

## **Manutenção laboratorial na produção de fumonisina por *Fusarium verticillioides* isolado de intoxicação animal**

### **Laboratory maintenance in fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from animal intoxication**

*Luciana Pereira Bernd<sup>1</sup>, Angélica Tieme Ishikawa<sup>1</sup>, Thiago Montagner Souza<sup>1</sup>, Antônio Carlos Gerage<sup>2</sup>, Elisabete Yurie Sataque Ono<sup>3</sup>; Elisa Yoko Hirooka<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CCA – UEL, Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup>Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR, Londrina, PR, Brasil.

<sup>3</sup>Depto. de Bioquímica e Biotecnologia – CCE - UEL, Londrina, PR, Brasil.

#### **Endereço para correspondência**

Luciana Pereira Bernd

Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ CCA/ UEL, Londrina/PR. Cx. Postal: 6001, CEP: 86051-980, Londrina, PR - Telefone: (54) 81275033

e-mail: lucianabernd@hotmail.com

#### **Resumo**

Fumonisinhas produzidas por *Fusarium verticillioides*, patógeno primário de milho, desencadeiam patologias em humanos e animais. O trabalho teve como objetivo avaliar a toxigenicidade (produção de fumonisinas) em cinco cepas de *F. verticillioides* (103F, 113F, 119B, 119BR e 97K) submetidas a constantes repicagens desde o isolamento, com data de estocagem pós-repique entre 1991 e 2007. Os sub-cultivos (20 cepas) foram reativadas no meio ágar batata dextrose e a toxigenicidade avaliada em substrato milho incubando-se a 25 °C por 15 dias. No decorrer destes anos de repicagem-estocagem, *F. verticillioides* testadas mantiveram produção de níveis detectáveis de fumonisina, sendo que 90 % das cepas produziram FB<sub>1</sub> (0,28 a 2610,6 µg g<sup>-1</sup>) e 85 %, de FB<sub>2</sub> (0,03 a 781,1 µg g<sup>-1</sup>); duas cepas apresentaram-se negativas perante produção de fumonisinas. Não obstante, o decréscimo drástico na toxigenicidade das cepas sugere o efeito de repicagens aliado à estocagem das cepas na expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários, indicando a necessidade de avaliar as características das culturas antes de proceder qualquer ensaio experimental toxicológico.

**Palavras-chave:** Fumonisinhas, *Fusarium verticillioides*, cepas, milho

### Abstract

Fumonisin is produced by *F. verticillioides* is responsible for causing diseases in humans and animals. The study aimed to evaluate the total production of fumonisins (FB<sub>t</sub>) in 5 strains of *F. verticillioides* (103F, 113F, 119B, 119BR e 97K), which had constants subcultured from 1991 to 2007. Subcultures were growth in potato dextrose agar and toxigenicity evaluated in corn substrate incubating at 25 °C during 15 days. Found N.D.- 1259,1 µg g<sup>-1</sup> and N.D. - 514,02 µg g<sup>-1</sup> range of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, respectively; two strains lost the capacity to produce fumonisin. The great difference found in the toxin production by different strains may be related to mutations due to long storage time and the constant plating. Evaluate strains characteristics is necessary to experimental toxicological tests.

**Keywords:** Fumonisin, *Fusarium verticillioides*, strains, corn

## INTRODUÇÃO

Conservação da viabilidade e das características morfológicas e fisiológicas é um requisito fundamental na preservação de micro-organismo. Os fungos filamentosos em cultivo sob constante repicagem apresentam uma elevada tendência para a mudança espontânea, seja morfológica (setorização, por exemplo) ou fisiológica (produção de metabólitos secundários), provavelmente relacionada às condições de cultura, aliado ao número de gerações<sup>(33)</sup>.

Inúmeros métodos disponíveis para a conservação microbiana dependem da natureza do organismo e sua futura utilização<sup>(31)</sup>. Os critérios para a escolha do método de conservação de uma coleção fúngica dependem da estrutura e recursos disponibilizados pelo laboratório, como também de uma avaliação prévia dos micro-organismos de interesse, uma vez que estes apresentam diferentes comportamentos frente aos diversos meios de preservação. Dentre os métodos de conservação, citam-se os repiques sucessivos em meio de cultura para manter a viabilidade celular. Todavia, as múltiplas transferências afetam a integridade genética original e, muitas características podem ser modificadas ou perdidas por mutação<sup>(4)</sup>.

