

Incidência de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em grãos de milho em fase experimental de desenvolvimento¹

**Estéfane Santana Santiago¹, Jéssica Paulista dos Santos², Luciano Viana Cota³,
Lauro José Guimarães³, Paulo Evaristo de Oliveira Guimarães³, Dagma Dionísia
da Silva³**

¹Trabalho financiado pela Embrapa, CNPq/Fapemig

¹ Estudante do Ensino Médio, Escola Estadual João Rodrigues da Silva, Bolsista BIC JR do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ Faped

² Estudante do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Faculdade Santo, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ Faped

⁴ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo

Introdução

Os grãos de milho podem ser danificados por fungos em pré-colheita que resultam em podridões de espigas, com a formação de grãos ardidos e, em pós-colheita, durante o beneficiamento, o armazenamento e o transporte, resultando em grãos mofados ou embolorados (PEREIRA FILHO, 2015).

Os grãos mofados são aqueles que apresentam contaminações fúngicas (mofo ou bolor) visíveis a olho nu, independentemente do tamanho da área atingida, bem como os grãos ou pedaços de grãos que apresentam coloração esverdeada ou azulada no germe, produzida pela presença de fungos (BRASIL, 2011). Em milho, os principais patógenos que causam grãos mofados pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (PINTO, 2006).

Além dos prejuízos econômicos por causa da perda na qualidade (descolorações dos grãos, reduções nos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais) e na produtividade, durante o processo de colonização dos grãos, muitas espécies de fungos, denominados toxigênicos, podem sintetizar substâncias tóxicas denominadas micotoxinas. As micotoxinas são responsáveis por diversos danos à saúde animal e humana, sendo relacionadas a alguns tipos de câncer. Entre as espécies que causam grãos mofados em milho, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* são produtoras de aflatoxinas e *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., a ocratoxina A (PEREIRA FILHO, 2015).

A principal estratégia de manejo desses fungos é a resistência genética, de forma que o conhecimento prévio da reação de cultivares a esses patógenos é necessário para que haja o registro e a liberação para uso dos genótipos de forma segura. Assim, o

objetivo deste trabalho foi quantificar a incidência de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. em grãos de milho em fase experimental de desenvolvimento.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, na safra 2014/15. No plantio, foram aplicados 500 kg de 08-28-16 e em cobertura com 350 kg de 20-00-20. As parcelas foram constituídas por genótipos experimentais e comerciais (testemunhas) semeados em duas linhas de 4,2 m de comprimento e 0,8 m entre linhas. As amostragens foram realizadas em três ensaios, um Elite (ensaio para avaliação do potencial genético de cultivares em vias de lançamento comercial) constituído por 36 genótipos e dois ensaios Intermediários (ensaio para seleção de genótipos que apresentam potencial genético para avanço no programa de melhoramento), constituídos por 64 genótipos, totalizando 328 amostras. Os experimentos foram conduzidos em látice simples 6x6 (Elite) e 8x8 (Intermediários A e B) com duas repetições.

Após a colheita, os grãos foram homogeneizados e 0,5 kg foi enviado ao Laboratório de Sanidade de Grãos para determinação da incidência dos fungos.

Os grãos assintomáticos e os ardidos foram separados visualmente, sendo considerados ardidos os grãos que apresentam descoloração em no mínimo 25% de sua superfície (o matiz pode variar de marrom-claro a roxo, ou de vermelho-claro a vermelho-intenso).

Para quantificação de fungos causadores de mofo, foram avaliados 100 grãos assintomáticos (aparentemente sadios) e todos os grãos ardidos identificados em cada parcela. A metodologia utilizada foi a incubação em papel de filtro com congelamento, denominada “Blotter Test” (MACHADO, 1988). Os grãos foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 2%, por 5 minutos, e distribuídos em caixas tipo “gerbox” contendo duas folhas de papel de filtro estéril e embebido em ágar-ágar 5%. As caixas foram mantidas sob luz contínua e temperatura ambiente por 24h para estimular o início do processo germinativo, e, passado esse período, foram incubadas a 20 °C por 24h para cessar o processo de germinação e evitar a contaminação cruzada entre os grãos. Para o crescimento dos fungos, as amostras foram incubadas em câmaras de crescimento sob temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12h por 10 dias. Após este período, os

grãos foram avaliados individualmente com auxílio de microscópio estereoscópio para identificação e quantificação de patógenos, por meio da morfologia. Os fungos foram identificados em nível de gênero.

A porcentagem de grãos ardidos foi calculada pela relação: (peso dos grãos ardidos/peso total da amostra) x 100. A incidência de cada fungo foi calculada pela relação: (número de colônias do fungo/número total de grãos ardidos ou assintomáticos) *100. Para grãos ardidos foi considerado o total de grãos ardidos na amostra e para grãos assintomáticos foram considerados os 100 grãos de cada amostra. A média final de incidência dos fungos, de duas repetições, foi então calculada pela soma das porcentagens encontradas nos grãos ardidos e assintomáticos.

