melbourne 2011: A review of the proposals concerning the**

**International Code of Botanical Nomenclature submitted to the XVIII International Botanical Congress.** Taxon 60(1): 243-286, 2011.

MCNEILL, J.; BARRIE, F. F.; BUCK, W. R. **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code).** Koeltz Scientific Books, Königstein. [Regnum vegetabile no. 154.], 2012.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; ANNA, L. M. M. S. **Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation.** Journal of Biotechnology 163: 38–44, 2013.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; ARNAU, F.; RAMOS, A. J.; MAGAN, N. **Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*.** International Journal of Food Microbiology, v.45, p.107-117, 1998b.

MAROIS, J. J.; FRAVEL, D. R.; PAPAVIDAS, G. C. **Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere.** Soil Biology and Biochemistry 16: 387–390, 1984.

MASCLAUX, F.; GUEHO, E.; HOOG, G. S. DE. **Phylogenetic relationships of human pathogenic *Cladosporium xylohypha* species inferred from partial LS rRNA sequences.** Journal of Medical and Veterinary Mycology 33: 327–338, 1995.

MANOCH, L.; RAMÍREZ.; C. ***Penicillium siamensis* sp. nov., from Thailand soil.** Mycopathologia 101: 31–35, 1988.

NARAGHI, L.; HEYDARI, A.; REZAEE, S. **Biological control of tomato *Verticillium* disease by *Talaromyces flavus*.** Journal of Plant Protection Research 50: 360–3652, 2010b.

NARAGHI L.; HEYDARI, A.; REZAEE, S. **Biocontrol agent *Talaromyces flavus* stimulates the growth of cotton and potato.** Journal of Plant Growth Regulation 31: 471–477, 2012.

NARIKAWA T.; SHINOYAMA, H.; FUJII T. **A  $\beta$ -rutosidase from *Penicillium rugulosum* IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 64: 1317–1319, 2000.

ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M. da; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. **Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium***

**sp. count, damaged kernels, protein and lipid content.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v.49, p.63-71, 2006.

PETERSON S.W.; JURJEVI C. Z. *Talaromyces columbinus* sp. nov., and genealogical concordance analysis in *Talaromyces* Clade 2a. PLoS ONE 8: e78084, 2013.

PINTO, N. F. J. de A. **Grãos ardidos em milho.** Circular Técnica 66, Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, 6p., dez. 2005.

PINTO, N.F.J.A.; VARGAS, E.A.; PREIS, R.A. **Sanitary quality and fumonisin B1 production in corn grains at pre-harvest.** *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.304-306, 2007.

PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fung and Food Spoilage** 2nd ed. London, U.K.; Blackie Academic & Professional, 1997.

PITT, J. I.; AND HOCKING. A. A. D. **Fungi and food spoilage**, 3rd edition. Springer, United States, 2009.

POL, D.; LAXMAN, R.S.; RAO, M. **Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum*** MS 20. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 49: 189–194, 2012.

PRETSCH, A.; NAGL, M.; SCHWENDINGER, K. **Antimicrobial and antiinflammatory activities of endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* extracts against acne-inducing bacteria.** PLoS ONE 9: e97929, 2014.

PUNJA Z. K. **Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects.** Canadian Journal of Plant Pathology 23: 216–235, 2001.

RAMOS, A.T.M; MORAES, M.H.D.; CARVALHO, R.V. & CAMARGO, L.E.A. Levantamento da micoflora presente em grãos ardidos e sementes de milho. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.3, p.257-259, 2010.

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R. R. **Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UVinduced mutants.** FEMS Microbiology Ecology 28: 291–295, 1999.

RIBEIRO, S. A. L.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. **Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco.** Revista Brasil. Bot., V.26, n.2, p.223-229, jun. 2003.

ROSA, C. A. R.; KELLER, K. M.; KELLER, L. A. M.; PEREYRA, M. L. G.; PEREYRA, C.M.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R.; LOPES, C. W. G.; **Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil.** *Toxicon* 53 (2009) 283–288.

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U. (2010). **Food and indoor fungi.** In: CBS laboratory manual series 2. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.

VISAGIE, C. M.; JACOBS, K. **Three new additions to the genus *Talaromyces* isolated from Atlantis sandveld fynbos soils.** *Persoonia* 28: 14–24, 2012.

VISAGIE, C. M.; LLIMONA, X.; VILA, J. **Phylogenetic relationships and the newly discovered sexual state of *Talaromyces flavovirens*, comb. nov.** *Mycotaxon* 122: 399–411, 2012.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; RODRIQUES, C. **Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family.** *Persoonia* 31: 42–62, 2013.

YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; HOEKSTRA.; ES. **Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species.** *Persoonia* 29: 39–54, 2012.

YILMAZ, N.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J. **Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*.** *Studies in Mycology* 78: 175–341, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6: 356molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** *Mol Biol Evol* 30:2725–2729, 2013.

TANAKA, M. A. DE S.; JOCELY ANDREUCCETTI MAEDA, J. A.;; PLAZAS, I. H. DE A. Z. **Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento.** *Scientia Agricola*, v.58, n.3, p.501-508, jul./set. 2001

POSADA D.; BUCKLEY T. R. **Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests.** *Systematic Biology* 53:793-808, 2004.

MILLER MA, PFEIFFER W, SCHWARTZ T **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees.** 1-8, in: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, LA. 2010.

RONQUIST, F., M. TESLENKO, P. VAN DER MARK, D. AYRES, A. DARLING, S. H<sup>o</sup>OHNA, B. LARGET, L. LIU, M. A. SUCHARD, AND J. P. HUELSENBECK MrBayes 3.2: **Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space**. *Systematic Biology* 61:539-542, 2011.

RAMBAUT A (2009) Fig Tree 1.2.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed on October 20, 2015.

SWEENEY, MJ; DOBSON, AD. **Molecular biology of mycotoxin biosynthesis**. [FEMS Microbiol Lett](#). Jun 15;175(2):149-63, 1999.

ZHOU ND, GU XL, TIAN YP. 2013. **Isolation and characterization of urethanase from *Penicillium variable* and its application to reduce ethyl carbamate contamination in Chinese rice wine**. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170: 718–728.



**APPENDICES - SUPPLEMENTARY MATERIAL: BAYESIAN  
PHYLOGENETIC TREE BASEAD ON ITS, BETA-TUBULIN AND RPB2**

Figure 3 - Bayesian phylogenetic tree of the concatenated dataset of the  $\beta$ -tubulin regions showing the phylogenetic relationship of the *Penicillium* isolates collected of maize seeds and grains. Posterior probability values  $>0.7$  are indicated above the nodes. Sequences from type strains are indicated (T). The tree is rooted with *Talaromyces flavus* NRRL 2098.

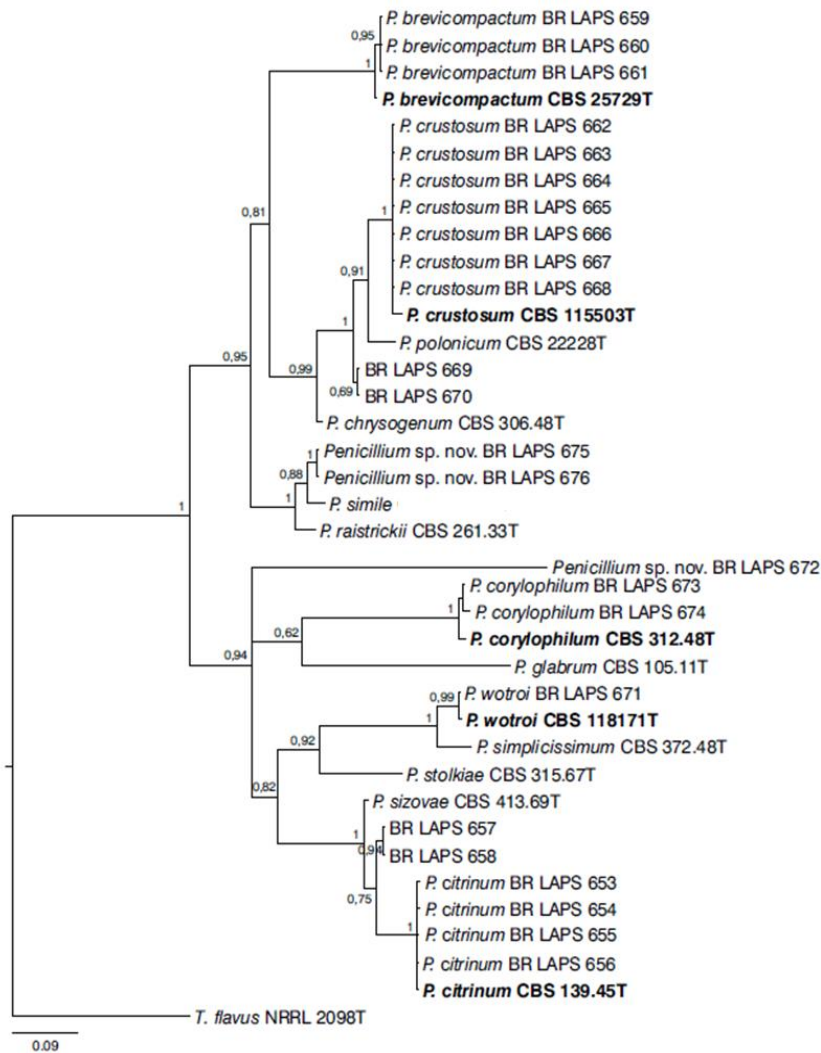


Figure 4 - Bayesian phylogenetic tree of the concatenated dataset of the ITS regions showing the phylogenetic relationship of the *Penicillium* isolates collected of maize seeds and grains. Posterior probability values >0.7 are indicated above the nodes. Sequences from type strains are indicated (T). The tree is rooted with *Talaromyces flavus* NRRL 2098.

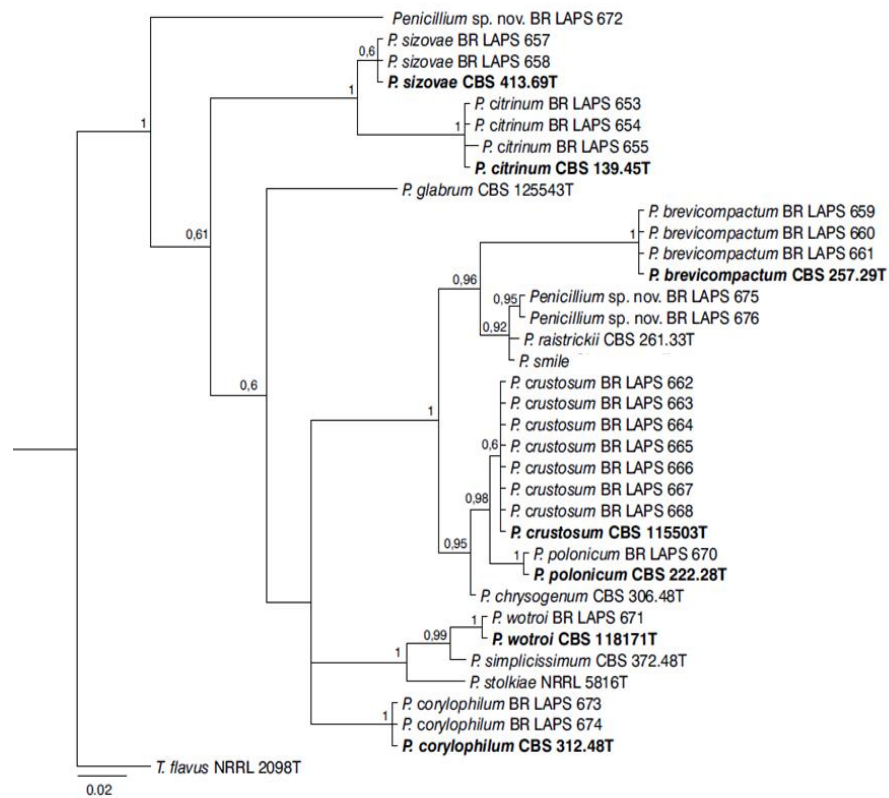


Figure 5 - Bayesian phylogenetic tree of the concatenated dataset of the RPB2 regions showing the phylogenetic relationship of the *Penicillium* isolates collected of maize seeds and grains. Posterior probability values  $>0.7$  are indicated above the nodes. Sequences from type strains are indicated (T). The tree is rooted with *Talaromyces flavus* NRRL 2098.

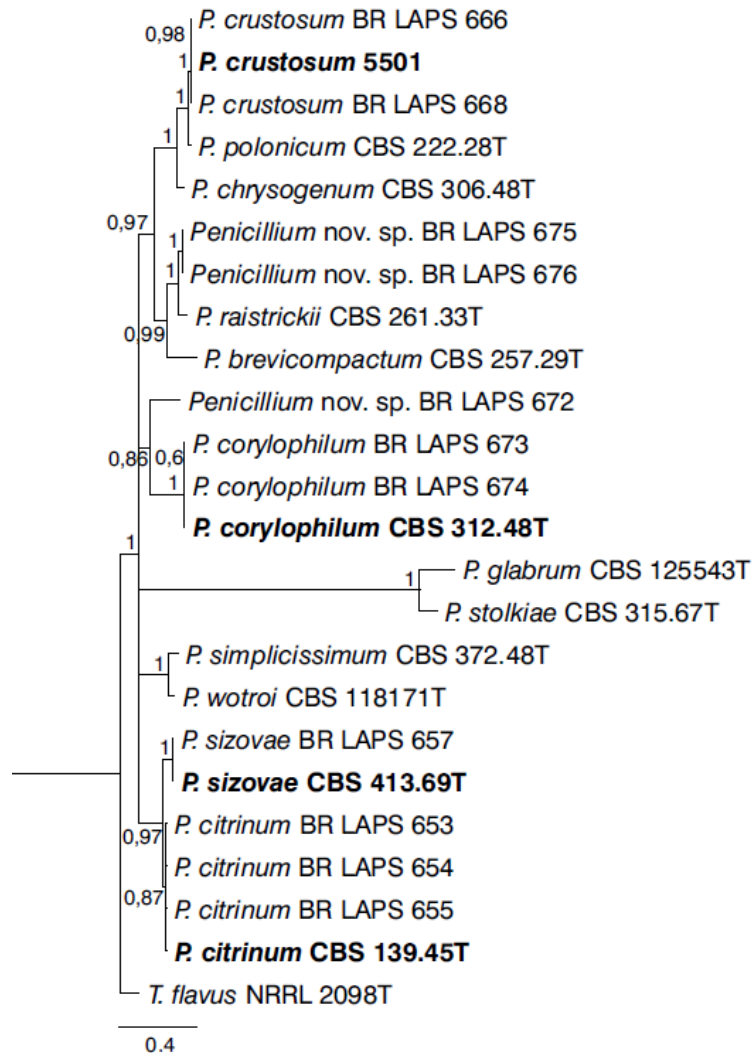


Figure 6 - Bayesian phylogenetic tree of the concatenated dataset of the  $\beta$ -tubulin regions showing the phylogenetic relationship of the *Talaromyces* isolates collected of maize seeds and grains. Posterior probability values  $>0.7$  are indicated above the nodes. Sequences from type strains are indicated (T). The tree is rooted with *Talaromyces paradoxa* CBS 788.83

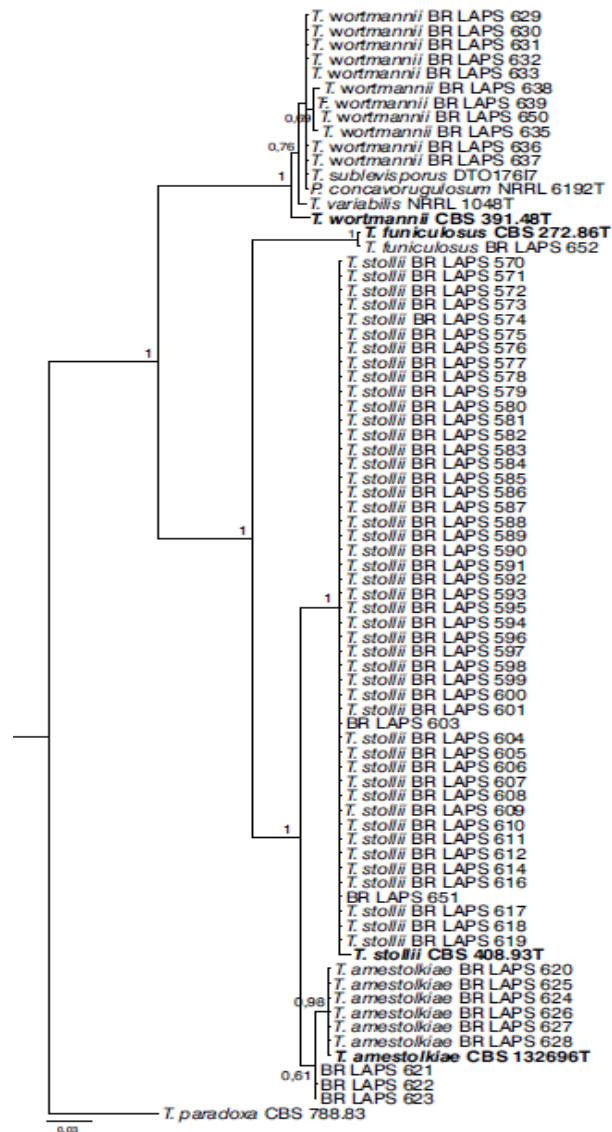


Figure 7 - Bayesian phylogenetic tree of the concatenated dataset of the ITS regions showing the phylogenetic relationship of the *Talaromyces* isolates collected of maize seeds and grains. Posterior probability values  $>0.7$  are indicated above the nodes. Sequences from type strains are indicated (T). The tree is rooted with *Talaromyces paradoxa* CBS 788.83.

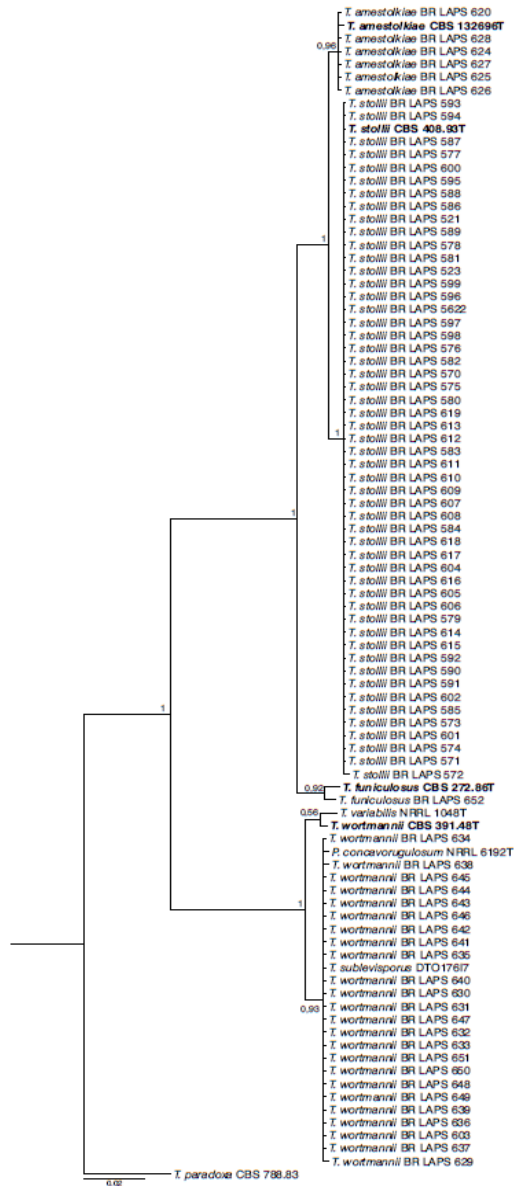


Figure 8 - Bayesian phylogenetic tree of the concatenated dataset of the RPB2 regions showing the phylogenetic relationship of the *Talamorymes* isolates collected of maize seeds and grains. Posterior probability values  $>0.7$  are indicated above the nodes. Sequences from type strains are indicated (T). The tree is rooted with *Talaromyces paradoxa* CBS 788.83.