Tradicionalmente, a avaliação rotineira de cultura fúngica em estoque envolve estimativa da viabilidade, observação das características morfológicas e fisiológicas, com atenção especial à manutenção da toxigenicidade, devido à importância em pesquisas referentes à segurança alimentar. Entre os fungos micotoxigênicos da cadeia produtiva de milho, *Fusarium verticillioides* destaca-se na pós-colheita nas imediações da fase de pré-secagem, por gerar perdas no rendimento, valor nutricional, além de qualidade fitossanitária devido a produção de fumonisinas<sup>(24)</sup>.

A infecção por *Fusarium* spp. em milho e a contaminação por fumonisinas são influenciadas por diferentes parâmetros, incluindo condições ambientais (clima, temperatura, umidade), ataque por insetos e manipulação do produto pré e pós-colheita<sup>(37: 9)</sup>.

Fumonisin produzidas por *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai* e *Alternaria* spp. são toxinas de caráter polar com fórmula empírica de C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>, contendo diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxiicosano<sup>(6)</sup>. Os 28 análogos de fumonisinas isolados e caracterizados enquadram-se em categorias A, B, C e P, sendo que o análogo B (FB) compreende as três fumonisinas de importância toxicológica (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>). A FB<sub>1</sub> corresponde a 70 a 80 %, FB<sub>2</sub> de 15 a 25 % e FB<sub>3</sub> de 3 a 8 % do total de fumonisinas produzidas em milho, arroz ou meio líquido<sup>(30)</sup>. A fumonisina é classificada no grupo 2B, i.e. possíveis carcinógenas ao homem pela *Internacional Agency for Research on Cancer*<sup>(17)</sup> e, tem sido relacionada a provável câncer esofágico em Transkei (África do Sul), China e norte da Itália

<sup>(10)</sup>. Na patologia animal, a fumonisina tem sido responsável pela leucoencefalomalácia equina <sup>(36)</sup>, edema pulmonar suína, hepatocarcinogenicidade e hepatotoxicidade em rato <sup>(13)</sup>, carcinogenicidade em roedores <sup>(40)</sup>, redução da viabilidade e atividade fagocítica de macrófagos em galinha <sup>(8)</sup>.

O presente estudo analisou a produção de fumonisina (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>) em cinco cepas de *F. verticillioides* isoladas em 1991 de ração animal, submetidos a sucessivos subcultivos, com diferentes datas de reativação para nova estocagem até o ano de 2007.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Substrato*

O substrato utilizado para avaliar a toxigenicidade consistiu de milho híbrido simples P30F53 (Pioneer<sup>®</sup>), pertencente à safra 2007, disponibilizado pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR-PR).

### *Fusarium verticillioides*

*F. verticillioides* cepas 97K (1 cepa), 103F (14 cepas), 113F (3 cepas), 119B (1 cepa) e 119BR (1 cepa) com datas de repique entre 1991 a 2007, pertencentes à coleção de cepas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Universidade Estadual de Londrina - UEL), foram originalmente isoladas de rações envolvidas em surtos de intoxicação animal no ano de 1991 no Estado do Paraná.

### *Procedimento operacional*

As cepas de *F. verticillioides* foram isoladas de rações animais em 1991, empregando ágar peptona pentacloronitrobenzeno (PPA, <sup>25</sup>), ágar peptona dichloran cloranfenicol (DCPA, <sup>3</sup>) e PCNB 2-amino butano (PAB, <sup>19</sup>). Volume de 0,5 mL da suspensão de ração diluída em água peptonada 0,1 % ( $10^{-1}$  to  $10^{-4}$ ) foi plaqueada na superfície de ágar em duplicata e, 5 a 10 colônias representativas de *Fusarium* sp. em cada plaqueamento foram transferidas para tubo contendo ágar batata dextrose inclinado, para proceder cultura monoespórica. A cepa oriunda da cultura monoespórica foi inoculada em *carnation leaf* ágar - CLA <sup>(12)</sup>, selecionando-se 42 cepas para prosseguir com identificação microscópica <sup>(26)</sup>. A toxigenicidade de cepa foi avaliada imediatamente inoculando-se  $10^6$  propágulos mL<sup>-1</sup> em placa de Petri (90 x 20 mm) contendo 10 g de milho triturado e 10 mL de água destilada, submetidos a duas autoclavagens (121 °C/30 min). As culturas foram incubadas a 25 °C por duas semanas e a fumonisina quantificada por CLAE. Ao longo dos anos seguintes, as mesmas cepas reativadas-repicadas permaneceram a 4 °C no meio água batata dextrose. Dezenove destes sub-cultivos foram ativados em 2007 em ágar batata dextrose inclinado a 25 °C por 15 dias e, a produção de fumonisina avaliada conforme efetuado no ano de 1991, exceto que procedeu-se o cultivo em frasco erlenmeyer de 100 mL.

