

SELEÇÃO DE MILHO VISANDO À RESISTÊNCIA AO FUNGO

Aspergillus flavus, PRODUTOR DE AFLATOXINA

Marilda Augusta Peres Oliveira¹

Ely Nahas²

Juan Ayala Osuna²

David Ariovaldo Banzatto²

INTRODUÇÃO

A contaminação do amendoim por fungos produtores de aflatoxina é problema largamente estudado devido a sua toxicidade (FONSECA et alii, 1974). Em ordem de importância, o milho também se tem mostrado suscetível à contaminação por aflatoxina, particularmente nos Estados Unidos (McMILLIAN et alii, 1985), bem como em outros países (SINHA, 1987). Contudo, no Brasil, poucos estudos têm sido feitos e, aparentemente, os resultados obtidos mostram que esse problema não tem sido tratado com a devida atenção. PREGNOLATO & SABINO (1969/1970) e EIROA (1978) não encontraram a aflatoxina em nenhuma das amostras de farinha de milho analisadas. Contudo, KUSHALAPPA (1979) verificou que, de 26 isolados do grupo *A. flavus* em amostras de milho e feijão armazenadas, 19 produziram aflatoxina. Altos teores de aflatoxina foram também constatados em arroz, milho, aveia e trigo em análises feitas no período de 1971 a 1979 (SABINO, 1980). Em cultivares de milho Maya Normal, Pajimaca Cubano, Maya Opaco e Nutrimaiz não foram constatados níveis de aflatoxina em nenhuma das amostras (SCUCELL et alii, 1986). Por outro lado, 28 linhagens de milho, estudadas quanto a sua reação à inoculação por *Aspergillus flavus*, apresentaram, em média, 38,4% de colonização externa e 33,8% de colonização interna. Alta correlação foi observada entre a colonização interna e a produção de aflatoxina (COSTA & KUSHALAPPA, 1986). As variedades mais suscetíveis foram:

¹ Ex-aluna do Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

² FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP.

Pipoca Americana, BR 105, Composto Flint 02, BR 108, CMS 30, BR 126, Maya XV, CMS 35 e Centralmex 02, com mais de 50% de colonização. A tendência de favorecer ou inibir a produção de aflatoxina foi demonstrada em extratos protéicos e evidenciou a maior suscetibilidade de algumas variedades de milho (COSTA et alii, 1988). Utilizando-se híbridos duplos XL 605, Ag 401, C-111-S, DINA-100, C. Dentado XV e C. Flint XV, constatou-se o desenvolvimento de colônias de *Aspergillus flavus*, não diferentes do padrão utilizado, o que mostra que os níveis de aflatoxina não comprometeram os materiais utilizados (GUARIGLIA et alii, 1990).

O objetivo deste trabalho foi o de selecionar famílias que apresentassem respostas significativas à resistência ao fungo *A. flavus*, a partir de populações de milho com alta variabilidade genética, representadas pelos genótipos de famílias de meios-irmãos do Composto Dentado de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Na instalação do experimento foram utilizadas 98 famílias de meios-irmãos do Composto Dentado e duas testemunhas, os híbridos comerciais Contimax 113 e Agrocerec 402. As populações provenientes do Departamento de Genética da ESALQ/USP (Piracicaba-SP, Brasil), fazem parte de um programa de obtenção de populações básicas de milho, que vêm sendo melhoradas para o aumento da produtividade de grãos e de resistência às pragas, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal-SP.

O delineamento experimental utilizado foi o látice 10x10 com três repetições ortogonais, com parcelas de 5 m² e espaçamento de 100x40 cm. Após o desbaste, permaneceram 25 plantas por parcela. O milho foi semeado em novembro.

Aos 98 dias do plantio, com o milho no estágio leitoso, foi feita a inoculação do fungo através de inserção de uma faca de enxertia, na região abaxial da espiga (WIDSTROM et alii, 1981), com utilização de uma suspensão de

conídios de *A. flavus* (NRRL 3251, 8×10^7 conídios/ml). O inóculo foi preparado pela raspagem dos conídios de *A. flavus* desenvolvidos em meio de batata-dextrose agar por sete dias a 28°C. Os conídios foram lavados da superfície do meio de cultura com uma solução estéril de Triton X-100 0,01% (p/v).

Após 64 dias da inoculação, as espigas de milho foram colhidas, colocadas em sacos de papel e levadas ao laboratório, onde foram secadas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 70°C, por quatro dias. Após secagem, as espigas foram despalhadas, debulhadas e moídas em moinho. O fubã foi recolhido em sacos plásticos devidamente etiquetados.