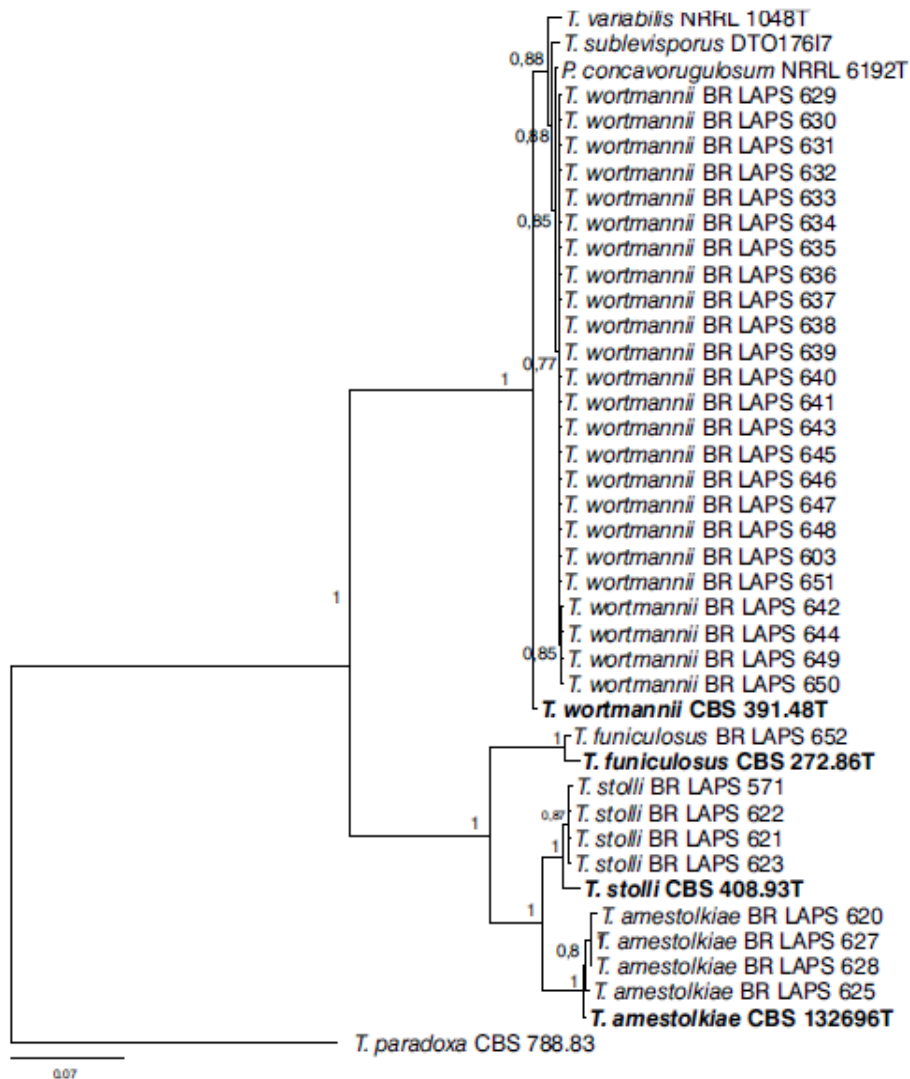


Table 4 - Isolates references based on  $\beta$ -tubulin, ITS and RPB2 genes used in the phylogenetic analyzes of *Penicillium* and *Talaromyces* species.

Species	Reference Isolate code	Access GenBank	Access GenBank	Access GenBank
		$\beta$ -tubulin	ITS	RPB2
<i>Penicillium simile</i>	MYA-4591	FJ376595	NR 121352	-
<i>Penicillium raistrickii</i>	CBS 261.33	KJ834485	JN617697	JN406592
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CBS 306.48	AY495981	NR 077145	JN121487
<i>Penicillium brevicompactum</i>	CBS 257.29	AY674437	KF465776	JN406594
<i>Penicillium crustosum</i>	CBS 115503	AY674353	-	-
<i>Penicillium crustosum</i>	DTO 244H8	-	KJ775628	-
<i>Penicillium crustosum</i>	5501	-	-	KJ527372
<i>Penicillium polonicum</i>	CBS 222.28	AY674305	NR 103687	JN406609
<i>Penicillium corylophilum</i>	CBS 312.48	JX141042	-	KP064631
<i>Penicillium corylophilum</i>	CBS 231.38	-	JN617696	-
<i>Penicillium glabrum</i>	CBS 105.11	GQ367501	-	-
<i>Penicillium glabrum</i>	CBS 125543	-	GU981567	JN121717
<i>Penicillium wotroi</i>	CBS 118171	GQ367501	NR 119813	KF296460
<i>Penicillium simplicissimum</i>	CBS 372.48	DQ486650	GU981588	JN121507
<i>Penicillium stolckiae</i>	NRRL 5816	-	NR 121233	-
<i>Penicillium stolckiae</i>	CBS 315.67	JN617717	-	JN121640
<i>Penicillium sizovae</i>	CBS 413.69	GU944535	NR 111487	JN606603
<i>Penicillium citrinum</i>	CBS 139.45	GU944545	-	JN606604
<i>Penicillium citrinum</i>	DTO 246-B9	-	KP329838	-
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CBS 132695	JX091383	-	
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CBS 132696	-	NR_120179	
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	CBS 132698	-	-	JX965298
<i>Talaromyces funiculosus</i>	CBS 272.86	JX091383	NR_103678	KM023293
<i>Talaromyces stollii</i>	CBS 408.93	JX315633	NR_111781	JX315712
<i>Talaromyces wortimani</i>	CBS 391.48	KF984648	JN899352	KF984977
<i>Talaromyces variabilis</i>	NRRL 1048	KF196853	KF196915	KF196975
<i>Talaromyces sublevisporus</i>	DTO 17617	KF984632	KF984800	KF984979
<i>Penicillium concavorugulosum</i>	NRRL 6192	KF196854	KF196916	KF196976

**CAPÍTULO 3 RELAÇÕES ENTRE *Penicillium nov sp.* E *Talaromyces wortimannii* COM SEMENTES DE MILHO CONTAMINADAS POR DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE INOCULAÇÃO**



## RESUMO

No cultivo do milho a qualidade das sementes é de extrema relevância, por intermédio das sementes, grande número de patógenos, considerados de risco, pode ser disseminado. Entretanto, no Brasil poucos trabalhos, referentes à transmissão sementes-plantas das espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* têm sido realizados. Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a relação das espécies de *T. wortimannii* e *Penicillium* nov. sp. e sementes de milho tendo como base a presença dos fungos em diferentes concentrações de inóculo, seguindo-se para isso duas metodologias já em uso para estudos de interação de patógenos com sementes. As sementes de milho foram contaminadas utilizando-se de dois procedimentos, um com uma mistura de massa seca dos fungos em estudo, e outro com a exposição das sementes aos isolados de *Talaromyces wortimannii* e *Penicillium* nov. sp, em diferentes períodos de tempo: 0 hora (Período 0 – P0), 24 horas (P24), 48 horas (P48), 72 horas (P72) e 96 horas (P96). Após cada contaminação as sementes de milho foram analisadas pelos testes de Blotter, germinação, índice de velocidade de emergência, altura, peso fresco e seco, estande inicial e final e quanto sua taxa de contaminação. A incidência das espécies de *Talaromyces* e *Penicillium* nas sementes de milho foi alta, em comparação com a testemunha. Com base nos resultados observou-se que a alta incidência dos isolados nas sementes não interferiu na porcentagem de germinação. Nas análises de IVE, estande inicial e final observou uma redução no período de exposição de 96 horas. A altura de plantas, oriundas de sementes expostas ao isolado de *Penicillium*, nos períodos de 72 e 96 horas foi menor, com valor médio de redução de aproximadamente 15 cm, quando comparados aos outros períodos. O peso fresco das plantas de milho foi influenciado pelos isolados utilizados em estudo. O peso fresco de plantas oriundas de sementes expostas ao isolado de *Talaromyces* reduziu com o aumento do período de exposição. Em relação ao peso fresco de plantas oriundas de sementes expostas ao isolado de *Penicillium* não houve diferenças entre os períodos exposição de 24, 48, 72 e 96 horas, entretanto, o peso destes foram menor que o peso de plantas da testemunha. Com base nos resultados da taxa de contaminação das isolados de *Talaromyces* e *Penicillium* nas partes das plantas de milho observou-se que o colmo apresentou maior incidência em ambos tratamentos. A taxa de contaminação do isolado de *Talaromyces* foi 43% no colmo, em comparação com a inserção que foi de 32%. Para o *Penicillium* a incidência no colmo foi de 22,5 enquanto que na inserção foi de 17,5.

**Palavras-chave:** Patologia de sementes. Qualidade de sementes. Fungos de armazenamento e teste de vigor.

## ABSTRACT

In maize seed the quality is extremely important, through the seeds, a large number of pathogens, considered at risk, may be disseminated. However, in Brazil few studies on the transmission of seed to plants of *Penicillium* and *Talaromyces* species have been conducted. The aim of this study was to evaluate the relation of *T. wortimannii* and *Penicillium* nov. sp. with maize seeds based on the presence of these fungi in different concentrations of inoculum, using two methods that are used for studies of pathogens interaction with seeds. Maize seeds were contaminated with a dry mass of *T. wortimannii* and *Penicillium* nov. sp. In another experiment maize seeds were put in exposition with mycelium of *T. wortimannii* and *Penicillium* nov. sp. in different periods of time: 0 hour (Period 0 - P0), 24 hours (P24), 48 hours (P48), 72 hours (P72) and 96 hours (P96). After each contamination maize seeds were analyzed by blotter test, germination, emergence speed index, height, fresh and dry matter weight, initial and final stand and the contamination rate. The incidence of the species *Talaromyces* and *Penicillium* in maize seed was high, compared to with control treatment. Based on the results it was observed that the high incidence of isolates in the seeds did not affect the germination percentage. In the analysis of IVE, initial and final stand there was a reduction in both test when the seeds were in exposition for 96 hours with the *Talaromyces* and *Penicillium* isolates. The height of plants from seeds that were in exposition with *Penicillium* isolated for 72 and 96 hours was reduced, with a average reduction of 15 cm, compared to other periods of time. The fresh matter weight of maize plants was influenced by the isolates used this study, the fresh matter weight of plants from seeds exposed with *Talaromyces* isolated reduced with increasing of period of time. The fresh matter weight of plants from seeds exposed with *Penicillium* isolate was not different between periods of 24, 48, 72 and 96 hours, however, the fresh matter weight of these times were less than the fresh matter weight of the control treatment of plants. Based on these results of contamination rate of the *Talaromyces* and *Penicillium* isolates in parts of the maize plants observed that the maize stalk was higher incidence, in both treatments. The contamination of *Talaromyces* isolate rate was 43% in the stalk, compared with the insertion, which was 32%. For the incidence *Penicillium* the stalk was 22,5% while in the insertion was 17,5%.

**Keywords:** Seed pathology. Seed quality. Storage fungi and vigor test.



## 1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* estão entre os mais comuns gêneros associados aos alimentos, sendo encontrados em diversos habitats. O gênero *Penicillium* é capaz de decompor qualquer tipo de material, causam podridões em diversos alimentos e são organismos de pós-colheita mais comuns, principalmente das commodities (Janisiewicz 1987, Pitt and Hocking 1997, Holmes and Eckert 1999, Morales et al 2007).

Dentre as commodities que este gênero causa problemas está a cultura do milho. As sementes de milho estão, geralmente, sujeitas a contaminação por fungos. Por intermédio das sementes, grande número de patógenos, considerados de risco, pode ser disseminado entre regiões agrícolas, dentro de um mesmo país e entre países, provocando danos de dimensões incalculáveis, além de, quase sempre, irreversíveis.

No cultivo do milho a qualidade das sementes é um fator de extrema relevância, não só por ser um veículo de informações genéticas responsáveis por características agronômicas, mas também por agregar valores pela incorporação física de outros insumos de grande importância para o aumento de produtividade.

No Brasil, o cultivo do Milho em uma grande diversidade de ecossistemas tem feito com que inúmeros fatores, como as doenças, tornem-se limitantes à sua produção. A grande maioria dos patógenos encontra na semente sua principal via de disseminação.

Informações sobre efeitos de fungos de armazenamento no desempenho de sementes revelam que estes organismos podem causar danos severos às sementes durante o período de armazenamento, com reflexos no campo por ocasião da germinação e desenvolvimento inicial das plantas. . Entretanto, no Brasil poucos trabalhos, referentes à transmissão sementes-plantas das espécies de *Penicillium* e *Talarmonyces* têm sido realizados, em geral o enfoque central

das investigações já realizadas, dirige-se aos problemas que este gênero causa em sementes armazenadas.

Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a relação das espécies de *T. wortimannii* e *Penicillium* nov. sp. nas sementes de milho tendo como base a presença dos fungos em diferentes concentrações de inóculo, seguindo-se para isso duas metodologias já em uso para estudos de interação de patógenos com sementes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento, a caracterização e a identificação dos isolados utilizados neste estudo foram realizados a partir de sementes de milho coletados em estudo anterior.

### 2.1 Avaliação dos efeitos das espécies de *Penicillium nov sp.* e *Talaromyces wortmannii* nas sementes de milho contaminadas por dois procedimentos de inoculação

Para avaliação dos efeitos as espécies em estudo foram contaminadas por diferentes procedimentos:

#### 2.1.1 Procedimento 1: Inoculação das sementes de por meio de mistura de massa seca do inóculo fungico com as sementes

A contaminação das sementes foi realizada pela técnica descrita por Machado (2005): os isolados foram crescidos, inicialmente, em meio BDA e mantidos por sete dias sob regime de 12 horas de luz negra, à temperatura de 25 °C. Após esse período, preparou-se uma suspensão de conídios acrescentando 10 mL de água esterilizada e 50 ppm de TWEEN 80 por placa. A suspensão de fungos foi vertida em uma cuba de vidro contendo meio BDA modificado (0,5% de ágar - 5g/L), esterilizado, a uma concentração de  $1,0 \times 10^6$  conídios / mL. Após a homogeneização desse meio, dois discos de papel de filtro de 15 cm de diâmetro, previamente esterilizados, foram mergulhados nessa calda agarizada e colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Essas placas foram mantidas em incubadoras a 25°C, por um período de aproximadamente 20 dias, até a desidratação completa do papel de filtro. A esse substrato, contendo as colônias dos fungos em estudo com elevada esporulação, foram adicionados 2 g de caolim (material inerte de granulometria fina), previamente esterilizado, por placa de 15 cm de diâmetro, obtendo-se assim uma mistura de pó com esporos dos fungos.

A incorporação do inóculo, composto de propágulos fúngicos, às sementes de milho, foi realizada tomando-se como base a relação de 200 g do produto/100 kg de sementes previamente desinfestados com hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos.

As sementes de milho inoculadas e não inoculadas foram distribuídos uniformemente em bandejas e colocados em temperatura de 25°C. Após 48 horas de secagem as sementes foram preparadas para as avaliações de germinação, severidade, Índice de velocidade de emergência, taxa de deterioração e efeitos nas plantas (Peso fresco e seco, altura, estande inicial e final).

### **2.1.2 Procedimento 2: Contaminação pelo método de condicionamento fisiológico das sementes na presença dos fungos**

Seguindo a metodologia descrita por Costa et al. (2003), o cultivo dos fungos foi realizado em meio BDA a 25 °C  $\pm$ 2 para a obtenção de colônias que posteriormente foram utilizadas para a produção de uma suspensão de conídios, cuja concentração foi ajustada em 10<sup>6</sup> conídios/mL. Desta suspensão, alíquotas de 1mL foram espalhadas sobre meio sólido BDA contendo manitol com um potencial hídrico de -1,6 Mpa, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. As placas foram mantidas em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas/dia. Após a incubação do fungo por cinco dias, 100 sementes foram colocadas em cada placa em camada única, com incubação a 25°C. As sementes permaneceram sobre a colônia fúngica por diferentes períodos de tempo: 0 hora (Período 0 – P0), 24 horas (P24), 48 horas (P48), 72 horas (P72) e 96 horas (P96). As sementes sem a presença dos fungos foram utilizadas como testemunha. Após cada período de contato, as sementes foram retiradas e secas por 48 horas em ambiente de laboratório até o teor de água de 12%, em seguida

em câmara de armazenamento (10 °C e 50% UR) até a utilização nos ensaios posteriores.

Para período de tempo, testemunha, 24, 48, 72 e 96 horas utilizou-se 4 repetições (4 placas de 15 cm) contendo 100 sementes de milho cada uma. Sendo um total de 40 placas, 20 para sementes expostas ao isolado de *T. wortimannii* e 20 para sementes expostas ao isolado *Penicillium nov. sp*

## **2.2 Avaliações dos ensaios**

Após a inoculação de *Talaromyces wortimannii* e *Penicillium nov sp.* pelas técnicas descritas, as sementes de milho foram analisadas pelos seguintes testes:

### **2.2.1 Teste de Germinação em Laboratório**

Este teste foi conduzido com base nas recomendações de Brasil (2009), com algumas modificações. Foram utilizadas oito repetições de 25 sementes sobre substrato de papel-toalha (tipo “germitest”) umedecido com água destilada, 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos de papel foram colocados em germinador regulado à temperatura de 25°C + 2°C, por sete dias. Após sete dias foi feito a contagem de plântulas normais, anormais e mortas.

### **2.2.2 Teste de emergência em substrato de solo**

As sementes de milho contaminadas e não-contaminadas foram avaliadas pelos seguintes procedimentos:

#### **2.2.2.1 Índice de velocidade de emergência (IVE)**

Quatro repetições de 50 sementes foram utilizadas para a realização deste teste. As sementes foram semeadas em bandejas, contendo substrato autoclavado composto por substrato:areia, na proporção de 2:1. Após o plantio as bandejas foram acondicionadas e mantidas em câmara de crescimento vegetal, em blocos aleatórios, à temperatura de 25°C ±2 e fotoperíodo de 12 h,



durante 28 dias. O índice de velocidade de emergência foi determinado pela contagem diária de plântulas que apresentaram-se acima do solo, até o alcance da estabilização do estande e posteriormente calculada pela fórmula proposta por Maguire (1962).

$$\text{IVE} = \sum Ni/Di, \text{ onde:}$$

**IVE** = índice de velocidade de emergência;

**Ni** = número de plantas germinadas na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente;

**Di** = número de dias após semeadura na 1ª contagem, 2ª contagem, ...enésima contagem, respectivamente;

#### **2.2.2.2 Contagem de estandes inicial e final**

Os estandes, inicial e final, foram registrados aos 3 dias e aos 28 dias após a semeadura, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem.

#### **2.2.2.3 Pesos fresco e seco**

Os valores do peso de matéria seca foram obtidos trinta dias após a semeadura, por meio da pesagem de todas as plantas emergidas por repetição. Para avaliar o peso de matéria seca as plantas foram cortadas acima do colo e submetidas ao processo de secagem em estufa com fluxo de ar forçado à temperatura de 50 °C. Após 96 horas, o material foi pesado em balança semi-analítica e os resultados apresentados em gramas.