### *Determinação de Fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

A determinação de fumonisinas foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia descrita por <sup>(34)</sup>, modificada por <sup>(39)</sup>. Para extração, um volume de 30 mL de metanol: água (3:1, v:v) foi adicionada a 10 g de amostra triturada (50 mesh), seguida de agitação 150 r.p.m. por 1 hora a 10 °C (incubadora refrigerada Marconi<sup>®</sup>). Após filtração, foi aplicado 1 mL do extrato bruto em coluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda, Irlanda) previamente acondicionada com 5 mL de

metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v:v). Posteriormente, foi aplicado 6 mL de metanol:água (3:1, v:v), seguido de 3 mL de metanol. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de solução ácido acético 0,5 % em metanol e o eluato seco a 40 °C. O resíduo foi ressuspensão em 2 mL de metanol:água (3:1, v:v), seco sob gás N<sub>2</sub> a 40 °C e novamente ressuspensão em 800 µL de metanol:água (3:1, v:v). Uma alíquota de 200 µL foi transferida para tubo e seca em gás N<sub>2</sub> a 40 °C. Os tubos com 200 µL secos foram ressuspensos em 100 µL de acetonitrila:água (1:1), derivatizado com 200 µL de o-ftaldialdeído (40 mg OPA, 1 mL metanol, 5 mL 0,1M borato de sódio e 50 µL 2-mercaptoetanol) e as injeções foram feitas dentro de 1 min em CLAE. Fumonisinas foram analisadas em sistema isocrático de fase reversa C<sub>18</sub> por CLAE (bomba LC-10 AD e detector de fluorescência RF 535, Shimadzu, Japão), usando coluna Luna 5 µ (4,6 x 250 mm; Phenomenex<sup>®</sup>, EUA). Foi utilizado comprimento de onda de 335 nm e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio (CH<sub>3</sub>OH:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,1 M (80:20, v:v) ajustado com ácido o-fosfórico a pH 3,3, fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O limite de detecção de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foi 27,5 e 35,3 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

## RESULTADOS

A tabela 1 mostra o nível de fumonisina produzida no substrato milho por 42 cepas de *F. verticillioides* monoesporadas de ração envolvida em intoxicação animal, no estágio de recém-isolamento em 1991. O elevado nível produzido atingiu faixas de 9,32 a 54,21 mg g<sup>-1</sup> de FB<sub>1</sub> e 3,88 a 34,92 mg g<sup>-1</sup> de FB<sub>2</sub>, com ênfase à cepa 113F, com 89,13 mg g<sup>-1</sup> de fumonisina total.

Procedendo a análise de toxigenicidade, no ano de 2007, em 20 cepas de *F. verticillioides* originalmente isoladas em 1991 e mantidas sob sucessivos subcultivos, 90 % das cepas produziram níveis detectáveis de FB<sub>1</sub> (0,28 a 2610,6 µg g<sup>-1</sup>) e 85 %, de FB<sub>2</sub> (0,03 a 781,1 µg g<sup>-1</sup>), porém duas cepas perderam a capacidade de produção (tabela 2). Conseqüentemente, no decorrer de dezesseis anos de sucessivas repicagens, as cepas de *F. verticillioides* que mantiveram maior toxigenicidade (> 1000 µg g<sup>-1</sup>) foram a 103F (codificação 9 e 14), 119BR (codificação 18), 97K (codificação 20), com produção de fumonisina total (FB<sub>total</sub>) de 1662,73; 3391,72; 1000,43 e 1685,19 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 2). As cepas 113F e 119B (codificação 15, 16, 17 e 19) reduziram a capacidade de produção de fumonisinas, atingindo a faixa de não detectável (N.D.) a 0,34 µg g<sup>-1</sup>.

FB<sub>total</sub> analisada em 2007 apresentou decréscimo de 96,3 %, 92,4 %, 96,8 % e 95,4 % nas cepas codificadas 9, 14, 18 e 20, respectivamente, em relação a mesmas cepas em 1991 (tabela 2).