Resultados e Discussão

A incidência de grãos ardidos foi acima da média aceita pela agroindústria, 6%, para seis genótipos do ensaio Elite, 1L1414 (6,6%), 1M1760 (12,7%), 1M1810 (6,8%), 1M1822 (11,8%), AG8088 PROX (23,7%) e M20A78HX (6,5%), dezenove no ensaio Intermediário A 1F640 (15,1%), 1L1457 (6,2%), 1M1821 (16,1%), 1N1875 (6,6%), 1N1880 (6,9%), 1N1882 (6,4%), 1N1884 (6,6%), 1N1885 (11,2%), 1N1886 (13,1%), 1N1892 (8,0%), 1N1895 (7,2%), 1N1900 (7,5%), 1N1901 (6,4%), 1N1902 (8,9%), 1N1903 (6,4%), 1N1905 (8,5%), 1N1906 (9,5%), 1N1908 (7,7%) e BRS 3040 (6,5%) e dezoito genótipos do ensaio Intermediário B, 1J1203 (6,9%), 1M1824 (6,4%), 1M1925 (15,1%), 1M1928 (6,2%), 1M1930 (16,1%), 1M1932 (6,6%), 1M1936 (6,6%), 1M1937 (11,2%), 1M1938 (13,1%), 1M1943 (8,0%), 1M1946 (7,2%), 1M1950 (6,4%), 1M1951 (6,4%), 1M1953 (9,5%), 1M1955 (7,7%), 1M1958 (6,5%), 1M1975 (6,5%) e 1M2078HX (8,5%) (Tabela 1).

No ensaio Elite, vinte e nove genótipos apresentaram incidência de *Penicillium* spp. abaixo de 6% e os demais (1L1414, 1L1467, 1L477, 1M1716, 1M718 e 1M1757 e 1M1732) acima, sendo 1L1414 o genótipo que apresentou a maior incidência, 18%. No ensaio Intermediário A, dezenove genótipos apresentaram nível de incidência abaixo de 6%, os demais variaram entre 6% e 56,6% (1M1794). No experimento Intermediário B, trinta e quatro genótipos apresentaram incidência abaixo de 6%, os demais variaram entre 6% e 14,8% (1N1976) (Tabela 1.).

Para *Aspergillus* spp. no ensaio Elite, somente 1L1414 apresentou 0,5% de incidência, os demais genótipos tiveram 0% desse fungo. No ensaio intermediário A os seis genótipos apresentaram incidência acima de 9%, 1F640, 1M1794, 1N1876, 1N1889, 1N1898 e 1N1917, os demais tiveram incidência variando entre 0 e 5,5%. No ensaio Intermediário B, a incidência foi baixa para todos os genótipos, com nível máximo 1% (Tabela 1.).

A incidência dos fungos avaliados nem sempre coincide com a de grãos ardidos, o que ocorre por causa da colonização por outras espécies de fungos que causam grãos ardidos, como *Fusarium* e *Stenocarpella*.

Embora o milho seja contaminado por esses fungos no campo, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados fungos que possuem capacidade de colonizar substratos com baixo teor de umidade (MARIN et al., 1998; MARQUES et al., 2009). A capacidade de colonização e dispersão desses patógenos é alta e mesmo estando em baixa incidência nas amostras de campo, sua importância pode aumentar em condições de armazenamento inadequadas, com a qualidade dos grãos alterada por quebra e danos por insetos (RADÜNZ et al., 2006; TANAKA et al., 2001).

Para os genótipos que apresentaram maior incidência de *Penicillium* e *Aspergillus* é recomendada análise de aflatoxinas e ocratoxinas para que se avalie a reação desses genótipos quanto a síntese dessas micotoxinas e seus riscos para a segurança alimentar de animais e seres humanos. Tal ação se justifica, pois a pressão por produtos mais saudáveis tem aumentado na sociedade, inclusive com a formulação de legislações mais severas, e a incidência de fungos que reduzem a qualidade de grãos e produzem micotoxinas está entre essas preocupações. Assim, a busca por resistência genética, associada a estratégias de manejo que reduzam a contaminação de alimentos, deve ser priorizada.

Conclusão

A incidência de grãos ardidos variou entre os genótipos nos três ensaios, havendo várias opções com potencial de resistência genética aos fungos produtores de grãos ardidos.

A incidência de *Aspergillus* spp. foi baixa em todos os experimentos, com exceção dos genótipos 1F640, 1M1794, 1N1876, 1N1889, 1N1898 e 1N1917, que apresentaram incidência acima de 9%, no experimento Intermediário A.