#### **2.2.2.4 Determinação da taxa de contaminação das sementes inoculadas com os isolados de *T. wortmannii* e *Penicillium nov. sp.***

Para determinar a taxa de contaminação foram retirados dois fragmentos das plantas com aproximadamente dois centímetros da região do colmo e da

inserção de todas as plantas das parcelas. Em seguida os fragmentos foram seccionados e desinfestados com álcool 70% por 30 segundos, emergidos, posteriormente, em hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, enxaguados duas vezes em água destilada esterilizadas e colocados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA).

As placas foram mantidas em câmara de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Diariamente foram feitos exames de todos os fragmentos.

Os fragmentos seccionados das plantas e o somatório das sementes não germinadas constituíram a base para o cálculo de contaminação do fungo nas plantas.

A taxa de contaminação foi obtida considerando o número de fragmentos com o crescimento micelial em função do número de plantas avaliadas em cada parcela. O resultado foi expresso em porcentagem de plantas deterioradas. A taxa de contaminação foi determinada com base na incidência dos isolados nas sementes inoculadas, em cada tratamento. A taxa de contaminação foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$TC (\%) = [TI (\%)/IS (\%)] * 100$$

Em que:

TC = taxa contaminação; TI = taxa de incidência; IS = incidência do patógeno em sementes inoculadas.

### **2.3 Análises dos dados**

Para o ensaio das sementes contaminadas com massa seca fúngica as análises de variância dos experimentos foram realizadas utilizando-se 4 repetições de 100 sementes para cada isolado em estudo. No ensaio em que as sementes foram expostas em diferentes período de exposição a análise de

variância foi realizado utilizando-se para cada período de tempo 4 repetições (4 placas de 15cm) contendo 100 sementes cada. Para testemunha, nos dois procedimentos, utilizou sementes sem a presença dos isolados.

Para cada teste realizado nas sementes contaminadas e não contaminadas o número de repetições foi de acordo com descrito para cada na regra de análise de sementes (MAPA, 2009).

Os experimentos foram realizados em DIC (Delineamento inteiramente casualizado). Para análise estatística utilizou-se o programa Sisvar (R version 3.2.3, 2015-12-10), sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

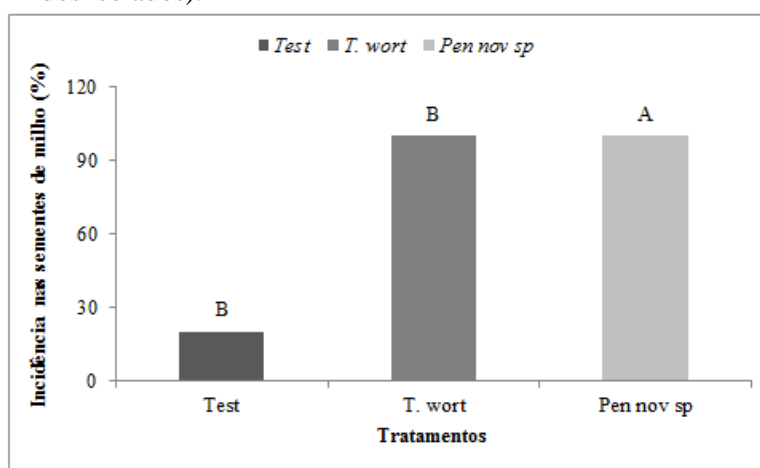
### 3 RESULTADOS

Pela análise sanitária inicial do perfil das sementes utilizadas neste estudo, baixas incidências foram detectadas dos fungos *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* sp, *Aspergillus flavus*. Estes níveis de ocorrência são considerados normais em lotes comerciais de milho comercializados no Brasil.

Na análise de incidência das sementes de milho contaminadas com *Talaromyces wortimannii* e das sementes contaminadas com *Penicillium* nov. sp. observou-se que houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) em ambos procedimentos de contaminação (contaminação por massa seca do isolado fúngico e pelo método de condicionamento fisiológico) (Figura 1, Figura 2 gráficos A e B).

Nas amostras de sementes contaminadas com o isolado *T. wortimannii* observou-se uma incidência de 100% deste isolado. O mesmo fato ocorreu com as sementes que foram contaminadas com isolado de *Penicillium* nov. sp (incidência de 100%) (Figura 1).

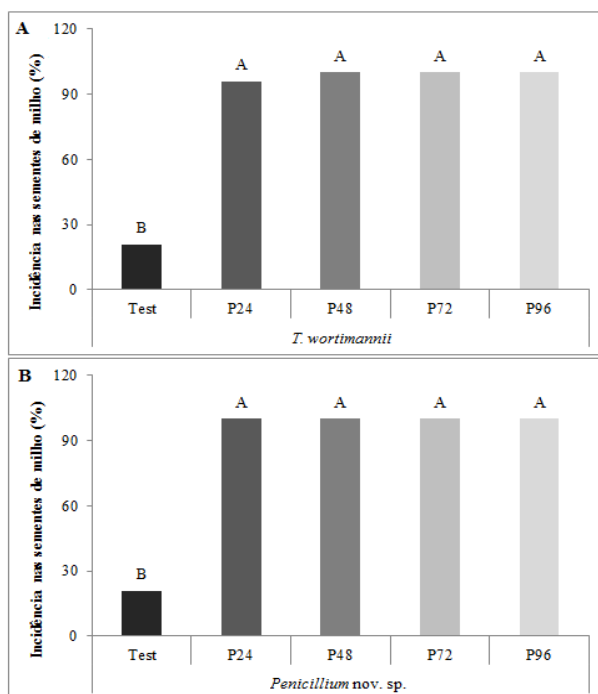
Figure 1- Incidência das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Talaromyces wortimannii* e das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Penicillium* nov sp. (Contaminação por massa seca dos isolados).



Nas sementes acondicionadas em contato com o inóculo de *T. wortimannii* por diferentes períodos de tempo, observou-se que entre os períodos de contaminação de 24, 48, 72 e 96 horas não houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ). Entretanto, a incidência de *T. wortimannii* em todos os períodos de contaminação foi alta, com valor médio de 100%, em comparação com a testemunha em que a incidência foi em média 21% (Figura 2, gráfico A).

Para as sementes acondicionadas em contato com o inóculo *Penicillium nov. sp.* observou-se que a incidência deste isolado foi alta em todos os períodos, com valor médio de 100%, em comparação com as sementes não contaminadas, em que o valor médio não ultrapassou 25% (Figura 2, gráfico B).

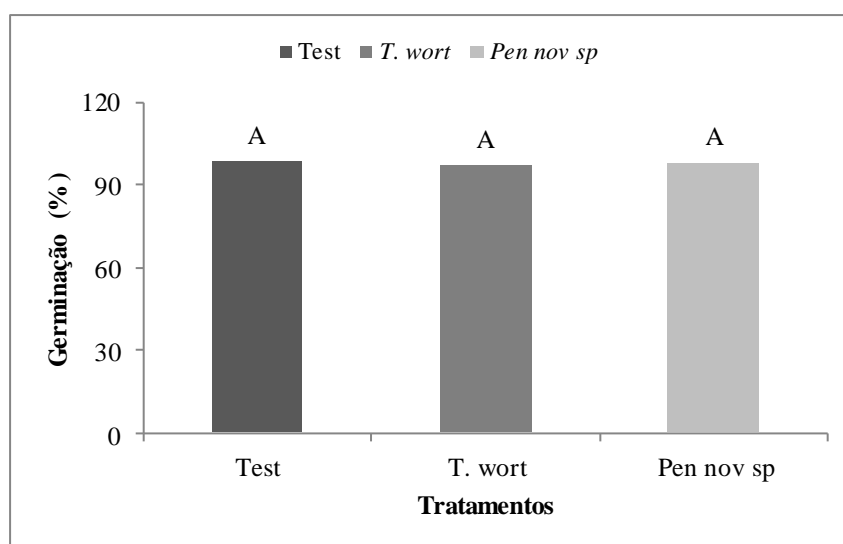
Figure 2 - Incidência das sementes de milho contaminadas com *T. wortimannii* (Gráfico A) e das sementes de milho contaminadas com *Penicillium nov sp* (Gráfico B). (Contaminação em diferentes períodos de exposição).



Para a variável germinação não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos de ambos os procedimentos de contaminação. Entretanto, na interação tratamentos x período de contaminação houve diferenças significativa na porcentagem de germinação.

De acordo com os resultados, mesmo com alta incidência dos isolados, não houve interferência dos mesmos no desempenho das sementes contaminadas com massa seca dos isolados (Figura 3).

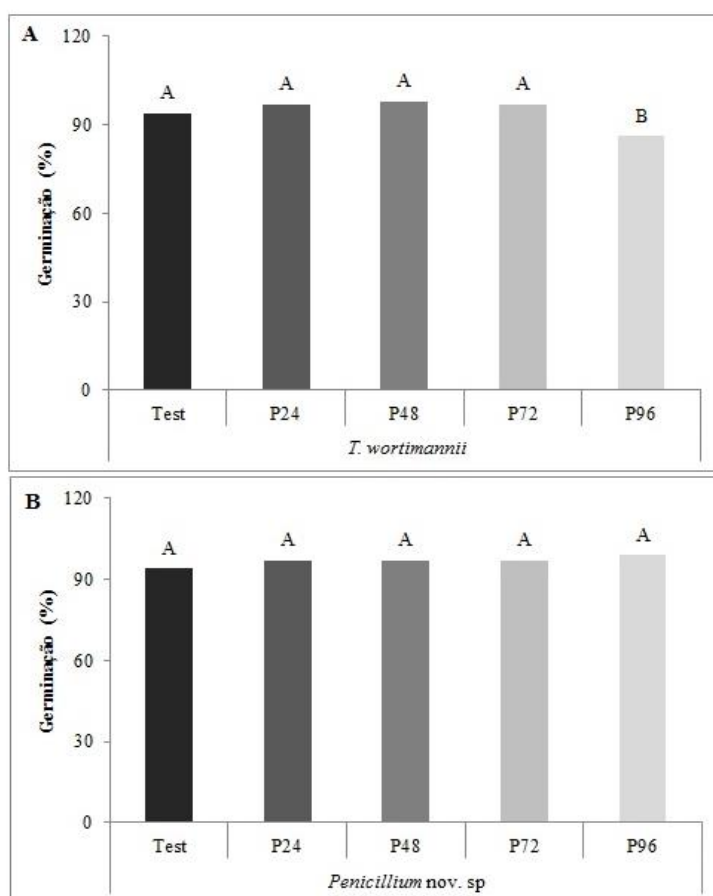
Figure 3 - Porcentagem de germinação das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Talaromyces wortimannii* e das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Penicillium nov sp.* (Contaminação por massa seca dos isolados).



Com base nos resultados da porcentagem de germinação das sementes expostas em diferentes períodos de contaminação observou que não houve diferenças entre os períodos de 0, 24, 48, e 72 horas nas sementes contaminada com isolados de *T. wortimannii*. No período de 96 horas, de acordo com os

resultados, houve redução na porcentagem de germinação das sementes de milho, com valor de 86% (Figura 4).

Figure 4 - Porcentagem de germinação das sementes de milho contaminadas com *T. wortmannii* (Gráfico A) e das sementes de milho contaminadas com *Penicillium nov sp* (Gráfico B). (Contaminação em diferentes períodos de exposição).



Em relação aos valores do índice de velocidade de emergência das sementes contaminadas com massa seca dos isolados observou-se que não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos tratamentos (Figura 5). Na análise

de variância das sementes expostas em diferentes períodos de contaminação houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os períodos de contaminação.

Com base nos resultados observou-se que as sementes expostas nos períodos 0, 24, 48 e 72 horas não houve diferenças no IVE, entretanto nas sementes expostas ao período de 96 horas houve uma redução no índice de velocidade de emergência nas sementes contaminadas com *T. wortmannii*, assim como, nas sementes contaminadas com *Penicillium nov. sp.* com uma variação de redução de aproximadamente 3,0 plantas (Figura 6, gráficos A e B).

Figure 5 - Índice de velocidade de emergência de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Talaromyces wortmannii* e das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Penicillium nov sp.* (Contaminação por massa seca dos isolados).

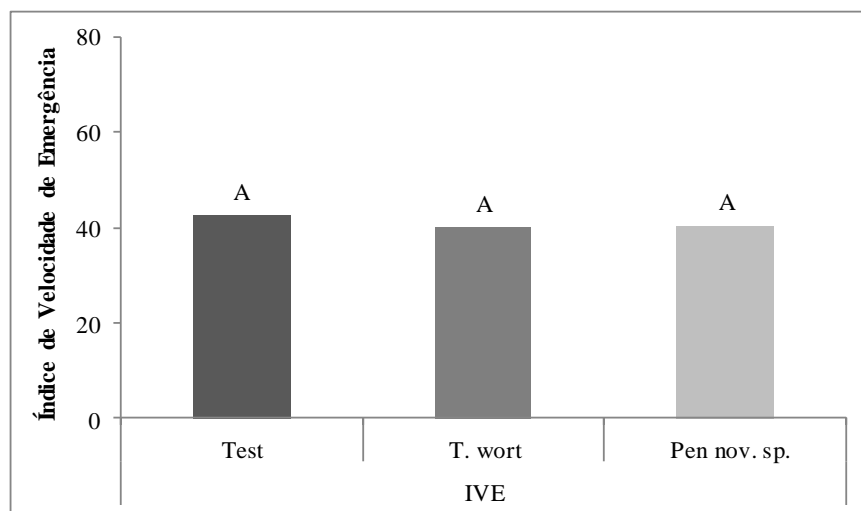
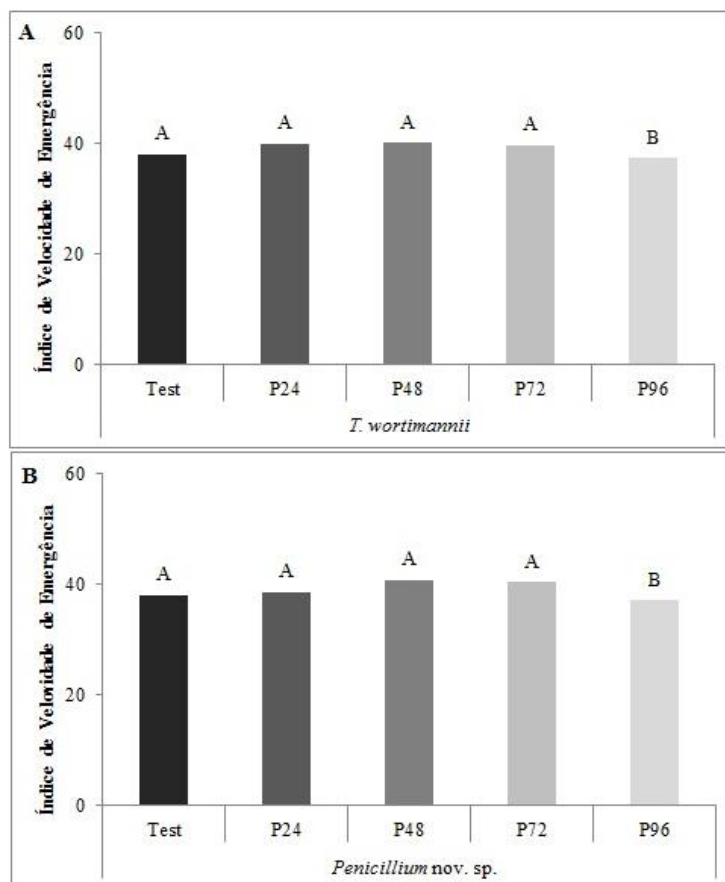




Figure 6 - Índice de velocidade de emergência de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com *T. wortimannii* (Gráfico A) e das sementes de milho contaminadas com *Penicillium nov. sp* (Gráfico B). (Contaminação em diferentes períodos de exposição).



Nas variáveis estandes inicial e final das sementes contaminadas com massa seca fúngica não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em nenhuma das variáveis analisadas (Figura 7). Na análise de variância dos estandes inicial e final das sementes expostos em diferentes períodos de contaminação houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) apenas na variável período de tempo.

Com base nos resultados observou-se que tanto no estande inicial quanto no final houve uma redução no número de plantas no período de exposição de 96 horas nas sementes contaminadas com *T. wortimanni*, assim como, nas sementes contaminadas com *Penicillium nov. sp* (Figura 8, gráficos A e B).

Figure 7 - Porcentagem de estande inicial e final de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Talaromyces wortimannii* e das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Penicillium nov sp*. (Contaminação por massa seca dos isolados).

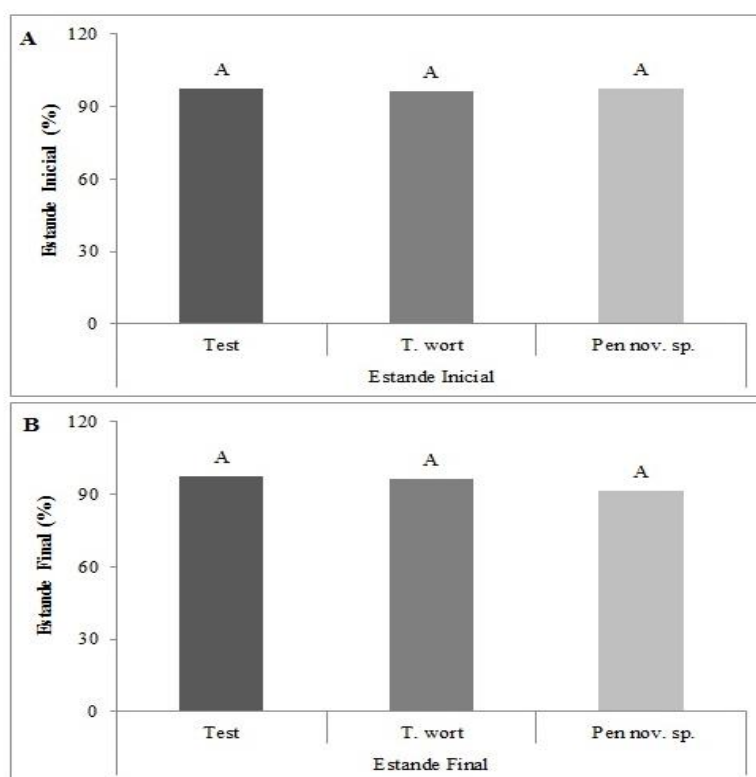
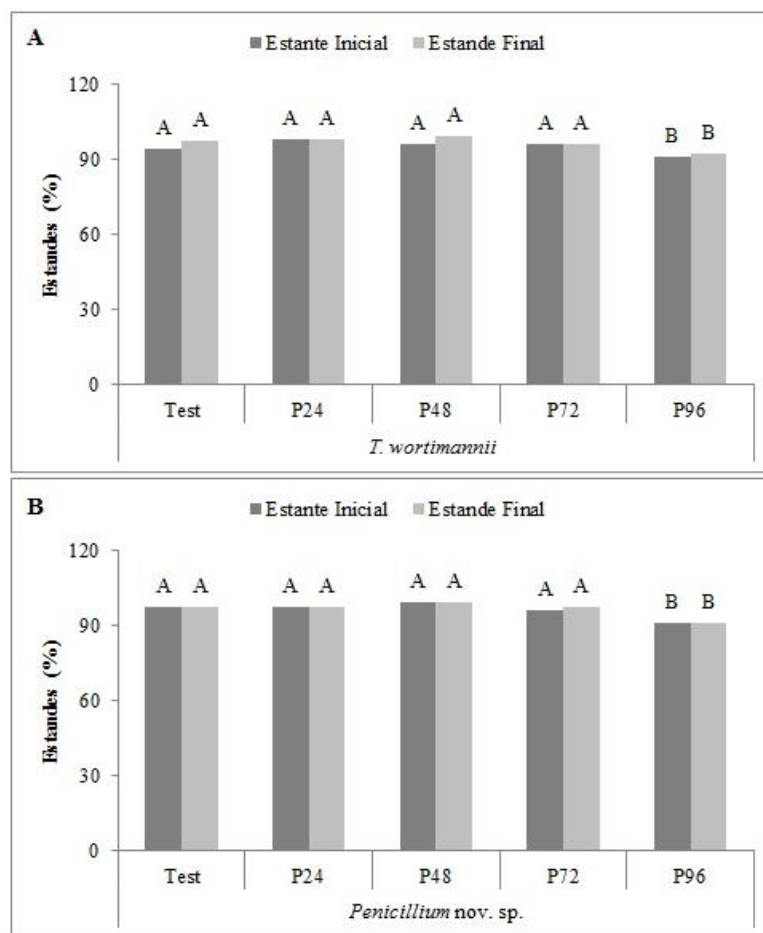


Figure 8 - Porcentagem de estandes inicial e final de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com *T. wortimannii* (Gráfico A) e das sementes de milho contaminadas com *Penicillium nov sp* (Gráfico B). (Contaminação em diferentes períodos de exposição).