**Tabela 1.** Produção de fumonisina em cepas monoesporadas de *F. verticillioides* recém-isoladas de rações envolvidas em intoxicação animal, 1991

Intoxicação animal	Ração		<i>F. verticillioides</i>			
			Cepas	Fumonisinas (mg g <sup>-1</sup> )		
				FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>total</sub>
Cavalo	Espiga de milho	97	97H	33,13	14,24	47,37
			97I	35,82	13,36	49,18
			97J	34,47	9,87	44,34
			97K	25,76	11,03	36,79
			97L	31,47	13,50	44,97
Cavalo	Resíduo de milho	103	103A	32,31	10,07	42,38
			103F	33,04	11,58	44,62
			103G	31,83	9,14	40,97
			103H	28,21	9,07	37,28
			103BR	23,48	5,00	28,48
Cavalo	Resíduo de milho	104	104B	27,55	10,37	37,92
			104D	21,55	8,72	30,27
			104E	20,89	8,09	28,98
			104Ga	22,40	9,17	31,57
			104Gb	23,15	9,18	32,33
Cavalo	Resíduo de milho	113	113B	29,49	9,71	39,20
			113E	26,8	9,70	36,50
			113F	54,21	34,92	89,13
			113G	22,17	8,22	30,39
			113BR	19,53	6,46	25,99
Aves	Milho	118	118A	39,11	17,49	56,60
			118C	36,11	9,60	45,71
			118D	25,72	9,35	35,07
			118F	37,93	15,86	53,79
			118BR	9,32	3,88	13,20
Aves	Ração mista	119	119B	23,53	10,20	33,73
			119C	26,63	9,19	35,82
			119E	39,67	8,27	47,94
			119Fa	37,19	11,60	48,79
			119Fb	32,08	5,13	37,21
Aves	Milho	162	119BR	24,52	6,63	31,15
			162A	34,82	11,39	46,21
			162B	34,95	13,24	48,19
			162C	32,64	10,50	43,14
			162D	35,20	11,80	47,00
			162E	35,81	11,68	47,49
Aves	Ração mista	164	162BR	23,24	4,32	27,56
			164A	34,14	11,40	45,54
			164B	26,98	10,0	36,98
			164E	27,26	9,62	36,88
			164G	15,5	4,14	19,64
			164H	12,09	5,84	17,93

**Tabela 2.** Redução da toxigenicidade em *F. verticillioides* submetidas a repiques-estocagem a 4 °C até 2007 em relação a mesmas cepas recém-isoladas em 1991

<i>F. verticillioides</i>			Ano 2007			% redução (1991-2007)
Cepas	Ano 1991 FB <sub>total</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Código	Fumonisinias ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			
			FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>total</sub>	
103F	44620,00	1	80,76	19,83	100,59	99,8
		2	32,77	11,25	44,02	99,9
		3	495,79	106,80	602,59	98,6
		4	351,73	95,52	447,25	99,0
		5	38,37	7,90	46,27	99,9
		6	145,74	57,70	203,44	99,5
		7	463,17	155,10	618,27	98,6
		8	468,06	141,25	609,31	98,6
		9	1.259,1	403,63	1.662,73	96,3
		10	298,71	73,98	372,69	99,3
		11	435,44	115,87	551,31	98,8
		12	330,44	103,22	433,66	99,0
		13	7,35	3,47	10,85	99,9
		14	2610,65	781,07	3391,72	92,4
113F	89130,00	15	0,28	0,03	0,31	100,0
		16	0,34	N.D.	0,34	100,0
		17	N.D.	N.D.	N.D.	100,0
119BR	31150,00	18	748,08	252,35	1.000,43	96,8
119B	33730,00	19	N.D.	N.D.	N.D.	100,0
97K	36790,00	20	1.171,17	514,02	1.685,19	95,4

N.D. = não detectável, isto é, abaixo do limite de detecção do método para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, 27,5 e 35,3 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

## DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra alta toxigenicidade das cepas de *F. verticillioides* recém-isoladas de alimentação envolvidas em intoxicação, atingindo concentração em nível de mg de fumonisina. Salienta-se a preocupante alta toxigenicidade em isolados obtidos de região maior produtora de milho brasileiro, com nítida superioridade aos dados de <sup>(23)</sup>, que avaliando a produção de fumonisinas em cepas de *Fusarium*, detectaram níveis de 307,0 a 4425,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ . <sup>(2)</sup>, estudando 66 amostras de três híbridos de milho recém-colhidos, provenientes de três regiões do Estado de São Paulo - Brasil (Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto), detectaram fumonisina em todos os 40 isolados de *F.*