A incidência de *Penicillium* spp. foi maior e variou entre os genótipos dos três experimentos. A maior incidência foi observada em genótipos do ensaio Intermediário A, chegando a uma porcentagem acima de 56%.

Tabela 1: Incidência de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. em grãos de milho experimentais do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, safra 2014/15. Sete Lagoas-MG.

Elite				Intermediário A				Intermediário B			
Genótipos	Total grãos arídios (%)	<i>Penicillium</i> ssp.(%)	<i>Aspergillus</i> ssp.(%)	Genótipos	Total grãos arídios (%)	<i>Penicillium</i> ssp.(%)	<i>Aspergillus</i> ssp.(%)	Genótipos	Total grãos arídios (%)	<i>Penicillium</i> ssp.(%)	<i>Aspergillus</i> ssp.(%)
1K1251	3,8	1,0	0,0	1F640	15,1	13,5	11,2	1J1203	6,9	4,0	0,0
1K1285	3,5	2,6	0,0	1I962	4,8	8,5	1,5	1L1452	0,3	1,5	0,0
1K1294	1,4	1,5	0,0	1K1306	1,5	4,5	0,0	1M1819	5,8	1,5	0,0
1K1301	1,4	3,6	0,0	1L1457	6,2	1,5	0,0	1M1824	6,4	6,0	0,0
1L1411	0,7	2,5	0,0	1M1794	3,4	56,6	12,5	1N1925	15,1	4,5	0,0
1L1414	6,6	18,0	0,5	1M1821	16,1	6,5	0,0	1N1926	4,8	6,0	0,0
1L1421	2,0	3,0	0,0	1N1874	3,6	15,0	1,5	1N1927	1,5	5,5	0,0
1L1467	0,1	17,0	0,0	1N1875	6,6	13,5	0,5	1N1928	6,2	s/inf	s/inf
1L1477	2,9	9,0	0,0	1N1876	4,8	15,5	3,4	1N1929	3,4	10,1	0,0
1L1484	3,4	0,0	0,0	1N1877	1,2	8,0	0,0	1N1930	16,1	8,5	0,0
1L1487	4,8	0,5	0,0	1N1878	2,1	13,9	1,0	1N1931	3,6	s/inf	s/inf
1L1500	3,6	1,0	0,0	1N1879	0,3	11,5	0,0	1N1932	6,6	5,0	0,0
1M1716	1,6	13,3	0,0	1N1880	6,9	28,5	2,0	1N1933	4,8	2,0	0,0
1M1718	0,7	8,0	0,0	1N1881	5,8	17,0	0,0	1N1934	1,2	4,0	1,0
1M1731	0,5	2,0	0,0	1N1882	6,4	41,0	1,0	1N1935	2,1	6,50	0,0
1M1732	0,3	8,7	0,0	1N1883	4,5	22,3	0,0	1N1936	6,6	4,0	1,5
1M1737	5,7	0,5	0,0	1N1884	6,6	5,5	0,0	1N1937	11,2	8,5	0,0
1M1750	2,0	4,5	0,0	1N1885	11,2	6,5	0,0	1N1938	13,1	15,5	0,0
1M1751	5,4	4,5	0,0	1N1886	13,1	5,0	0,5	1N1939	2,5	3,0	0,0
1M1752	3,9	4,5	0,0	1N1887	2,5	8,5	3,5	1N1940	1,4	9,5	0,0
1M1754	3,9	4,5	0,0	1N1888	1,4	0,0	0,0	1N1941	2,7	5,0	0,0
1M1757	0,8	16,7	0,0	1N1889	1,2	4,0	9,5	1N1942	2,7	11,0	0,0
1M1758	0,9	1,5	0,0	1N1890	2,7	1,0	3,0	1N1943	8,0	0,0	0,0
1M1760	12,7	1,5	0,0	1N1891	2,7	14,50	0,0	1N1944	5,6	11,1	0,0
1M1764	1,1	2,8	0,0	1N1892	8,0	8,00	2,1	1N1945	5,1	3,0	0,0
1M1782	2,3	0,5	0,0	1N1893	5,6	3,50	0,5	1N1946	7,2	7,5	0,0
1M1792	0,2	5,5	0,0	1N1894	5,1	2,50	0,0	1N1947	3,5	3,5	0,0
1M1804	2,3	0,5	0,0	1N1895	7,2	14,0	4,0	1N1948	0,8	8,0	0,0
1M1807	3,4	1,0	0,0	1N1896	3,5	16,50	0,0	1N1949	5,5	9,0	0,0
1M1810	6,8	0,0	0,0	1N1897	0,8	26,0	1,5	1N1950	6,4	6,0	0,0
1M1812	1,2	2,0	0,0	1N1898	1,1	17,0	11,0	1N1951	6,4	0,0	0,0
1M1822	11,8	1,5	0,5	1N1899	5,5	2,0	4,5	1N1952	2,6	6,5	0,0
AG 8088											
PROX	23,7	1,5	0,0	1N1900	7,4	5,0	1,0	1N1953	9,5	1,5	0,0
BRS 1055	1,0	0,0	0,0	1N1901	6,4	10,1	0,5	1N1954	3,8	0,5	0,0
DKB 390 PRO	5,0	3,5	0,0	1N1902	8,9	s/inf	s/inf	1N1955	7,7	2,0	0,0
M 20A78 HX	6,5	5,5	0,0	1N1903	6,4	13,0	0,0	1N1956	2,0	5,4	0,0
				1N1904	2,60	7,0	2,5	1N1957	0,1	3,4	0,0
				1N1905	8,5	2,0	1,5	1N1958	6,5	0,0	0,0
				1N1906	9,5	10,5	1,5	1N1959	0,9	3,5	0,5
				1N1907	3,7	8,0	0,0	1N1960	1,5	8,0	0,0
				1N1908	7,7	3,0	0,0	1N1961	1,9	7,0	0,0
				1N1909	2,0	8,8	0,0	1N1962	0,5	5,5	1,0
				1N1910	0,1	6,0	2,0	1N1963	2,3	0,5	0,0
				1N1911	6,5	1,0	3,0	1N1964	3,7	6,0	0,0
				1N1912	0,9	s/inf	s/inf	1N1965	5,5	6,5	0,0
				1N1913	1,5	37,1	2,5	1N1966	0,5	9,0	0,0
				1N1914	1,9	14,6	5,5	1N1967	3,2	4,5	0,0
				1N1915	0,5	12,0	4,0	1N1968	4,6	9,5	0,0
				1N1916	2,3	15,9	2,0	1N1969	6,0	1,5	0,0
				1N1917	3,7	19,5	9,5	1N1970	0,4	2,0	0,0
				1N1918	5,5	18,0	2,5	1N1971	1,5	9,5	0,0
				1N1919	0,5	6,0	5,5	1N1972	0,7	4,5	0,0
				1N1920	3,2	6,0	1,5	1N1973	1,0	4,5	0,5
				1N1921	4,6	6,5	2,0	1N1974	3,1	3,0	0,0
				1N1922	5,8	2,8	3,1	1N1975	6,5	9,6	0,0
				1N1923	0,4	5,5	0,0	1N1976	0,6	14,8	0,0
				1N1924	1,5	4,0	0,5	1N1977	0,3	9,0	0,0