Para análise de variância da altura de plantas observou-se que não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos tratamentos, no ensaio das plantas oriundas de sementes contaminadas com massa seca fúngica do isolados em estudo (Figura 9).

Entretanto, a altura de planta, de acordo com a ANAVA, foi influenciada significativamente ( $P < 0,005$ ) pelos diferentes períodos de contaminação, havendo diferenças significativas na interação tratamento x período de tempo (Figura 10, gráficos A e B).

No ensaio em que as sementes foram contaminadas com isolado de *T. wortimannii*, o valor da altura de plantas não variou com quando as sementes foram expostas nos diferentes períodos de exposição (Figura 10, gráfico A). Nos períodos de exposição 0, 24 e 48 horas não houve diferença na altura de plantas, entretanto observou-se que nos períodos de 72 e 96 horas houve uma redução na altura de plantas, com valor de 41,45 e 47,15 cm respectivamente, no ensaio em que as sementes foram contaminadas com isolado de *Penicillium nov. sp* (Figura 10, gráfico B).

Figure 9 - Altura de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Talaromyces wortimannii* e das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Penicillium nov sp*. (Contaminação por massa seca dos isolados).

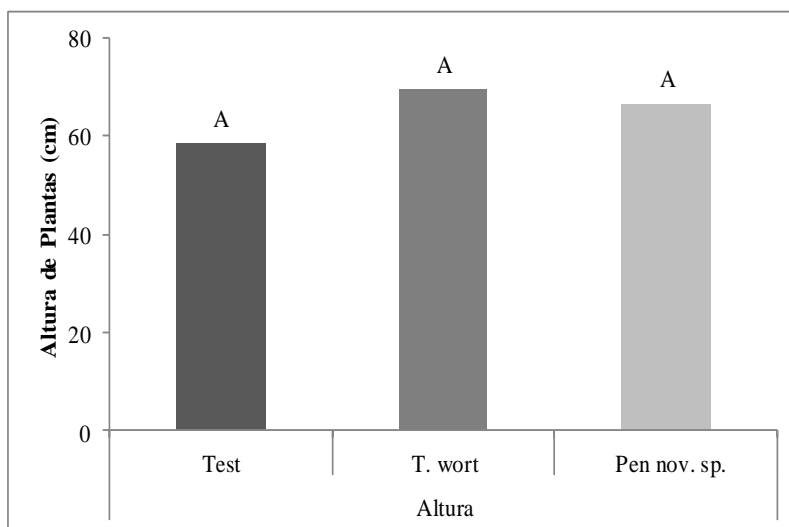
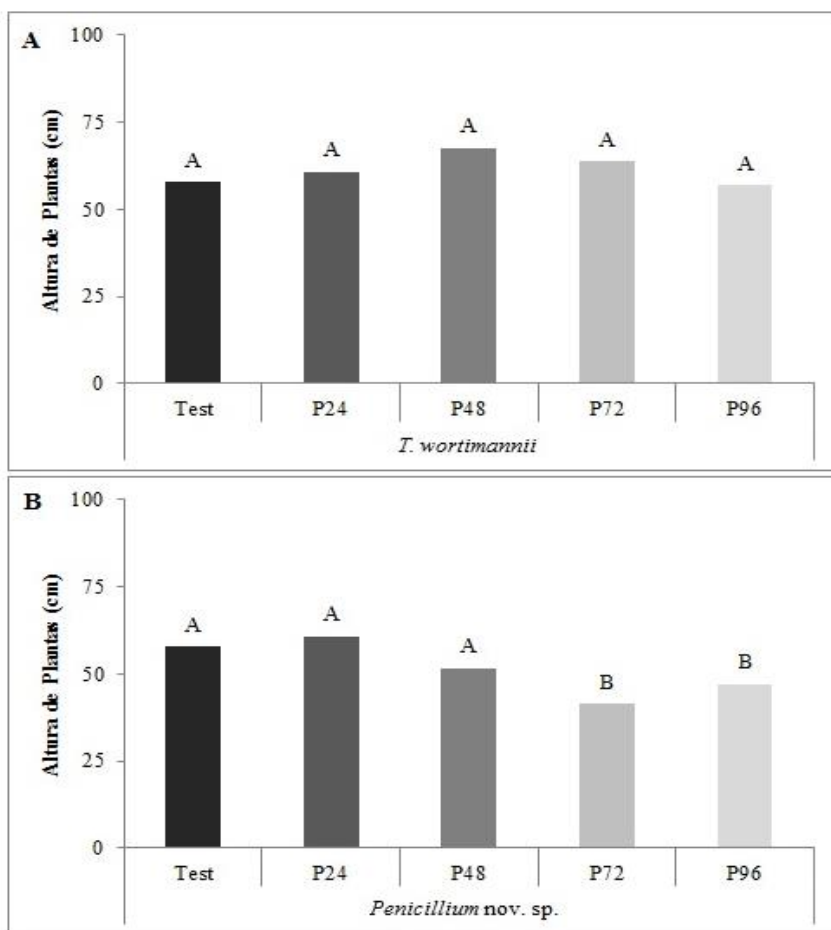


Figure 10 - Altura de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com *T. wortimannii* (Gráfico A) e das sementes de milho contaminadas com *Penicillium nov sp* (Gráfico B). (Contaminação em diferentes períodos de exposição).



Na variável peso fresco e peso seco de plantas não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) nos tratamentos oriundos das sementes contaminadas com massa seca fúngica (Figura 11). Nas sementes expostas a diferentes períodos de contaminação houve diferenças significativas ( $P<0,05$ ) nas análises de peso fresco, nas variáveis tratamentos e período de tempo. Para análise de peso seco de plantas não houve diferenças significativas entre os tratamentos e períodos (Figura 12, gráficos A e B).

Com base nos resultados observou-se que a medida que se aumentou o período de exposição (0, 24, 48, 72 e 96) das sementes ao isolado de *T. wortimannii* reduziu-se o peso fresco de plantas, variando de 157,5 g (menor período de exposição) a 100,5 g (maior período de exposição) (Figura 12, gráfico A). O peso seco de plantas oriundas de sementes expostas ao isolado *Penicillium nov. sp* reduziu em todos os períodos em comparação com o peso seco das plantas das testemunhas, sendo esta redução de aproximadamente 58,0 g. Entretanto, não houve diferenças entre os períodos de exposição.

Figure 11 - Peso fresco e seco de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Talaromyces wortimannii* e das sementes de milho contaminadas com o isolado de *Penicillium nov sp.* (Contaminação por massa seca dos isolados).

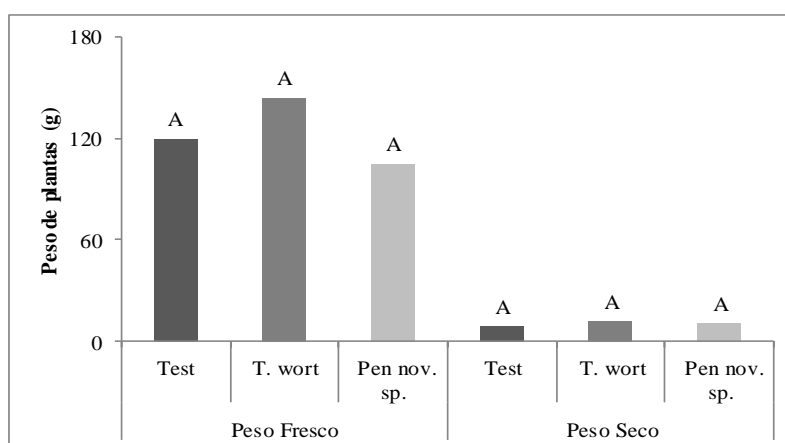
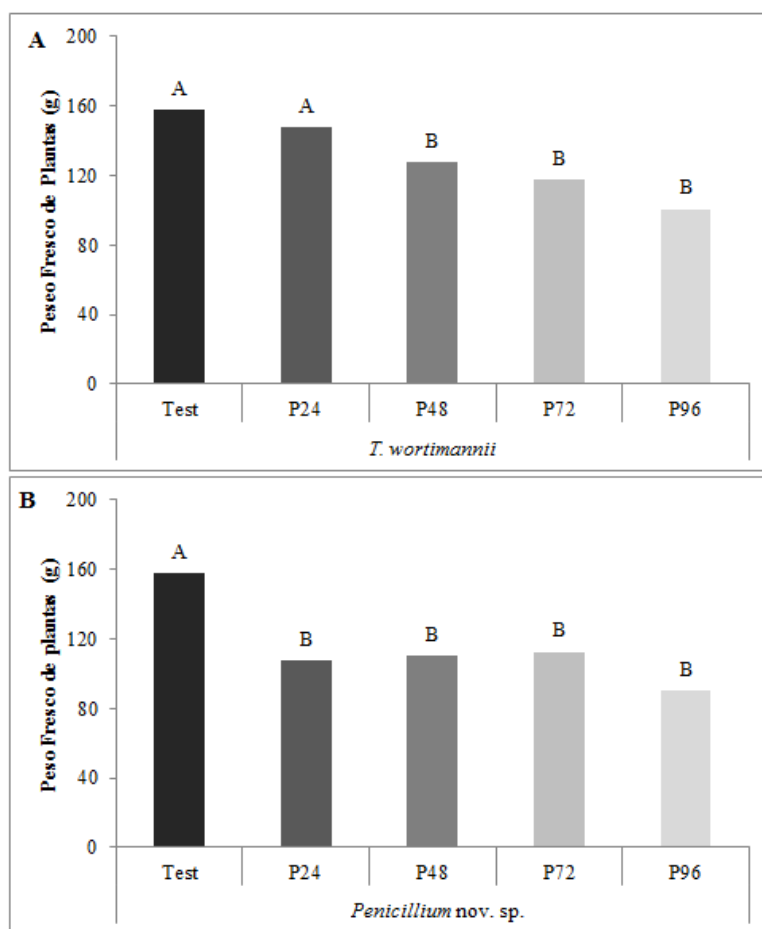


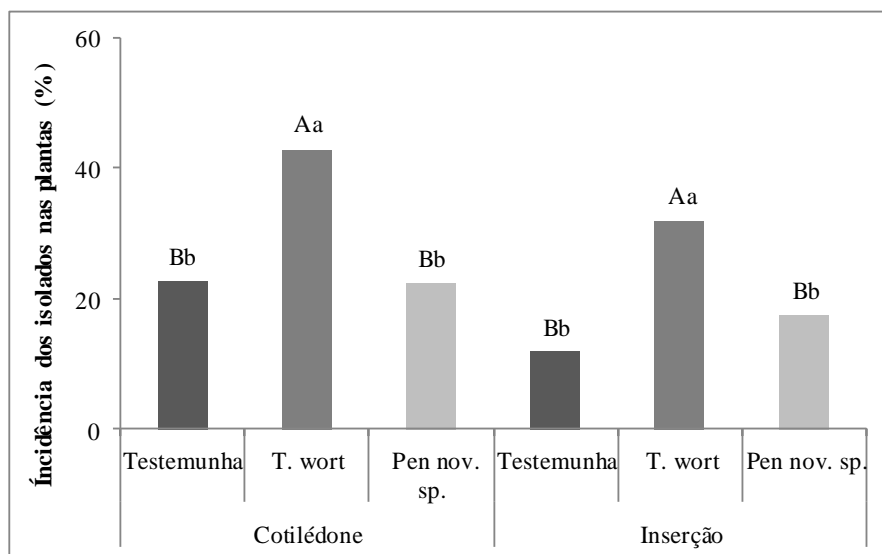
Figure 12 - Peso fresco e seco de plantas oriundas das sementes de milho contaminadas com *T. wortimannii* (Gráfico A) e das sementes de milho contaminadas com *Penicillium nov sp* (Gráfico B). (Contaminação em diferentes períodos de exposição).



### 3.1 Incidência das espécies de *T. wortmannii* e *Penicillium nov sp* no cotilédone e inserção das plantas de milho

Neste estudo foram calculadas as taxas de contaminação dos isolados obtidos nas partes (colmo e inserção) das plantas de milho. Na análise estatísticas dos dados observou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nas taxas de contaminação. Com base nos resultados, observou-se que a incidência de *T. wortmannii*, quando comparadas com a testemunha, foi alta no colmo e na inserção, 43 e 32% respectivamente, nas plantas oriundas de sementes contaminadas com massa seca dos isolados (Figura 13). A porcentagem de incidência do isolado de *Penicillium nov. sp*, nas partes das plantas de milho não difereriram entre si, com uma incidência de 22,5 e 17,5% (colmo e inserção, respectivamente) (Figura 13).

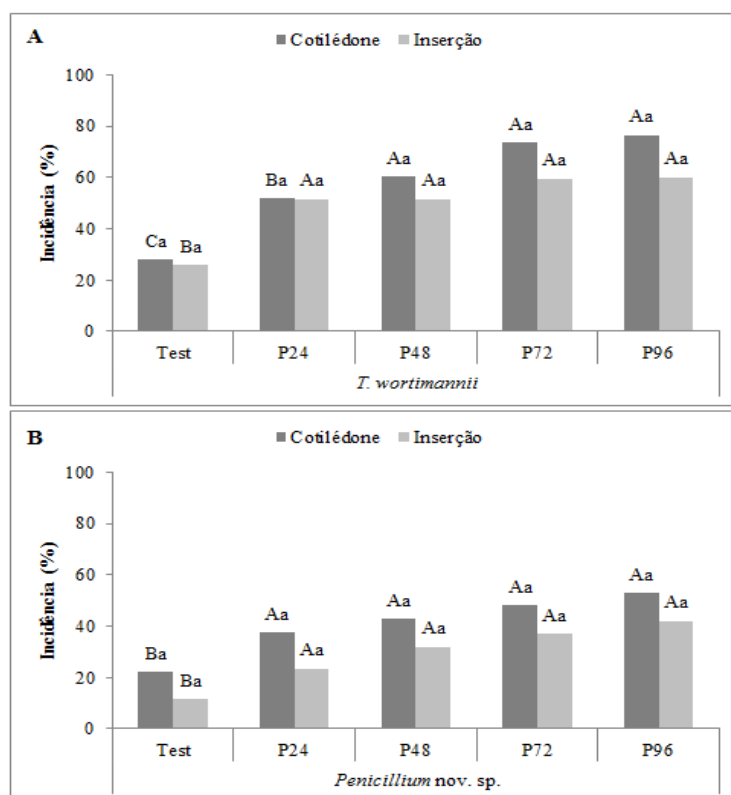
Figure 13 - Taxa de contaminação do isolado *Talaromyces wortmannii* e do isolado de *Penicillium nov sp*. em plantas milho oriundas das sementes de contaminadas por massa seca dos isolados.





Nas análises da taxa de contaminação das plantas, oriundas das sementes expostas em diferentes períodos de contaminação, observou-se que a medida que se elevou o tempo de exposição das sementes com os isolados de *T. wortimannii* aumentou-se a incidência desse isolado nas partes das plantas de milho (Figura 14, gráfico A). O mesmo ocorreu com a porcentagem de incidência da isolado de *Penicillium nov. sp.* com a elevação do tempo de exposição das sementes ao isolado de *Penicillium* aumentou-se a incidência do mesmo no colmo e na inserção das plantas milho (Figura 14, gráfico B).

Figure 14 - Taxa de contaminação do isolado *Talaromyces wortimannii* (Gráfico A) e do isolado de *Penicillium nov. sp.* (Gráfico B). (Contaminação em diferentes períodos de exposição).



#### 4 DISCUSSÃO

As sementes são importantes e eficientes veículos de disseminação de patógenos, podendo elas introduzir estes agentes em locais antes livres de doenças, constituírem abrigos para patógenos no solo e outros ambientes, contribuir para o aumento do potencial de inóculo já existente e assim infectando plântulas de cultivos posteriores (PINTO, 1998).

A disponibilidade de sementes infectadas é essencial para condução de diversos estudos no âmbito da patologia de sementes. O uso da restrição hídrica tem sido uma ferramenta eficaz no controle da germinação sem afetar o desenvolvimento dos fungos, possibilitando, assim, uma exposição das colônias períodos de tempo mais prolongados, obtendo assim percentuais de infecção em níveis desejáveis (MACHADO et al., 2004a, TEIXEIRA et al., 2005).

As espécies *Penicillium* e *Talaromyces* podem ser, muitas vezes, consideradas fungos de armazenamento, por se tratarem se de fungos com habilidade de colonizar substratos com baixo teor de umidade, e deteriorar os substratos (LINS et al., 2014).

Neste estudo a alta incidência de *Talaromyces wortimannii* e *Penicillium* nov sp. nas sementes de milho não interferiu negativamente e de maneira drástica pelas análises realizadas, diferentemente do que ocorre em outros estudos com outros organismos fitopatogênicos, como relatados por Costa et al. (2003) e dentre outros. Estes autores observaram em suas pesquisas, com *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão, que a porcentagem de germinação das sementes diminuiu com o aumento do período de exposição ao inóculo.

Em estudos com *Sternocapella maydis* e sementes de milho, Siqueira et al. (2014) verificou que o aumento no período de exposição das sementes ao patógeno pela técnica de condicionamento fisiológico, houve um efeito negativo

drástico e progressivo na germinação, vigor (índice de velocidade de emergência) e estande inicial..

Estudos sobre interações com outros patossistemas têm demonstrado que o aumento do potencial de inóculo dos patógenos nas sementes hospedeiras é capaz de provocar efeitos negativos dos mais severos, indicando desta forma os cuidados que este tipo de associação requer do ponto de vista epidemiológico e manejo das doenças envolvidas (ARAÚJO et al., 2006; BOTELHO et al., 2013; MORAES and MENTEN, 2006; SARTORI et al., 2004).