*verticillioides*, variando de 20 a 2168 mg g<sup>-1</sup> (FB<sub>1</sub>) e 10 a 380 mg g<sup>-1</sup> (FB<sub>2</sub>). Em condição laboratorial, a alta concentração de fumonsina pode ser atingida em grãos de milho estéreis sob alta umidade inoculada com *F. verticillioides*, sendo também dependente de cepa empregada <sup>(27)</sup>.

Após o isolamento de *F. verticillioides* em 1991, a cepa 113F foi selecionada como padrão de toxigenicidade para estudos subsequentes <sup>(7)</sup>. No entanto, as sucessivas repicagens-estocagem sob refrigeração em substrato não usualmente envolvido em intoxicação (meio agar batata dextrose) provavelmente afetaram a toxigenicidade de cepas. A Tabela 2 evidenciou que as cinco cepas de *F. verticillioides* isoladas em 1991 (103F, 113F, 119BR, 119B e 97K) reduziram drasticamente a produção de fumonisina em 2007, mesmo mantidas sob mesmas condições, apresentando produção de toxina entre N.D.- 2610,6 µg g<sup>-1</sup> e N.D. - 781,1 µg g<sup>-1</sup> de FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, respectivamente. Apesar da semelhança no perfil morfológico entre cepas de uma espécie, uma ampla variabilidade na produção quantitativa de metabólitos secundários pode ocorrer com um isolado específico cultivado sob mesma condição experimental <sup>(16)</sup>.

Considerando que a cepa 103F manteve maior toxigenicidade na avaliação realizada no ano de 2007 (Tabela 2), substituiu-se a cepa 113F por esta nos experimentos posteriores <sup>(18; 5)</sup>. A diferença na produção de fumonisinas entre as cinco cepas de *F. verticillioides*, principalmente entre os 14 subcultivos de 103F (0,85 – 3391,72 µg g<sup>-1</sup> de FB<sub>total</sub>) ocorreu devido a constantes repicagens sequenciais, aliado ao tempo prolongado de armazenamento, repercutindo provavelmente na patogenicidade (Tabela 2).

O subcultivo no meio esterilizado tem sido método simples e comum na manutenção de viabilidade celular, mas com possibilidade de alteração morfológica e/ou fisiológica aliado a perda de patogenicidade original <sup>(11)</sup>. Recomenda-se iniciar a cultura com conídio monoespórico, assim como evitar meio rico em carboidrato para manter a estabilidade genética <sup>(28)</sup>.

Autores têm registrado diferenças na estabilidade pós-preservação. Conforme <sup>(22)</sup>, cepas idênticas de *Trichoderma* oriundas de diferentes centros de pesquisa apresentaram desvios genéticos na análise por PCR. <sup>(20)</sup> demonstraram deterioração devido a conservação num isolado de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* mantido por 12 anos, por *fingerprints* não estar em conformidade com *fingerprints* típicos do PCR da espécie. <sup>(32)</sup> relataram variação morfológica de *F. oxysporum* conservados por 2 anos sob criopreservação e estocagem em água. Subcultivos repetitivos de mono e multiesporos de *Verticillium lecanii* em diferentes ágars causaram mudanças fisiológicas e morfológicas, sem afetar a virulência <sup>(14)</sup>.

O presente estudo demonstrou diferentes níveis de fumonisinas produzidos por diferentes cepas de *F. verticillioides*, provavelmente afetada por inadequação no subcultivo, aliado ao longo período de manutenção sob esta condição. O gênero *Fusarium*, em cultivo, apresenta variabilidade morfológica e, repiques repetitivos em meios de cultura laboratorial podem desencadear mutação <sup>(1)</sup>. <sup>(21)</sup> observou setorização, variação morfológica e pigmentação em cultura de *F. oxysporum* submetido a repicagens sucessivas. <sup>(31)</sup> observaram comportamento similar em outros gêneros fúngicos, i.e. a formação de setores em *Mertarhizium anisopliae*, que diferiram da cultura parental na morfologia, produção de enzimas, metabólitos secundários e redução da esporulação.