AG 1051	0,7	17,0	4,4	1N1978	1,8	2,5	0,0
AG 8088		s/inf	s/inf	1N1979	3,7	18,5	0,5
PROX	1,0			1N1980	1,9	3,0	0,0
BRS 1055	3,1	12,0	0,0	AG 8088 PROX	1,2	s/inf	s/inf
BRS 3040	6,5	14,0	3,0	BRS 1055	2,9	2,5	0,0
DKB 390 PRO	0,6	3,0	0,0	DKB390PRO	4,5	3,0	0,0
HTMV1	0,3	5,5	1,0	M 20A78 HX	8,5	8,0	0,0
M 20A78 HX	1,8	9,0	0,0				

O número total de grãos ardidos é a soma das duas repetições. Para grãos assintomáticos foram analisados 200 grãos. A porcentagem de fungos se refere à média das duas repetições.

Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 60 de 22 de dezembro, 2011**: estabelece o Regulamento Técnico do Milho. Disponível em: <<http://www legisweb.com.br/legislacao/?id=78895>> Acesso em: 24 jun. 2017.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes**: fundamentos e aplicações. Brasília, DF: Ministério da Educação; Lavras: ESAL: FAEPE, 1988. 107 p.

MARIN, S.; SANCHIS, V.; SAENZ, R.; RAMOS, A. J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Environmental-factors, in-vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 7, p. 831-837, 1998.

MARQUES, O. J.; VIDIGAL FILHO, P. S.; DALPASQUALE, V. A.; SCAPIM, C. A.; L. F.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita e colheita. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009.

PEREIRA FILHO, I. A. (Ed.). **Cultivo do milho**. 9. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2015. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao16_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8666>. Acesso em: 5 fev. 2016.

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

PINTO, N. F. J. de A. **Podridão branca da espiga de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 141).

RADÜNZ, L. L.; DIONELLO, R. G.; ELIAS, M. C.; BARBOSA, F. F. Influência do método de armazenamento na qualidade física e biológica de grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 136-143, 2006.

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