Neste estudo, foi possível observar que em algumas das variáveis utilizadas os fungos em teste foram capazes de afetar a qualidade das sementes, porém em intensidade menor. Em condições normais favoráveis para germinação das sementes de milho as espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* apresentam baixo potencial de interferência no desempenho destas estruturas, o que confirma resultados de outros trabalhos nesta linha de pesquisa. Provavelmente os efeitos de tais fungos podem ser significativos em condições de estresses para as sementes, e mediante a atuação deste grupo de organismo por ocasião do armazenamento (SOLORZANO and MALVICK, 2011; MACHADO, 2000). De acordo com a literatura, os grupos de microrganismos, na maioria os fungos, que associam se às sementes podem ser divididos em organismos de campo, sendo eles fitopatogênicos, e organismos de armazenamento, que são responsáveis por deterioração de sementes nesta fase da cadeia de sementes.

A taxa de incidência (ou contaminação) neste estudo calculada com base nas análises dos nos fragmentos coletados de plantas emergidas em testes de bandejas em condições controladas, mostram uma alta intensidade de interação deste fungo a partir de sementes inoculadas pelos métodos utilizados para esta finalidade. Vale lembrar que espécies de *Talaromyces* são bastante comuns em materiais têxteis, papel, solo, restos de plantas, grãos de café, milho (como neste

estudo), indoor, ar e poeira, e são distribuídas em todo o mundo (YILMAZ, 2012).

De modo geral, este estudo deixa claro a importância em conhecer a relação das espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* com as sementes de espécies de plantas cultivadas, já que as informações neste âmbito na literatura são escassas. Apesar dos baixos níveis de incidência ou associação destes fungos com fragmentos de plantas emergidas, tecidos vivos de plantas resultantes de sementes contaminadas podem ser fontes de inóculo destes organismos de maneira endêmica. A presença destes fungos em tecidos de sementes constituem de maneira mais evidente em riscos para a qualidade destas estruturas sob condições desfavoráveis para sua germinação e eventos iniciais posteriores.



## 7 CONCLUSÃO

A presença de *T. wortimannii* e *Penicillium* nov. species em sementes de milho contaminadas por diferentes procedimentos influenciou algumas variáveis, apesar dos baixos níveis de associação.

A incidência das espécies em estudo influenciou as variáveis germinação, IVE, estande inicial e final nas sementes expostas ao potencial de inóculo de 96 horas.

Houve incidência, porém em intensidade menos, de *Talaromyces* e *Penicillium* nas partes do cotilédone e inserção das plantas de milho.



## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A. O.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. **Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.** Fitopatologia Brasileira, v.31, n. 1, p. 35-40, 2006.
- BOTELHO, L. S.; ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J. C.; BARROCAS, E.N. **Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*.** Journal of Seed Science. v.35, n.2, p.153-160, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 2009 a. 395p.  
[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise__sementes.pdf)
- COSTA, M.L.N., MACHADO, J.C., GUIMARAES, R.M., POZZA, E.A. & ORIDE, D. **Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica.** Ciencia e Agrotecnologia, 27:1023-1030. 2003.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: **A computer statistical analysis system.** Ciência e Agrotecnologia, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- HOLMES, G. J; ECKERT, J. W. **Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California.** Phytopathology, v.89, p.716-721, 1999.
- JANISIEWICZ, W. J. **Postharvest biological control of blue mold on apples.** Phytopathology 77:481-485, 1987.
- LINS, J. L. F.; SILVA J. M. DA; L. P. DA; SANTOS, T. M. C; SANTOS, E. L. **Ocorrência de fungos de campo e armazenamento em ingredientes e rações para suínos.** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. v. 9, n.2, p. 14 - 20, abr-jun, 2014.
- MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Editora UFLA, Lavras-MG, 134 p, 2000.
- MACHADO, J. C., POZZA, E. A. **Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes.** In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). Sementes: qualidade fitossanitária. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 375-398.



MACHADO, J. C. et al. **Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v. 26, n. 4, p. 62-67, 2004.

MAGUIRE, J. D. **Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour**. Crop Science, v.2, n.2, p. 176-177, 1962.

MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. **Transmissão de *Alternaria* spp. através de sementes de feijão e seu efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes**. Summa Phytopathologica, v.32, n.4, p.381-383, 2006.

MORALES, H; MARÍN, S; ROVIRA, A; RAMOS, A. J; SANCHIS, V. **Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages**. Lett Appl Microbiol **44**:30–35, 2007.

PINTO, N. F. J. de A. **Patologia de Sementes de Milho**. Circular Técnica 29, Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, 44p., jul. 1998.

PITT, J. I. & HOCKING, A. D. **Fung and Food Spoilage** 2nd ed. London, U.K.; Blackie Academic & Professional, 1997.

SARTORI, A.F.; REIS, E.M.; CASA, R.T. **Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho**. Fitopatologia Brasileira, v.29, p.456-458, 2004.

SIQUEIRA, C. DA. S.; BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; SILVA, U. A. DA.; DIAS, I. E. **Efeitos de *Stenocarpella maydis* em sementes e na fase inicial de desenvolvimento do milho**. Journal of Seed Science, v.36, n.1, p.079-086, 2014.

SOLORZANO, C.D.; MALVICK, D.K. **Effects of fungicide seed treatments on germination, population, and yield of maize grown from seed infected with fungal pathogens**. Field Crops Research, v.122, n.3, p.173-178, 2011.

TEIXEIRA, H., MACHADO J.C., ORIDE, D. **Técnica de restrição hídrica: Efeito sobre *Acremonium strictum*, protusão de sementes e obtenção de sementes de milho infestadas**. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.30, n.2, p.109-114, 2005.

YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; HOEKSTRA.; ES. **Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species**. Persoonia **29**: 39–54, 2012.

**CAPÍTULO 4 COMPORTAMENTO, INTERAÇÃO E EFEITOS DE  
ESPÉCIES DE *Penicillium polonicum* E *Aspergillus flavus* EM GRÃOS DE  
MILHO E SOJA, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS E NÍVEIS DE  
RESTRIÇÃO HÍDRICA**

## RESUMO

As espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são responsáveis por diversas perdas quantitativas nos grãos do milho e soja, além de afetarem a qualidade dos grãos na forma de contaminação com metabólitos tóxicos ao homem e animal. Fatores, como temperatura e umidade, contribuem de forma intensa na contaminação de patógenos e na produção de micotoxinas. Neste sentido, o estudo sobre o comportamento e a relação entre os fatores abióticos nos danos e produção da micotoxinas nos grãos devem ser revistos. O presente estudo objetivou avaliar o comportamento de espécies de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* submetidas ao estresse hídrico e de temperatura. E a interação destas espécies com grãos de milho e soja submetidos às mesmas condições de estresse hídrico e de temperatura. Os isolados de *Penicillium* e *Aspergillus* foram crescidos em meio BDA, modificado pelos solutos glicerol, manitol e NaCl, em três níveis de potenciais hídricos, -1,0; -5,0 e -10,0 Mpa e acondicionados à 15, 20, 25 e 30 °C. A variação no comportamento foi analisada pelo índice de crescimento micelial e pela produção de conídios. Para o estudo da interação, os grãos de milho e soja foram inoculados e acondicionados nas mesmas temperaturas e potenciais hídricos, após um período os grãos contaminados e não contaminados foram analisados quanto ao teor de água e concentração de aflatoxina. O crescimento micelial foi influenciado pelos diferentes potenciais hídricos (0,0; -1,0; -5,0 e -10,0 MPa) e temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C). Não houve inibição de crescimento dos isolados de *Penicillium* e *Aspergillus* em nenhum dos potenciais. O crescimento micelial e a produção de conídios foram, para ambos os isolados, superiores nos menores níveis de potenciais, -1,0 (P1) e -5,0 (P5), e nas temperaturas mais elevadas, 20, 25 e 30 °C. As mesmas condições de estresse hídrico e de temperatura proporcionaram o aumento no teor de água dos grãos de milho e soja contaminados com isolados de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* e uma alta concentração das aflatoxinas nos grãos contaminados com o isolado de *Aspergillus*.

**Palavras-chave:** Fungos de armazenamento. Condições abióticas. Aflatoxinas.

## ABSTRACT

The species of *Penicillium* and *Aspergillus* are responsible for many losses in maize and soybeans and they are able to produce toxic metabolite that cause damage health in human and animal. Many factors, such as temperature and humidity, are important to infection and mycotoxin production. The study of behavior variation and interation between abiotic factors is important because in the damages caused for this fungi and production of mycotoxins. The aimed of this estudy was evaluate the behavior of *Penicillium polonicum* and *Aspergillus flavus* isolate with water stress and temperature variation. And the interaction of these isolates with maize and soybean grains in the same conditions of water stress and temperature variation. *Penicillium* and *Aspergillus* isolates were grown in PDA medium, modified by solutes: glycerol, mannitol and NaCl in three water potential levels, -1.0, -5.0 e -10.0 Mpa, and kept in temperature of 15, 20, 25 and 30 ° C. The behavior was analyzed by mycelial growth rate and the production of conidia. In the study of interation, maize and soybeans grains were inoculated and kept in the same water stress and tempeture variation. After these periods, water content and aflatoxin concentration were analized in the contaminated grain and not-contaminated grain. Mycelial growth and production of conida were influenced by the water potential (0.0, -1.0, -5.0 and -10.0 MPa) and temperatures (15, 20, 25 and 30 °C). There was not inhibition of *Penicillium* and *Aspergillus* growth and conidia produtiton in the any potential. The greater growth of this isolates was in the low potential, -1,0 and -,5,0, and in the high temperature of 20 and 25 ° C. The same condition of water stress and temperature provided the increase in water content of maize and soybean grains contaminated with *P. polonicum* and *A. flavus* and high concentration of aflatoxins in maize and soybeans grains contaminated with *Aspergillus*.

**Key words:** Storage fungi. Abiotic Condition. Aflatoxin.



## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos de armazenamento, representados em sua maioria por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são responsáveis por diversas perdas dos grãos de milho e soja, com destaque para a produção de metabolitos tóxicos ao homem e animal. Estas espécies podem se encontradas em diversos ambientes, devido à diversidade das condições climáticas e de cultivo principalmente no Brasil.

Os grãos durante seu armazenamento são predispostos à perda de qualidade devido, em grande escala, às contaminação fúngicas (Schuh et al., 2011). Os principais danos causados pelo ataque fúngico, principalmente pelas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, são a perda de massa, de volume, de vigor, degradação nutricional, descoloração, odor desagradável, aquecimento, mudanças químicas (Costa et al., 2005; Faroni et al., 2005; Hermanns et al., 2006).

Partes dessas perdas são atribuídas à baixa qualidade fisiológica e física dos grãos, resultado da interferência de fatores ambientais, como a eficiência do processo de secagem, teor água dos grãos, período de armazenagem, controle de pragas, temperatura e umidade relativa do ar e o percentual de grãos danificados, (Magan & Aldred, 2007).

A contaminação das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* pode ocorrer no campo ou durante armazenagem ou, ainda, após o processamento da produção (Ono et al., 2006). Diversos fatores podem contribuir para a infecção pelos fungos como: genótipo, condições ambientais, momento de colheita, danos mecânicos, tempo entre colheita, secagem e condições de armazenagem (Paterson & Lima, 2009).

As espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são capazes de produzir toxinas que podem causar danos à saúde do homem e animal, além de inviabilizar o uso e consumo de alimentos. A maioria das micotoxinas atualmente é agrupada pela

sua atividade tóxica, podem ser mutagênicas, carcinogênicas ou teratogênicas, e pela sua ação no organismo, hemotoxinas, hepatotoxinas, nefrotoxinas, dermatotoxinas, neurotoxinas ou imunotoxinas (Pitt, 2000).

Entre as principais toxinas produzidas pelos fungos estão as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, produzidas por diversas espécies do gênero *Aspergillus* (Maziero & Bersot, 2010). Tais como, *Aspergillus flavus*, produtores das aflatoxinas do grupo B, e *Aspergillus nomius* e *Aspergillus parasiticus*, produtores das aflatoxinas dos grupos B e G (KLICH, 2007). Como consequências, a presença destas micotoxinas interfere na exportação de grãos, além de impedir e reduzir a produção de alimentos e produtividade pecuária por causar intoxicação em humanos e animais, e até morte de animais (Mulunda et al., 2013).

A temperatura e o teor de água nos grãos são fatores que condicionam o crescimento e a produção de micotoxinas de fungos (PEREIRA et al, 2002). O estudo da influência e interação destes fatores com os grãos devem ser mais rigorosas para evitar a contaminação e o crescimento de micro-organismos e a produção de toxinas (FRANCO, 1996; FAO, 2004).

O conhecimento das interações destas espécies com fatores abióticos e a prevenção da produção de micotoxina são passos fundamentais na gestão dos riscos no âmbito de segurança de alimentos (Lahouar et al., 2016). Recetemente, alguns trabalhos têm sido dedicados ao estudo das correlações entre estes organismos, os fatores abiótico e a incidência das espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* nos grãos de milho e soja recém-colhidos ou armazenados (Ono et al., 2006; Almeida et al., 2009; Bento et al., 2012; Tédihou et al., 2012).

Neste sentido, uma variação de comportamento entre as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, devido aos fatores abióticos, tem sido observado nestas espécies, isto faz com que as relações entre o comportamento dos fungos

em questão e os fatores que levam a alta concentração de micotoxinas nos grãos sejam revistas.

O presente estudo objetivou avaliar o comportamento de espécies de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* submetidas ao estresse hídrico e de temperatura. E a interação destas espécies com grãos de milho e soja submetidos às mesmas condições de estresse hídrico e de temperatura.





## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras - MG.

### **2.1 Obtenção de isolados fúngicos**

Os isolados de *Aspergillus flavus* e *Penicillium polonicum* foram selecionados e coletados em amostras de grãos de milho oriundas de ensaio anterior. A metodologia utilizada para estes isolamentos foi o do blotter salino, conforme descrição de Machado (2000).

Os grãos foram distribuídos em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com solução salina esterilizada, contendo 18% de cloreto de sódio em água destilada. As placas foram mantidas em câmara de incubação sob luz negra (radiação na faixa de 320-400 nm), com fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por um período de sete dias. A identificação da microflora presente foi realizada com o auxílio do microscópio estereoscópico, e quando necessário utilizou-se microscópio ótico para confirmação das estruturas do fungo, conforme descrição de Machado (1988).

### **2.2 Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos fungos submetidos à restrição hídrica e diferentes temperaturas**

Discos (5mm) de micélio dos fungos em estudo foram, colocados no centro das placas de Petri de nove cm de diâmetro, em contato com os substratos modificados pelos restritores hídricos manitol, NaCl e glicerol, em diferentes potenciais osmóticos (0,0; -1,0; -5,0; -10,0, MPa) e acondicionadas em câmaras tipo BOD, às temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e fotoperíodo de 12 horas. Como testemunha utilizou-se substrato sem restritor hídrico.

O crescimento micelial dos fungos foi avaliado diariamente, pela medição do diâmetro das colônias em posição ortogonal, no verso das placas com o auxílio de régua milimetrada. Esses dados foram utilizados para a determinação do índice de crescimento micelial verificado a partir da fórmula proposta por OLIVEIRA (1991):

$$\text{ICM} = \frac{\text{C1} + \text{C2} + \dots + \text{Cn}}{\text{N1} + \text{N2} + \dots + \text{Nn}}$$

onde:

**ICM** = crescimento micelial;

**C1, C2, Cn** = crescimento das colônias na primeira, segunda e última avaliação;

**N1, N2 e Nn** número de dias.

Ao término do crescimento dos isolados avaliou-se a produção de conídios por meio do preparo de uma suspensão dos mesmos e, posterior contagem do número de conídios com auxílio da câmara de 'Newbauer'.

**Delineamento experimental:** o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, em esquema fatorial 3 x 3 x 4 (restritores x potenciais hídricos x temperaturas, respectivamente) para os dois isolados utilizados neste estudo.

### **2.3 Efeitos da interação de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* com grãos de milho e soja submetidos a diferentes temperaturas e níveis estresse hídricos**

Neste ensaio, grãos de milho e soja, livres de fungos, foram contaminados com as espécies em estudo.

Os fungos foram transferidos, inicialmente, para meio BDA e mantidos por sete dias sob regime de luz de 12 horas, à temperatura de 25 °C. Para a contaminação dos grãos, preparou-se uma suspensão de conídios acrescentando-se 10 mL de água esterilizada e 50 ppm de TWEEN 80 por placa, prosseguindo-se com a pulverização uniforme da suspensão sobre os grãos e secagem por um período de 48 horas.

Posteriormente, os grãos contaminados foram distribuídos uniformemente em placas de Petri de 15 cm contendo meio Agar-Agua modificado com os diferentes restritores e potenciais hídricos (citados anteriormente no item 4.2) e incubados por dez dias nas temperaturas mencionadas no item 4.2. Os grãos não contaminados foram utilizados como testemunha.

Ao término do período de incubação os grãos de milho e soja foram submetidos às seguintes análises:

### **2.3.1 Determinação do teor de água nos grãos**

O teor de água foi determinado pelo método da estufa a 105°C, conforme metodologia descrita pelas RAS (Brasil, 2009). As amostras de grãos de milho e soja contaminados e não contaminados foram colocados na estufa com circulação de ar forçada, à 105°C, por 24 horas. Após esse período as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em dessecadores para resfriarem e, então, pesadas.

O teor de água foi calculado em base úmida aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de água} = 100 (P-p) / P-t$$

Onde:

**P** = massa inicial (g) – massa do recipiente + massa do grão

**p** = massa final (g), massa do recipiente + massa do grão

**t** = tara (g), massa do recipiente

### **2.3.2 Determinação da aflatoxina nos grãos de milho e soja**

Para a determinação da aflatoxina foram selecionadas os tratamentos submetidos a restrição hídrica com potenciais de -1,0, -1,5 e -10,0 nas temperaturas de 15, 20 e 25 °C.

As análises de aflatoxina nas amostras de grãos foram realizadas por meio da técnica de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- High-performance liquid chromatography) pelo Laboratório de Análises Físico-Químicas de Produtos de Origem Vegetal (LANAGRO-MG).

### **2.3.3 Delineamento experimental**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições, em esquema fatorial 3 x 3 x 3 (restritores hídricos x potenciais hídricos x temperaturas, respectivamente).

### **2.4 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SISVAR, versão 4.6 (Build 6.1), do qual foi obtido a análise de variância em esquema fatorial 3x 3x4 e 3x3x3. As variáveis significativas ou sua interação no teste F foram submetidas ao teste Tukey.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Comportamento das espécies de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* em meio de cultura sólido com restrição hídrica

O comportamento das espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* foi influenciado, significativamente, pelas variáveis abióticas utilizadas neste estudo.