Para a extração da aflatoxina, utilizou-se a técnica de SOARES (1978). A quantificação da aflatoxina foi feita em placas ativadas recobertas com silicagel G Merck. As placas foram desenvolvidas com clorofórmio-metanol (97:3, v/v) colocado em cubas não equilibradas. A observação das zonas fluorescentes foi feita sob luz ultravioleta. A concentração de aflatoxina foi determinada pelo método de JONES (1972), com padrão de referência aflatoxina B1. As populações do Composto Dentado foram analisadas estatisticamente utilizando-se médias de parcelas, de acordo com a metodologia descrita por COCHRAN & COX (1957). Os teores de aflatoxina encontrados foram transformados em $\log_e (x+1)$, sendo x a quantidade total de aflatoxina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de aflatoxina observados nas 98 famílias do Composto Dentado, de 98,9 a 3651,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, são comparáveis aos obtidos por McMILLIAN et alii (1985). Esses valores foram agrupados numa distribuição de freqüências (TABELA 1). Do total, 11,2% estão na faixa 0-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que compreende as famílias mais resistentes ao fungo, enquanto que 7,1% incluem as famílias mais sensíveis, com níveis de aflatoxina superiores a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O maior número de famílias está nas faixas de 500-1000 e 1000-1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, 37,8 e 33,7%. A variabilidade de produção de aflatoxi-

na pelas famílias do Composto Dentado pode ser mais bem avaliada quando comparada com os híbridos comerciais, com teores médios de aflatoxina de 1103,3 e 970,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

TABELA 1. Distribuição de frequências dos níveis de aflatoxina em grãos de milho das 98 famílias de meios-irmãos do Composto Dentado.

Aflatoxina ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Frequência	
	Absoluta (Número)	Relativa
0- 500	11	11,2%
500-1000	37	37,8%
1000-1500	33	33,7%
1500-2000	10	10,2%
2000-2500	4	4,1%
2500-3000	1	1,0%
3000-3500	1	1,0%
3500-4000	1	1,0%

A produção de aflatoxina na família mais suscetível foi aproximadamente 37 vezes maior que a da mais resistente. Embora com esta amplitude de variação os resultados de análise estatística (**TABELA 2**) mostraram significância entre os diferentes tratamentos apenas ao nível de 17% de probabilidade (nível mínimo de significância de 0,1642), provavelmente pelos motivos relacionados ao procedimento de amostragem (WIDSTROM et alii, 1978) ou pela insuficiência do número de repetições utilizado.

A variação observada pode ser devida à característica dos genótipos estudados, relativa à natureza química dos endospermas. Dessa forma, altos níveis de amilose no ger-

moplasma do milho aumentariam significativamente a resistência à formação de aflatoxina (McMILLIAN et alii, 1981).

TABELA 2. Análise de variância do látice triplo 10 × 10 com as 98 famílias de meios-irmãos do Composto Dentado e de dois híbridos comerciais, referente ao teor de aflatoxina ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Dados transformados em $\log_e(x+1)$.

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios
Repetições	2	0,0344
Blocos dentro de Repetições	27	0,6679
Tratamentos (ajustados)	99	0,9249 ^{1/}
Resíduo	171	0,7796
Média = 6,62; CV = 13,8%; Eficiência = 108,5%		
Variância genética aditiva		$9,29 \times 10^{-4}$
Herdabilidade		15,71%
CV genético		3,32%

^{1/} Significativo ao nível de 17%.

Além do mais, como se observa na **TABELA 2**, a variância genética aditiva, de $9,29 \times 10^{-4}$, e a herdabilidade estimada, de 15,71%, mostraram que diferentes condições do ambiente podem ter favorecido o crescimento do fungo no milho, o que corrobora McMILLIAN et alii (1985). Então, é possível que as variações de temperatura, umidade e pluviosidade tenham concorrido para o crescimento do fungo, porquanto índices mensais (dados não incluídos) de 23,0-25,6°C de temperatura média; 64,5-84,3% de umidade relativa média e 98,3-314,8 mm de precipitação total ocorreram durante o período em que transcorreu o ensaio.

CONCLUSÕES

O ensaio permitiu selecionar 11 famílias que apresentaram valores baixos de contaminação (TABELA 1) e que estão sendo utilizadas para obtenção de nova população de milho com elevada resistência à contaminação do fungo. Os resultados obtidos sugerem a existência de diferentes susceptibilidades do milho à infecção pelo *A. flavus* com a conseqüente produção de aflatoxina, e também diferenças na resistência das famílias estudadas ao fungo.

RESUMO

A produção de aflatoxina em uma população constituída de 98 famílias de meios-irmãos do Composto Dentado de milho (*Zea mays* L.) e dos híbridos comerciais Contimax 133 e Agroceres 402, inoculada com o fungo *Aspergillus flavus*, variou de 98,9 a 3651,3 µg/kg. Essa variação pode ser, provavelmente, devida às características genotípicas das populações ensaiadas. Do total de famílias, 11,2% produziram menos de 500 µg/kg, o que possibilita sua utilização em um programa de melhoramento que visa à resistência ao fungo. A herdabilidade estimada, de 15,71%, e a variância genética aditiva, de $9,29 \times 10^{-4}$, mostraram que condições do ambiente podem ter predisposto o crescimento do fungo.