##### 3.1.1 Índice de Crescimento Micelial (ICM) dos isolados de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus*

###### A) ICM do isolado de *P. polonicum*

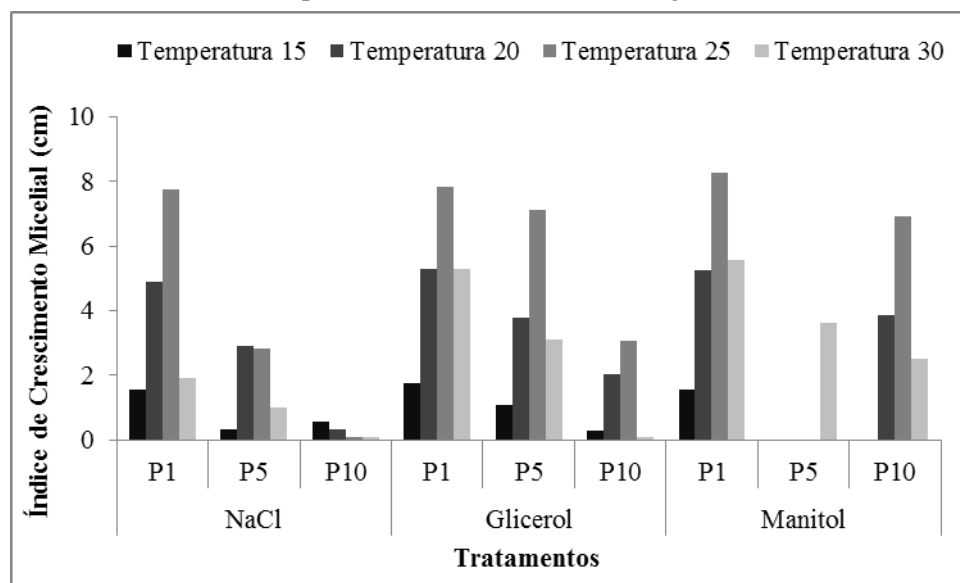
O índice de crescimento micelial (ICM) do isolado de *Penicillium polonicum*, de acordo com as ANAVA, foi influenciado significativamente ( $P < 0,005$ ) pelos diferentes níveis de potenciais hídricos dos substratos, pelas diferentes temperaturas e solutos, havendo diferenças significativas na interação entre ambos.

Na análise de variância do ICM das colônias *Penicillium polonicum* observou-se que à medida que elevou-se a temperatura, de 20 para 25 °C, houve aumento no crescimento micelial, nos diferentes restritores e potenciais (Figura 1 e 2). O maior crescimento de colônia do isolado de *Penicillium polonicum* foi à temperatura de 25 °C, com crescimento médio de 5,21 cm. Nos potenciais, com o aumento de -1,0 para -10,0 Mpa, houve uma redução no crescimento do isolado, variando em média de 5,0 a 1,5 cm de colônia. Em relação ao efeito dos restritores no ICM, observou-se que foi maior no meio de cultura modificado com glicerol, média de crescimento de 3,5 cm. Entretanto, nenhum dos restritores utilizados proporcionou um maior crescimento de colônia que meio de cultura não modificado (BDA), que foi em média de 4,88 cm (Figura 1).

Figure 1 - Índice de Crescimento Micelial (cm) do isolado de *Penicillium polonicum* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e potencial hídrico de 0,0; -1,0; -5,0 e -10,0 e restritores (solutos) NaCl, glicerol e manitol. Letras maiúsculas representando variações entre as linhas e letras minúsculas variações entre colunas.

NaCl				
Tratamentos	T 15 °C	T 20 °C	T 25 °C	T 30 °C
BDA	1,82 Ad	4,24 Ac	8,33 Aa	5,16 Ab
Potencial -1,0	1,57 Ac	4,88 Ab	7,73 Aa	1,93 Ac
Potencial -5,0	0,34 Bb	2,89 Ba	2,84 Ba	1,00 Bb
Potencial -10,0	0,58 Ba	0,33 Ca	0,10 Ca	0,10 Ca
CV (%)	14,13			
Glicerol				
Tratamentos	T 15 °C	T 20 °C	T 25 °C	T 30 °C
BDA	1,82 Ad	4,24 Ac	8,33 Aa	5,16 Ab
Potencial -1,0	1,75 Ac	5,27 Ab	7,82 Aa	5,3 Ab
Potencial -5,0	1,08 Ac	3,76 Bb	7,11 Ba	3,11 Bb
Potencial -10,0	0,30 Bc	2,04 Cb	3,06 Ca	2,50 Bb
CV (%)	14,13			
Manitol				
Tratamentos	15	20	25	30
BDA	1,82 Ad	4,24 Ac	8,33 Aa	5,16 Ab
Potencial -1,0	1,55 Ac	5,24 Ab	8,26 Aa	5,56 Ab
Potencial -5,0	0,10 Bb	0,10 Cb	0,10 Cb	3,63 Ba
Potencial -10,0	0,10 Bc	3,86 Bb	6,93 Ba	2,49 Cc
CV (%)	14,13			

Figure 2 - Representação gráfica do índice de Crescimento Micelial (cm) do isolado de *Penicillium polonicum* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e potencial hídrico de 0,0; -1,0; -5,0 e -10,0 Mpa e restritores (solutos) NaCl, glicerol e manitol.



### B) ICM do isolado de *A. flavus*

O índice de crescimento micelial (ICM) do isolado de *Aspergillus flavus*, de acordo com as Anava, foi influenciado significativamente ( $P < 0,005$ ) pelos diferentes níveis de potenciais hídricos dos substratos, pelas diferentes temperaturas e solutos, havendo diferenças significativas na interação entre ambos.

Na análise de variância do ICM das colônias *A. flavus*, assim como observado no isolado de *Penicillium*, com a elevação da temperatura de 20 para 25 °C observou-se aumento no crescimento micelial, nos diferentes restritores e potenciais (Figura 3 e 4). O maior crescimento médio de colônia do isolado foi à temperatura de 25 °C, cerca de 9,37 cm, as temperaturas de 20 e 30 °C apresentaram uma média de crescimento de 6,67 e 8,08 cm, respectivamente.

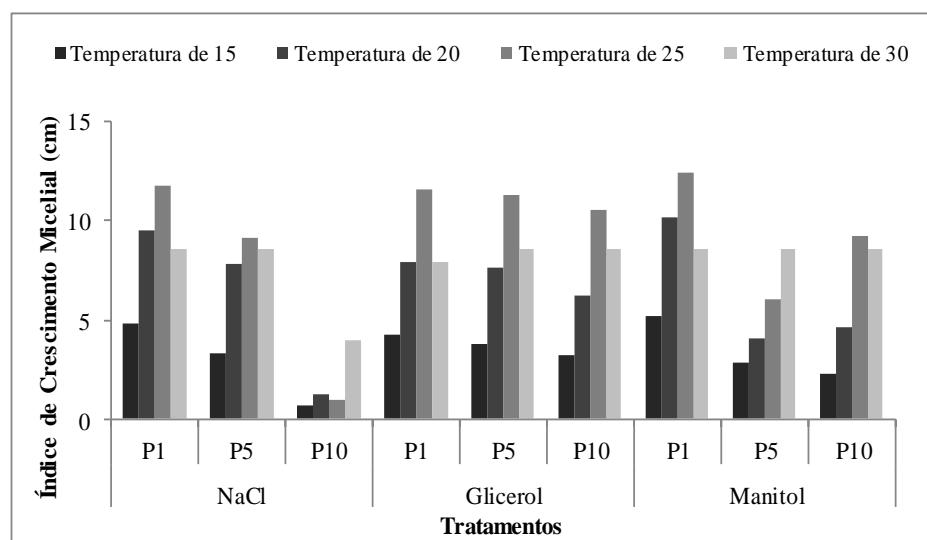


Nos potenciais de -1,0 para -5,0 Mpa houve um crescimento significativo no da colônia de *A. flavus*, variando em média de 6,0 a 8,0 cm de colônia, respectivamente. De acordo com os resultados do efeito dos restritores no ICM, observou-se que foi maior no meio de cultura modificado com glicerol, média de crescimento de 7,62 cm, quando comparado aos restritores NaCl e manitol ao meio de cultura não modificado (BDA) utilizados no estudo (Figura 1).

Figure 3 - Índice de Crescimento Micelial (cm) do isolado de *Aspergillus flavus* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e potencial hídrico de 0,0; -1,0; -5,0 e -10,0 Mpa e restritores (solutos) NaCl, glicerol e manitol. Letras maiúsculas representando variações entre as linhas e letras minúsculas variações entre colunas.

NaCl				
Tratamentos	T 15 °C	T 20 °C	T 25 °C	T 30 °C
BDA	3,2 Bd	7,64 Bc	10,79 Ba	8,6 Bb
Potencial -1,0	4,77 Ad	9,53 Ab	11,75 Aa	8,60 Ac
Potencial -5,0	3,35 Bd	7,80 Bc	9,14 Ba	8,60 Ab
Potencial -10,0	0,73 Cb	1,23 Cb	1,00 Cb	4,02 Ba
<b>CV (%)</b>	<b>4,42</b>			
Glicerol				
Tratamentos	T 15 °C	T 20 °C	T 25 °C	T 30 °C
BDA	3,2 Bd	7,64 Bc	10,79 Ba	8,6 Bb
Potencial -1,0	4,26 Ac	7,93 Ab	11,54 Aa	7,91 Bb
Potencial -5,0	3,83 Ad	7,60 Ac	11,31 Aa	8,60 Ab
Potencial -10,0	3,18 Bd	6,23 Bc	10,5 Ba	8,60 Ab
<b>CV (%)</b>	<b>4,42</b>			
Manitol				
Tratamentos	15	20	25	30
BDA	3,2 Bd	7,64 Bc	10,79 Ba	8,6 Bb
Potencial -1,0	5,19 Ad	10,15 Ab	12,43 Aa	8,60 Ac
Potencial -5,0	2,87 Bd	4,07 Cc	6,04 Cb	8,60 Aa
Potencial -10,0	2,27 Cd	4,62 Bc	9,19 Ba	8,60 Ab
<b>CV (%)</b>	<b>4,42</b>			

Figure 4 - Representação gráfica do índice de Crescimento Micelial (cm) do isolado de *Penicillium polonicum* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e potencial hídrico de 0,0 (BDA); -1,0; -5,0 e -10,0 Mpa e restritores (solutos) NaCl, glicerol e manitol.



### 3.1.2 Produção de conídios dos isolados de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus*

#### A) Produção de conídios do isolado de *Penicillium polonicum*

A produção de conídios do isolado de *Penicillium polonicum* foi influenciada significativamente ( $P < 0,005$ ) pelos diferentes níveis de potenciais hídricos dos substratos, pelas diferentes temperaturas e solutos, havendo diferenças significativas apenas na interação restritores(solutos) x temperatura.

A maior produção de conídios, de acordo com os resultados, foi a temperatura de 25 °C, com uma produção de 2 e 6 milhões de conídios (Figura 5, Gráfico A). Na variável potencial hídrico a média de produção de conídios foi de aproximadamente 3,5 milhões de conídios, sendo que a maior produção foi no potencial de -1,0 Mpa (Figura 5, Gráfico B). Em relação aos restritores

observou-se uma expressiva produção de conídios no NaCl, com média de produção de aproximadamente 3 milhões de conídios, seguido pelo manitol com uma produção média de aproximadamente 2 milhões de conídios. O meio de cultura modificado com o restritor glicerol foi, de acordo com os resultados (Figura 6), o que apresentou menor produção de conídio (aproximadamente 950 mil conídios).

Figure 5 - Produção de conídios do isolado de *Penicillium polonicum* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C (A) e potencial hídrico de 0,0 (BDA), -1,0, -5,0, e -10,0 MPa ( B).

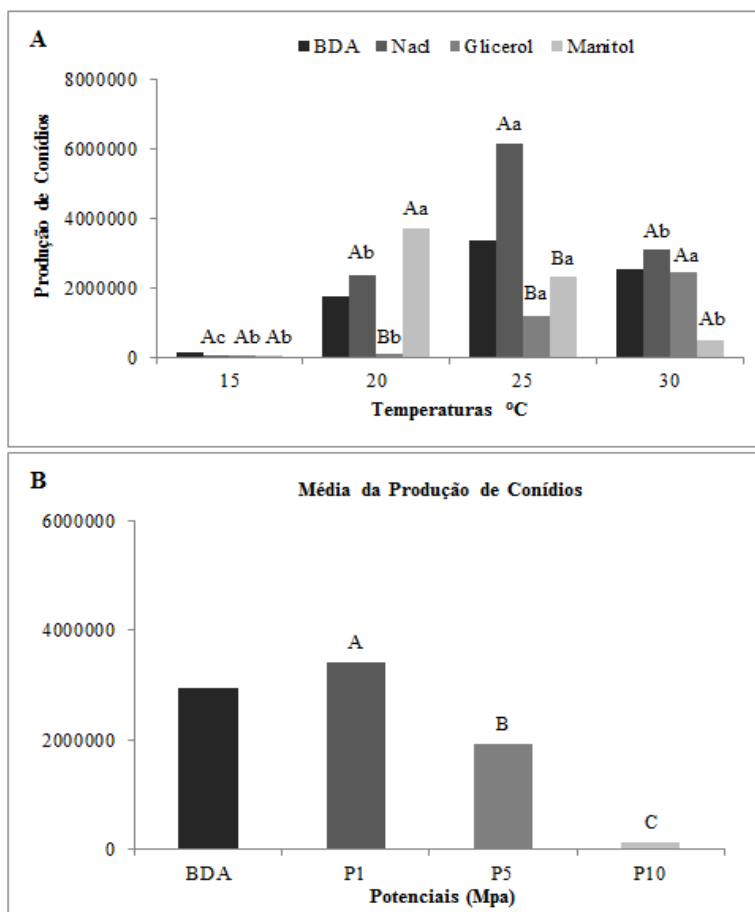
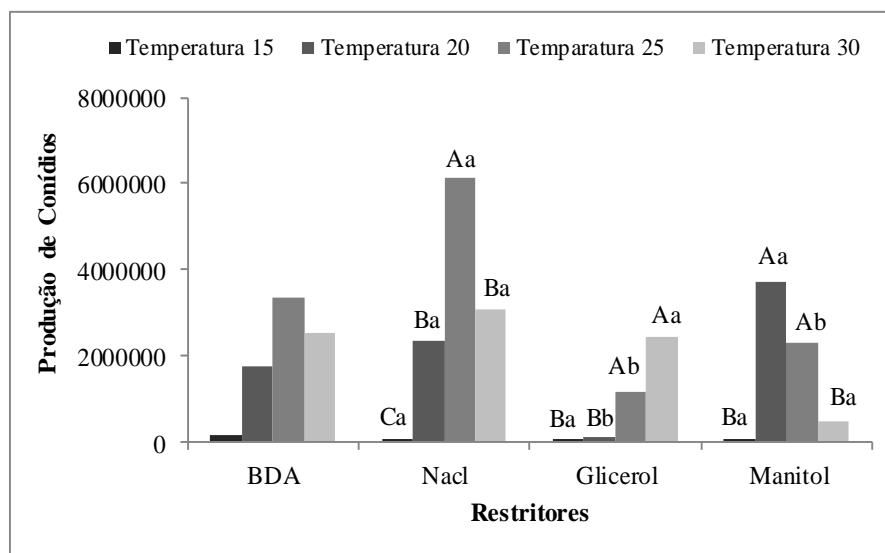


Figure 6 - Produção de conídios do isolado de *Penicillium polonicum* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e restritores (solutos) de NaCl, glicerol e manitol.



#### A) Produção de conídios do isolado de *Aspergillus flavus*

A produção de conídios do isolado de *A. flavus* foi influenciada significativamente ( $P < 0,005$ ) pelos diferentes níveis de potenciais hídricos dos substratos, pelas diferentes temperaturas e solutos, havendo diferenças significativas na interação entre ambos.

De acordo com o resultado da ANAVA observou-se que a maior produção de conídios foi a temperatura de 30 °C, seguido pela temperatura de 20 e 25 °C, com um produção de 2 e 6 milhões de conídios (Figura 7, Gráfico A e B). Na variável potencial hídrico a média de produção de conídios foi de aproximadamente 3,0 milhões de conídios, sendo que a maior produção foi no potencial de -1,0 Mpa (Figura 7, Gráfico A e B). O potencial de -10,0 foi o que apresentou menor produção relação aos outros potenciais e a testemunha (BDA). Em relação aos restritores observou-se uma alta produção de conídios no meio

de cultura modificado com NaCl e Manitol, ambos não diferiram da testemunha, com média de produção de aproximadamente 3 milhões de conídios. O meio de cultura modificado com o restritor glicerol foi, de acordo com os resultados, foi o que apresentou menor produção de conídio (aproximadamente 920 mil conídios) (Figura 8 A e B).

Figure 7 - Produção de conídios do isolado de *Aspergillus flavus* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e potencial hídrico de 0,0 (BDA), -1,0, -5,0, e -10,0 MPa e restritores (solutos) de NaCl, glicerol e manitol.

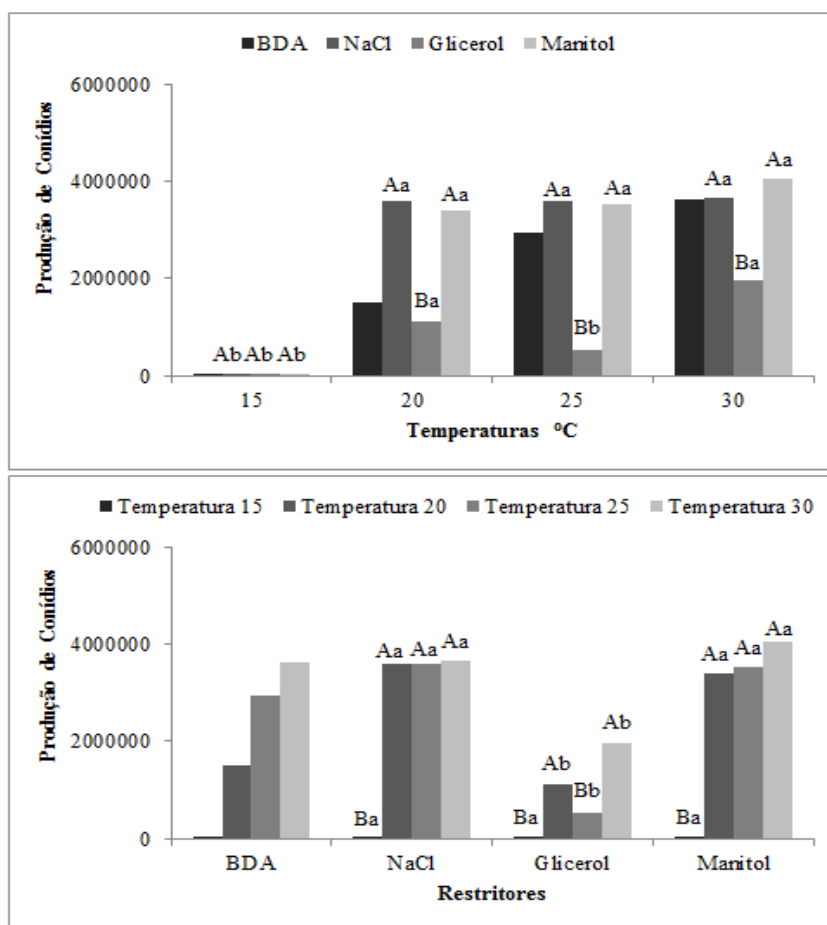
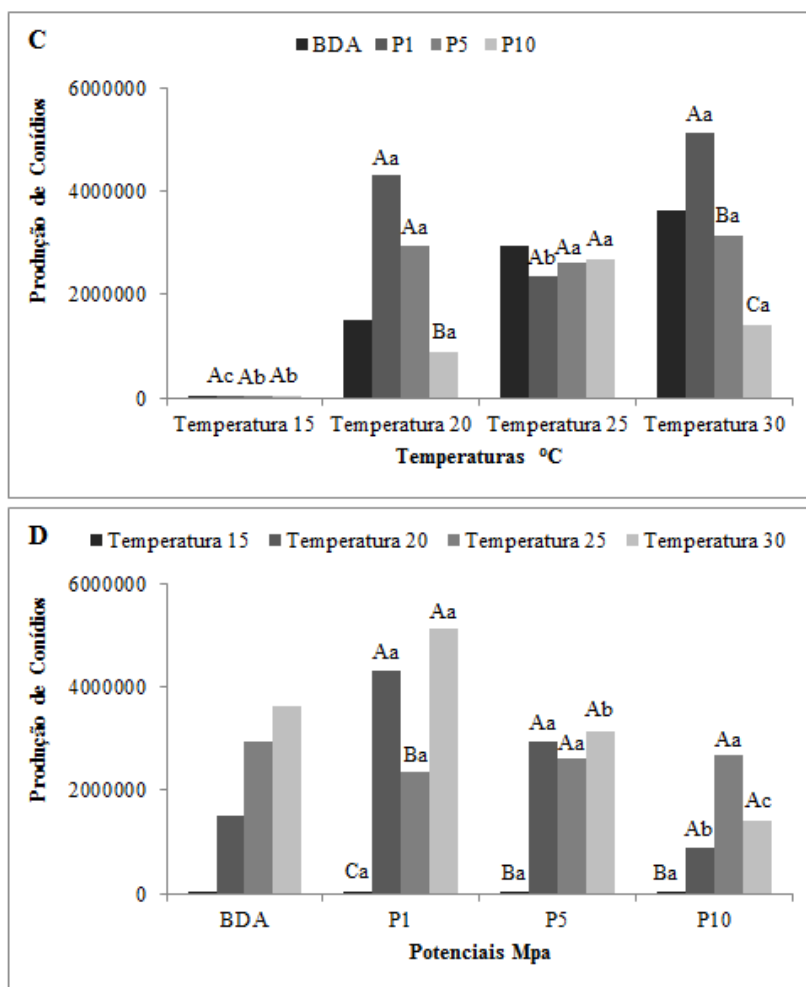


Figure 8 - Produção de conídios do isolado de *Aspergillus flavus* acondicionado sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C e potencial hídrico de 0,0 (BDA), -1,0, -5,0, e -10,0 MPa e restritores (solutos) de NaCl, glicerol e manitol.



### **3.2 Efeito da interação dos isolados de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* com grãos de milho e soja**

Com base nos resultados observou-se que as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* influenciaram, significativamente, as variáveis analisadas em estudo.

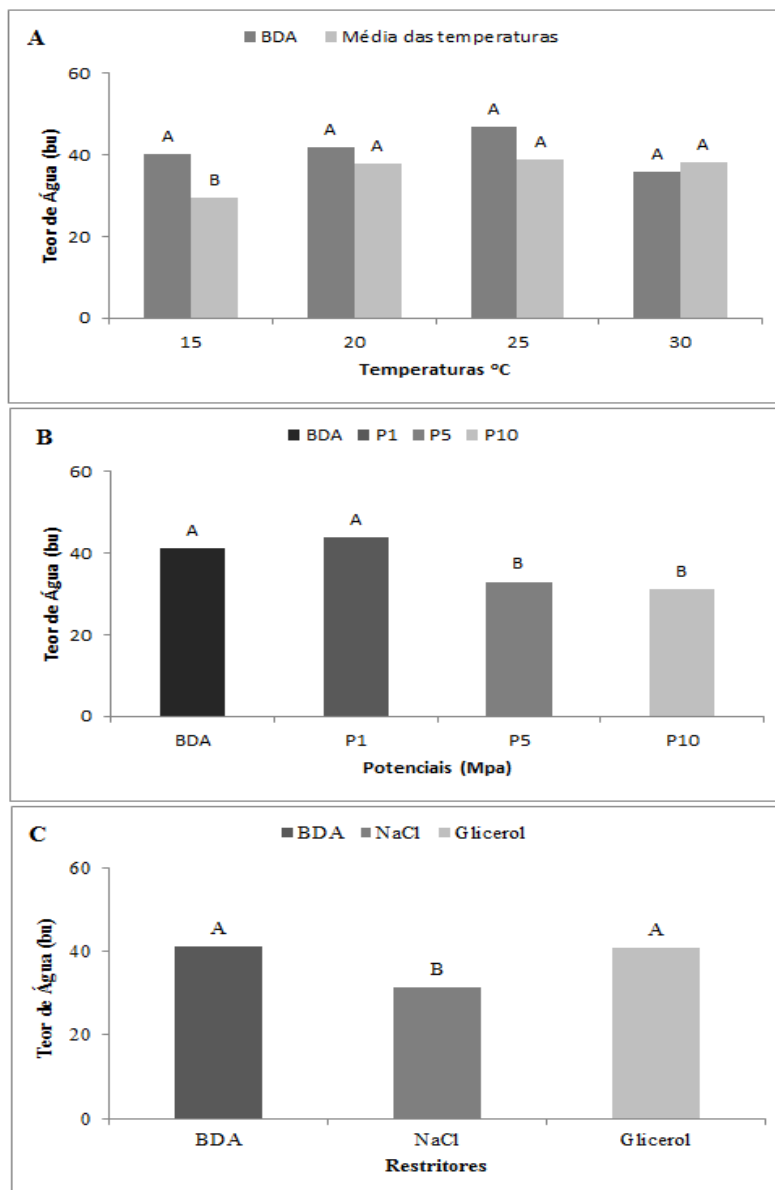
#### **3.2.1 Teor de água dos grãos de milho contaminados com os isolados de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus***

##### **A) Teor de água dos grãos de milho contaminados com o isolado de *Penicillium polonicum***

Na análise de variância do teor de água dos grãos milho contaminados com o isolado de *P. polonicum* observou-se diferenças significativas ( $P < 0,005$ ) nas variáveis temperatura, níveis de potenciais hídricos e solutos, nas interações de ambos os fatores, de acordo com a ANAVA, não houve diferença significativa.

Para os valores médios da variável temperatura observou-se o aumento no teor de água nas sementes contaminadas quando armazenadas nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, com um valor médio de 37,8; 38,96 e 38,12 bu, entretanto, observou-se que estes valores não diferiram das sementes não contaminadas armazenadas nas mesmas condições (Figura 9, gráfico A). Nos potenciais hídricos a medida que elevou-se os níveis de -1,0 (P1) para -10,0 (P10) Mpa houve uma redução no teor de água nas sementes de milho contaminadas (Figura 9, gráfico B). Na variável restritor, de acordo com os resultados dos valores médios, observou-se que o glicerol proporcionou maior teor de água nas sementes contaminadas, (teor de água de 40,71 bu), quando comparado ao restritor NaCl (teor de água de 31,45 bu) (Figura 9, gráfico C).

Figure 9 - Teor de água (base úmida) dos grãos de milho contaminados por *Pencillium polonicum* e não contaminados (BDA) acondicionados sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C (A), potenciais hídricos de 0,0 (BDA); -1,0 (P1); -5,0 (P5) e -10,0 (P10) (B) e restritores BDA, NaCl e glicerol (C).



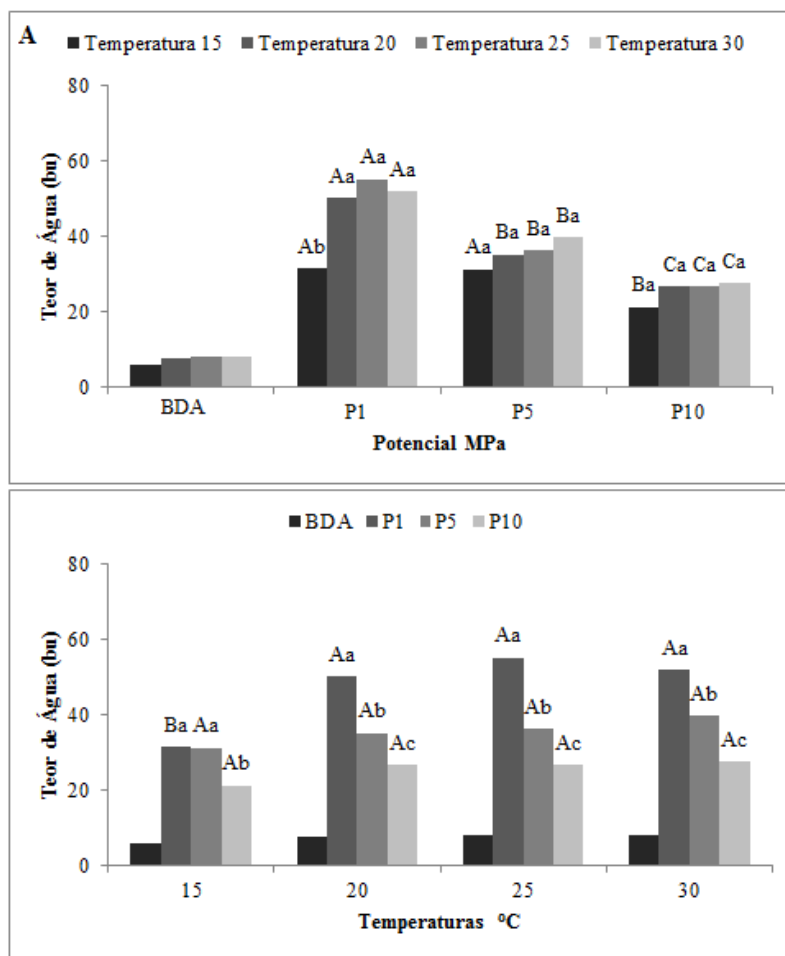


**B) Teor de água dos grãos de milho contaminados com o isolado de *Aspergillus flavus***

Na análise de variância do teor de água dos grãos milho contaminados com o isolado de *A. flavus* observou-se diferenças significativas ( $P < 0,005$ ) nas variáveis temperatura, níveis de potenciais hídricos, nos solutos e na interação potencial x temperatura.

O teor de água das sementes contaminadas com *A. flavus* foi maior quando estas foram armazenadas nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C (Figura 10, gráfico A). Na variável potencial hídrico observou-se que o teor de água das sementes contaminadas armazenadas no potencial de -1,0 (P1) Mpa nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C foi maior, média de 47,11 bu, , quando comparados aos potenciais de -5,0 (P5) e -10,0 (P10) Mpa. As sementes contaminadas armazenadas no restritor glicerol apresentaram maior teor de água, com o valor médio de 48,0 bu, do que aquelas armazenadas no restritor NaCl, com valor médio de 30,0 bu. Observou-se, também, que ambos os restritores (NaCl e glicerol) proporcionaram maior teor de água nas sementes contaminadas quando comparadas a testemunha.

Figure 10 - Teor de água (base úmida) dos grãos de milho contaminados *Aspergillus flavus* e não contaminados (BDA) acondicionados sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C (A), potenciais hídricos de 0,0 (BDA); -1,0 (P1); -5,0 (P5) e -10,0 (P10) (B).



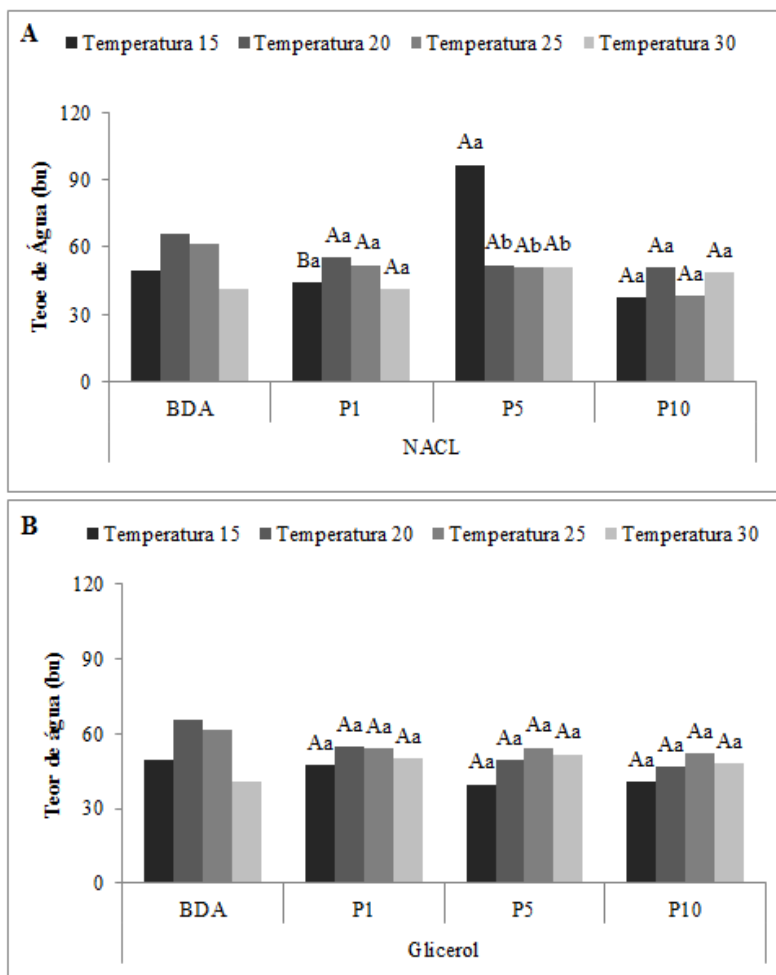
### **3.2.2 Teor de água dos grãos de soja contaminados com os isolados de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus*.**

#### **A) Teor de água dos grãos de soja contaminados com o isolado de *Penicillium polonicum***

Na análise de variância do teor de água dos grãos soja contaminados com o isolado de *P. polonicum* observou-se diferenças significativas ( $P < 0,005$ ) nos níveis de potenciais hídricos e em suas interações.

O teor de água dos grãos de soja contaminados foi maior na temperatura de 15 °C, com um valor médio de aproximadamente 97,0 bu, quando estes foram armazenados no potencial de -5,0 e no restritor NaCl (Figura 11, gráfico A). Para os outros tratamentos observou-se, na figura 11 gráfico A, que não diferiram entre si, tendo seus valores médios do teor água variando entre 45 a 50 bu. Em relação ao restritor glicerol (Figura 11, gráfico B) observou-se que não houve diferenças entre as variáveis em estudo, porém observa-se um alto teor de água em todos os tratamentos com valores médios do teor variando entre 47 a 54 bu.

Figure 11 - Teor de água (base úmida) dos grãos de milho contaminados por *Pencillium polonicum* e não contaminados (BDA) acondicionados sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C , potenciais hídricos de 0,0 (BDA); -1,0 (P1); -5,0 (P5) e -10,0 (P10) e restritores NaCl (A) e glicerol (B).

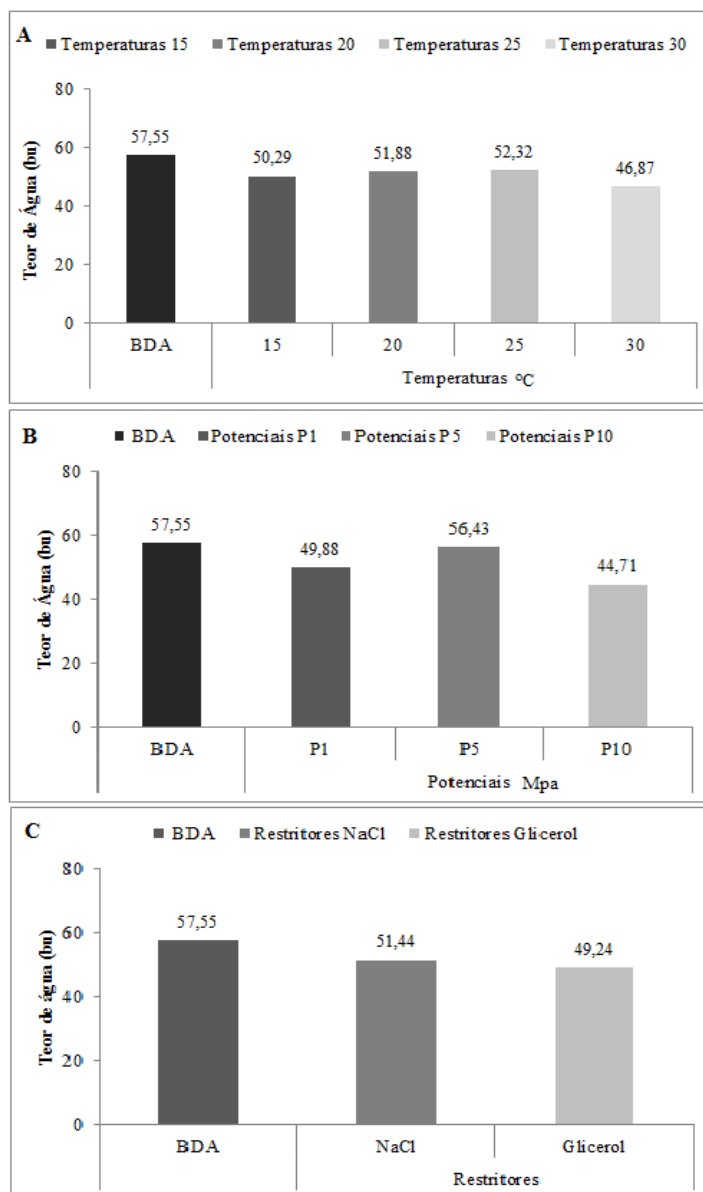


**B) Teor de água dos grãos de soja contaminados com o isolado de *Aspergillus flavus***

Na análise de variância do teor de água dos grãos soja contaminados com o isolado de *A. flavus* observou-se que não houve diferenças significativas ( $P > 0,005$ ) nas variáveis temperatura, níveis de potenciais hídricos, nos solutos e na interações.

De acordo com os resultados observou-se que a influencia das variáveis em estudo (diferentes temperaturas, potenciais e solutos) foram à mesma em todos os tratamentos. Todas as variáveis em estudo proporcionaram aos grãos de soja contaminados e não contaminados alto teor de água nas sementes de soja, com um valor médio variando entre 44 e 57 bu.

Figure 12 - Teor de água (base úmida) dos grãos de soja contaminados *Aspergillus flavus* e não contaminados (BDA) acondicionados sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C (A), potenciais hídricos de 0,0 (BDA); -1,0 (P1); -5,0 (P5) e -10,0 (P10) (B) e restritores NaCl e glicerol (C).