Palavras-chave: Aflatoxina, *Aspergillus flavus*, milho, seleção.

SUMMARY

SELECTION OF MAIZE FOR RESISTENCE TO THE FUNGUS *Aspergillus flavus*, AFLATOXIN PRODUCER

In a population of 98 half-sib families of the Dent Composite maize (*Zea mays* L.) and marketable hybrids Contimax 133 and Agroceres 402, inoculated with the *Aspergillus flavus* fungi, the production of aflatoxin varied from 98.9 to 3651.3 µg/kg. This variation is probably due to the genotypic characteristics of populations under trial.

From the total families, 11.2% produced less than 500 µg/kg, enabling their utilization in a maize breeding program which aims fungal resistance. The estimated heritability of 15.71% and the genetic additive variance of $9,29 \times 10^{-4}$ showed that the environmental factors may have predisposed the fungi growth.

Key words: Aflatoxin, *Aspergillus flavus*, maize, selection.

LITERATURA CITADA

- COCHRAN, W.G. & G.M. COX, 1957. **Experimental Designs**. New York, John Wiley. 611p.
- COSTA, J.L. & A.C. KUSHALAPPA, 1988. Efeito de Extratos Protéicos de Milho Sobre a Produção de Aflatoxina B. **Rev. Microbiol.**, 19(1): 67-70.
- COSTA, J.L. & A.C. KUSHALAPPA, 1986. Reação de Variedades de Milho à Infecção por *Aspergillus flavus* em Placas de Petri. **Fitopatol. Bras.**, 11: 769-775.
- EIROA, M.N.U., 1979. Micotoxinas e Micotoxicoses. **Bol. ITAL**, 16: 355-411.
- FONSECA, H. et alii, 1974. Espécies de *Aspergillus* Produtoras de Aflatoxina, na Região Araraquarense, SP. **Anais E.S.A. Luiz de Queiroz**, 31: 519-536.
- GUARIGLIA, C.S.T.; J. AYALA-OSUNA; S.M.C. ARAÚJO; E. NAHAS, 1990. Avaliação dos Danos Causados pela *Heliothis zea* (Boddie, 1850) Associados a *Aspergillus flavus* em Milho. **Científica**, 18(2): 35-43.
- JONES, B.D., 1972. **Methods of Aflatoxin Analysis**. London, TPI. G 70. 58p.
- KUSHALAPPA, A.C., 1979. Aflatoxin-Producing Fungi of *Aspergillus flavus* Group in Stored Corn and Beans in Farms of Minas Gerais State. **Fitopatol. Bras.**, 4: 391-395.
- McMILLIAN, W.W.; D.M. WILSON & N.W. WIDSTROM, 1985. Aflatoxin Contamination of Preharvest Corn in Georgia: A Six-Year Study of Insect Damage and Visible, *Aspergillus flavus*. **J. Environ. Qual.**, 14(2): 200-202.
- McMILLIAN, W.W.; N.W. WIDSTROM & D.M. WILSON, 1981. Rearing the Maize Weevil on Maize Genotypes When Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* Isolates Were Present. **Environ. Entomol.**, 10(5): 760-762.

- PREGNOLATO, W. & M. SABINO, 1969/70. Pesquisa e Dosagem da Aflatoxina em Amendoim e Derivados e em Outros Cereais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 29/30: 65-71.
- SABINO, M., 1980. Variações de Níveis de Aflatoxina B1 em Alimentos e Rações Animais no Período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40: 153-158.
- SCUSSEL, V.M.; D.B. RODRIGUEZ-AMAYA & W.J. da SILVA, 1986. Incidência de Aflatoxinas em Milho (*Zea mays* L.) e em Seus Produtos Derivados, Comercializados na Região de Campinas, SP, Brasil. *Ciê. Tecnol. Aliment.*, 6 (1): 75-80.
- SINHA, K.K., 1987. Aflatoxin Contamination of Maize in Flooded Areas of Bhagalpur. *Indian Appl. Environ. Microbiol.*, 53(6): 1391-1393.
- SOARES, L.M.V., 1987. Micotoxinas: Um Método para Análise Simultânea e Incidência em Alimentos Comercializados na Região de Campinas. (Doutorado - UNICAMP). 129p.
- WIDSTROM, W.N.; D.M. WILSON & W.W. McMILLIAN, 1981. Aflatoxin Contamination of Preharvest Corn as Influenced by Timing and Method of Inoculation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(2): 249-251.