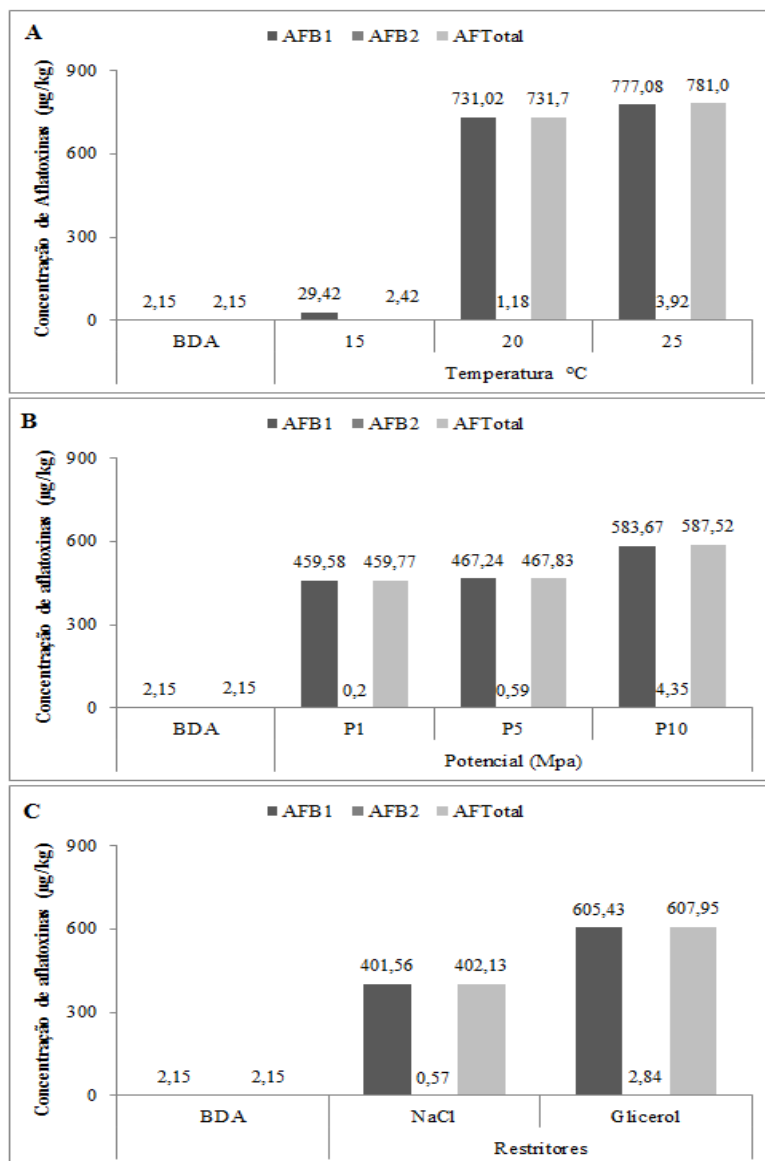
### **3.2.3 Concentração de aflatoxinas em grãos de milho e soja contaminados com *Aspergillus flavus***

#### **A) Concentração de aflatoxinas em grãos de milho contaminados com *Aspergillus flavus***

A concentração de aflatoxinas nos grãos de milho contaminados foi alta quando estes foram armazenados nas temperaturas de 20 e 25 °C, com valores médios de 730 e 780 µg/kg, respectivamente. Nos grãos de milho contaminados armazenados na temperatura 15 °C observou-se que a concentração de aflatoxinas variou entre 2,42 a 29,42 µg/kg, o mesmo fato ocorreu com os grãos de milho não contaminados (armazenadas no BDA), onde a concentração de aflatoxinas não ultrapassou 3 µg/kg (Figura 13, gráfico A).

Em relação ao efeito dos níveis de potenciais na concentração de aflatoxinas observou-se que foi alta nos três potenciais em estudo, P1, P5 e P10, com valores médios de 459, 467 e 587 µg/kg, respectivamente (Figura 13, gráfico B). Nos diferentes restritores a concentração de aflatoxinas variou entre 400 a 608 µg/kg (NaCl e glicerol, respectivamente), nas sementes contaminadas armazenadas no restritor glicerol a concentração aflatoxinas foi 200 e 600 µg/kg maior que as contaminadas armazenadas no restritor NaCl e nas não contaminadas, respectivamente (Figura 13, gráfico C). Observou-se ainda que entre as aflatoxinas analisadas a AFB2 foi a de menor concentração nas sementes contaminadas e não contaminadas.

Figure 13 - Concentração de aflatoxinas dos grãos de milho contaminados por *Aspergillus flavus* e não contaminados (BDA) acondicionados sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C (gráfico A), potenciais hídricos 0,0 (BDA), -1,0 (P1), -5,0 (P5) e -10,0 (P10) (gráfico B) e restritores (NaCl e glicerol, gráfico C).

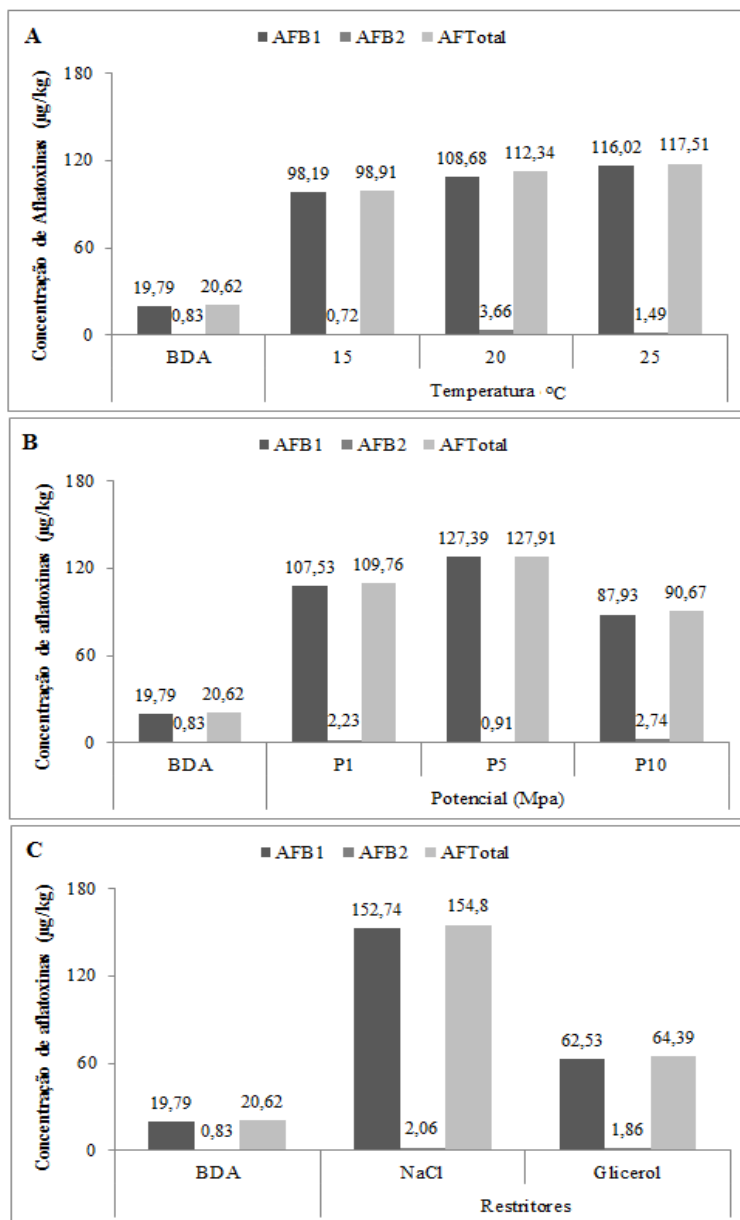




**B) Concentração de aflatoxinas em grãos de soja contaminados com *Aspergillus flavus***

A concentração das aflatoxinas foi alta em todas as temperaturas em estudo, com valores de concentração variando entre 97 e 118  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 14, gráfico A). Dentre as aflatoxinas a concentração da AFB2 nos grãos de soja foi menor que a AFB1. Nos potenciais de -1,0 e -5,0 Mpa a concentração aflatoxinas variou entre 107 e 127  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , enquanto que no potencial de -10,0 esta variação foi de 87 a 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 14, gráfico B). Nas sementes de soja contaminadas armazenadas no restritor NaCl observou-se que a concentração de aflatoxinas foi maior, 90,41  $\mu\text{g}/\text{k}$  a mais, do que as sementes contaminadas armazenadas no restritor glicerol. A concentração de aflatoxinas nas sementes não contaminadas (armazenadas no BDA) variou entre 0,83 a 20,62  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Figure 14 - Concentração de aflatoxinas dos grãos de soja contaminados por *Aspergillus flavus* e não contaminados (BDA) acondicionados sob diferentes temperaturas de 15, 20, 25 e 30 °C (gráfico A), potenciais hídricos 0,0 (BDA), -1,0 (P1), -5,0 (P5) e -10,0 (P10) (gráfico B) e restritores (NaCl e glicerol, gráfico C).





#### 4 DISCUSSÃO

A ocorrência de doenças em grãos vem se tornando cada vez mais intensa, causando elevados prejuízos aos produtores, e colocando em risco a saúde humana e animal. O aumento das áreas de cultivo, uso de sementes de má qualidade, colheita e armazenamentos inadequados, entre outros fatores, têm sido causas que têm contribuído para este cenário, que é uma preocupação mundial (Costa et al., 2009; Oliveira et al., 2004; Casa et al., 2006).

O presente estudo, com as espécies de *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus*, reforça a hipótese de que fatores como a temperatura e o teor de água podem influenciar tanto, o crescimento e o desenvolvimento destas espécies, quanto sua interação com sementes e grãos de espécies hospedeiras e sua produção de toxinas. Segundo alguns autores, como Sansom et al., (2000) e Astoreca et al., (2014) o crescimento destas espécies e a produção e acúmulo de micotoxinas em alimento são influenciados por múltiplas variáveis, como, o teor de água (aw), a temperatura, pH, composição atmosférica, tipo de substrato e tempo.

Lahouar et al., (2016) demonstraram a influência de diferentes variáveis, como, temperatura, atividade de água e tempo de incubação no crescimento e produção de aflatoxina B1 em sementes de sorgo. O autores observaram que o maior crescimento micelial foi à temperatura de 25 e 37 °C.

No presente estudo crescimento micelial de ambas as espécies foram maiores a 25 °C na maioria dos tratamentos. Este mesmo resultado foi encontrado outras pesquisas com em Horn (2005), que relatou que a temperatura de 25 °C proporcionou altas taxas de crescimento das espécies *Penicillium* e *Aspergillus* estudadas. Outros autores, também, confirmaram que as temperaturas de 25 a 30 °C proporcionam a estes fungos altas taxas de crescimento ( Mousa et al., 2011; Proietti et al., 2015).

Em ambas as espécies observou-se que na temperatura de 30 °C houve uma redução de crescimento e de produção de conídios, o que também, foi observado por Samapundo et al., (2007), nas temperaturas de 30 a 37 °C ocorreu uma redução da taxa de crescimento e um aumento na fase lag das espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. Ambos os estudos demonstraram que estas espécies, assim como outros fungos, possuem uma temperatura mínima, ótima e máxima para seu crescimento e produção de conídios.

Outro fatores além da temperatura, como, o nível do potencial hídrico do substrato de cultivo de fungos pode afetar significativamente o crescimento e a produção de esporos destes organismos. O aumento do nível de potencial hídrico faz com que o teor água do meio diminua, sendo o crescimento e a produção de metabólitos sensíveis a alteração do meio. Nanguy et al., (2010) em seus comprovaram que a produção de conídios foi afetada principalmente pela atividade de água e umidade, sendo observado também que uma baixa quantidade de água impossibilitou a produção e germinação dos esporos.

Estudos sobre o efeito do potencial hídrico na fisiologia do fitopatogenos têm sido relatados em vários trabalhos. Por exemplo, Subbarao et al. (1993) verificaram que o aumento dos níveis de potenciais reduziu o crescimento do *Aspergillus niger* demonstrando que esta espécie exige teor de água mais elevada para o seu desenvolvimento. Para a variável temperatura, estes autores observaram que o crescimento micelial foi diretamente proporcional ao aumento desta variável.

As espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* após invadirem os grãos provocam significativas perdas na qualidade, tornando-os impróprios para o uso. Fatores como período de tempo, temperatura, Teor de água dos grãos e umidade do local de armazenamento podem determinara colonização por fungos de armazenamento (DINGRA, 2005). Taís fatores foram determinantes na infecção

por *Penicillium polonicum* e *Aspergillus flavus* nos grãos de milho e soja armazenados neste estudo.

O alto teor de umidade dos grãos de milho e soja com alta temperatura, possivelmente contribuíram para o crescimento do *P. polonicum* e do *A. flavus*, assim como, na produção das aflatoxinas. Resultados diferente deste estudo foi encontrado por Domenico et al., (2015), em que a produção de aflatoxina foi em baixa temperatura e teor de umidade (variação de 11,6 a 14,61%) dos grãos de milho. De acordo com os autores, a este fato ocorreu devido à baixa incidência de *Aspergillus flavus* encontrada, com o efeito de vários fatores indiretos.

Em outro estudo observou-se que não houve uma relação significativa entre o teor de umidade dos grãos de milho (que foi < 14%) e a presença de aflatoxinas (Almeida et al., 2009). Entretanto, Arrus et al. (2005) estudando a produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* em castanha-do-pará registraram concentrações máximas de aflatoxina para os grãos que estavam armazenados em local com 97% de umidade relativa e temperaturas variando entre 25 e 30 °C.

Em grãos e produtos processados de soja analisados, Oliveira et al., (2010) encontraram, na etapa de recepção da soja, a aflatoxina B1, na concentração de 1 ppb. Quando analisaram os grãos na etapa da expedição observaram ausência desta micotoxina.

Neste estudo ficou evidente a diferença na concentração de aflatoxinas nos grãos de milho e soja, possivelmente este fato pode se explicado pela composição de ambos os grãos. Por ser rico em amido, o milho é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento do fungo e, principalmente, à contaminação por micotoxinas (Marín et al., 1998a; Marques et al., 2009).



## 5 CONCLUSÃO

Neste estudo os fatores de temperatura, potencial hídrico e restritores foram determinantes no crescimento e na produção de conídios dos isolados de *Aspergillus flavus* e o *Penicillium polonicum*.

Os mesmos fatores influenciaram na interação destes isolados com os grãos, sendo responsáveis pelo aumento do teor de água, assim como, pelo aumento na concentração de aflatoxina nos grãos de milho e soja contaminados.





## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; VALENTE SOARES, L. M. **Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids**. Brazilian Journal of Microbiology, v.31, n.4, p.321-326, 2000.
- ARRUS, K; BLANK, G; ABRAMSON, D; CLEAR, R; HOLLEY, R. A. **Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts**. J Stored Prod Res. 41:513-27, 2005.
- ASTORECA, A; VAAMOND, E G; DALCERO, A; MARIN, S; RAMOS, A. J. **Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn**. Food Microbiology. 38:276-83, 2014.
- BENTO, L.F.; CANEPPELE, M.A.B.; ALBUQUERQUE, M.C. de F. e; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. de J. **Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.71, p.44-49, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: 2011.
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. **Doenças do Milho Causadas por Fungos do Gênero *Stenocarpella***. Fitopatologia Brasileira, n. 31, v. 5, p. 427-439, set-out, 2006
- COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, V. L. **Podridões do colmo e das raízes**. 2005. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01\\_64\\_16820051120.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONTAG01_64_16820051120.html)>. Acesso em: 2016
- COSTA, R. V. da; CASELA, C. R.; COTA, L. V. **Cultivo do milho: Doenças. Sistemas de produção**. Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), 5ª edição, set. 2009.
- DHINGRA, O.D. **Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes**. In: ZAMBOLIM, L. Sementes: qualidade fitossanitária, Viçosa: UFV; DFP. p.75-112, 2005.

DOMENICO, A. S. DI; DANNER, A. M.; CLEVERSON BUSO, C.; DIVAIR CHRIST, D.; COELHO, R. M. **Análise de trilha da contaminação por aflatoxinas em grãos de milho armazenados.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.50, n.6, p.441-449, jun. 2015.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) (2004). **Almacenaje.** Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em Março de 2016.

FARONI, L. R. A. et al. **Avaliação qualitativa e quantitativa do milho em diferentes condições de armazenamento.** Engenharia na Agricultura, v. 13, n. 03, 193-201, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LADGRAF, L. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 182 p, 1996.

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.710, jan.-mar. 2006.

HORN, B. W. **Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus section Flavi*.** Mycologia. 2005;97:202-17

KLICH, M. A. **Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*.** Mycoscience, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 1-80, 2007.

LAHLALI, R.; SERRHINI, M. N. AND JIJAKLI, M. H.. **Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*.** Int. J. Food Microbiol. 103:315–322, 2005.

LAHOUAR, A. ; MARIN, S.; CRESPO-SEMPEREB, A.; SAÏDA, S.; SANCHIS, V. **Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds.** Revista Argentina de Microbiología. 48(1):78---85, 2016.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** Editora UFLA, Lavras-MG. 134 p, 2000.

MAGAN, N; ALDRED, D. **Environmental fluxes and fungal interactions: maintaining a competitive edge.** In: van West P, Avery S, Stratford M, eds.

Stress in Yeasts and Filamentous Fungi. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Ltd, 19–35, 2007a.

MARIN, S; SANCHIS, V; SAENZ, R; RAMOS, A. J; VINAS, I; MAGAN, N. **Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from corn grain.** J Appl Micro-biol. 84:25-36, 1998.

MARQUES, O.J.; VIDIGAL FILHO, P.S.; DALPASQUALE, V.A.; SCAPIM, C.A.; PRICINOTTO, L.F.; MACHINSKI JÚNIOR, M. **Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita.** Acta Scientiarum. Agronomy, v.31, p.667-675, 2009.

MAZIERO, M.T.; BERSOT, L. dos S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.12, p.89-99, 2010.

MOUSA E. T A. L.; MOUSA, W; GHAZALI, F. M; JINAP, S; GHAZALI, H. M.; RADU, S. **Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy.** J Appl Microbiol. 111:1262-74, 2011.

MULUNDA, M.; DZOMA, B.; NYIRENDA, M.; BAKUNZI, F. **Mycotoxins occurrence in selected staple food in main markets from Lubumbashi, Democratic Republic of Congo.** Journal of Food, Agriculture and Environment, v.11, p.51-54, 2013.

NANGUY, S. P. M.; PERRIER-CORNET, J. M.; BENSOUSSAN, M.; AND DANTIGNY, P. **Impact of water activity of diverse media on spore germination of *Aspergillus* and *Penicillium* species.** Int J Food Microbiol. 142: 273– 376, 2010.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.).** 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1999.

OLIVEIRA, E. de; FERNANDES, F. T.; CASELA, C. R.; PINTO, N. F. J. de A.; FERREIRA, A. da S. **Diagnose e controle de doenças na cultura do milho.** In: GALVÃO e MIRANDA. Tecnologias de produção do milho. Viçosa: UFV, p. 227-267, 2004.

OLIVEIRA, M. A.; LORINI, I.; MALLMAN, C. A. **As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada.** Braz. J. Food Technol., III SSA, novembro 2010.

ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M. da; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. **Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v.49, p.63-71, 2006.

PATERSON, R.R.M.; LIMA, N. **How will climate change affect mycotoxins in food?** Food Research International. v.43, p.1902-1914, 2010. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. **Crescimento e produção de aflatoxinas por a *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.** B. CEPPA, 20(1), 2002.

PITT, J. I. **Toxigenic fungi: which are important.** Medical Mycology, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000.

PROIETI, I; FRAZZOLI, C; MANTOVANI, A. **Exploiting nutritional value of staple foods in the world's semi-arid areas. Risks, benefits, challenges and opportunities of sorghum.** Health care. 3:172-93, 2015.

SAMAPUNDO, S; DEVLIEGHERE, F; GEERAERD, A. H; DE MEULENAER .B; VANIMPE, J. F; DEBEVERE, J. **Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn.** Food Microbiol. 24:517---29, 2007

SAMSON, R. A; HOECKSTRA, E. S; FRISVAD, J. C; FILTEMBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi.** 6th ed. Utrecht: Centraalbu-reau voor schimmelcultures; 2000.

SUBBARAO, K.V.; MICHAILIDES, T.J.; MORGAN, D.P. **Effects of osmotic potential and temperature on growth of two pathogens of figs and a biocontrol agent.** Phytopathology, v. 83, n. 12, p. 1454-1459, 1993.

SCHUH, G.; GOTTARDI, R.; FERRARI FILHO, E.; ANTUNES, L.E.G.; DIONELLO, R.G. **Efeitos de dois métodos de secagem sobre a qualidade físico-química de grãos de milho safrinha-RS, armazenados por 6 meses.** Semina: Ciências Agrárias, v.32, p.235-244, 2011.

TÉDIHOU, E.; OLATINWO, R.; HELL, K.; HAU, B.; HOOGENBOOM, G.  
**Effects of variety, cropping system and soil inoculation with *Aspergillus flavus* on aflatoxin levels during storage of maize.** Tropical Plant Pathology, v.37, p.25-36, 2012.