<sup>(32)</sup> sugeriram o emprego de métodos baseados em subcultivo contínuo acoplado a estocagem em óleo, água, areia/ solo ou sílica gel em caso de ausência de alternativas. Os micologistas optam pela conservação sob liofilização, ou criopreservação na fase vapor do nitrogênio líquido <sup>(29; 15; 38; 35; 32)</sup>.

A estabilidade de isolados fúngicos perante toxigenicidade em cultura é imprescindível para garantir os resultados experimentais, sendo que a coleção de culturas desempenha papel imprescindível para o patrimônio biológico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas aos membros pesquisadores; CNPq, CNPq-MAPA/SDA, FINEP, Fundação Araucária, UGF Fundo Paraná-SETI pelo apoio financeiro à pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abramson D, Gan Z, Clear RM, Gilbert J, Marquardt RR. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 45: 217-224, 1998.
2. Almeida AP, Correa B, Mallozzi MAB. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 321-326, 2000.
3. Andrews S, Pitt J I. Selective medium for *Fusarium* species and dermatiaceous hyphomycetes from cereals. *Appl Environ Microbiol.*, 51: 1235-1238, 1986.
4. Azevedo JL. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettioli, W. *Controle Biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA, 237-251, 1991.
5. Bernd LP, Curioni AA, Basso F, Furlong EB, Ono EYS, Gerage AC, Hirooka EY. Modelagem matemática para fumonisinas em milho e perfil cromatográfico de metabólitos produzidos por *Fusarium verticillioides*. *Semina: Ciências Agrárias*, 29: 361-378, 2008.
6. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, Vlegaar R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 11: 743-745, 1988.

7. Buim MR, Bracarense APFRL, Guimarães IG, Kawamura O, Ueno Y, Hirooka EY. Immunohistochemistry of fumonisin in poultry using avidin-biotin-peroxidase system. *Natural toxins*, 7: 279-282, 1999.
8. Chatterjee D, Mukherjee SK. Contamination of Indian maize with fumonisin B<sub>1</sub> and its effects on chicken macrophage. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 251-253, 1994.
- 9 Fandohan P, Hell K, Marasas WFO, Wingfield MJ. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *African Journal of Biotechnology*, 12: 570-579, 2003.
10. FAO- Food and Agriculture Organization (2001). An introduction to mycotoxins. Disponível em: <<http://www.fao.org>. Acesso em: 11 abr 2010.
11. Figueiredo MB, Pimentel PVC. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopatologica*, 1: 299-302, 1975.
12. Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA, Nelson PE. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72: 151-153, 1982.
13. Gelderblom WCA, Rheeder JP, Legott N, Stockenstrom S. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats – role of dietary deficiencies. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 471- 479, 2004.
14. Hall RA. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 216-222, 1980.
15. Hwang SW. Long term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Applied Microbiology*, 14: 784–788, 1960.
16. Hornok L, Waalwijk C, Leslie JF. Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 119: 54-58, 2007.
17. IARC – International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, World health Organization: França, v. 56, p.599, 1993.
18. Itano EN, Sasaki AA, Ribeiro AB, Fujii S, Ono EYS, Sabino M, Kawamura O, Kaminami MS, Ono MA, Hirooka EY. Effect of *Fusarium verticillioides* extract on

specific antibody production against *Paracoccidioides brasiliensis*. World Mycotoxin Journal, 1: 375-380, 2008.

19. Jeffries CJ, Boyd AEW, Paterson LJ. Evaluation of selective media for the isolation of *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium-sulphureum* from soil and potato-tuber tissue. Annals of Applied Biology, 105: 471-481, 1984.

20. Kelly A, Alcalá-Jiménez AR, Bainbridge BW, Heale JB, Pérez- Artés E, Jiménez-Díaz RM. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* infecting chickpea. Phytopathology, 84: 1293–1298, 1994.

21. Kim DH. Induced change in DNA methylation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* due successive transfer. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 30: 216-221, 1997.

22. Kuhls K, Liekfeldt E, Borner T. PCR fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. Microbiological Research, 150: 363–371, 1995.

23. Leslie JF, Plattner RD, Desjardins AE, Klittich CJR. Fumonisin B<sub>1</sub> production by strains from different mating populations of *Giberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). Mycotoxicology, 82: 341-343, 1992.

24. Munkvold GP, Desjardins AE. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? Plant disease, 81: 556-565, 1997.

25. Nash SM, Snyder WC. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology, 52: 567-572, 1962.

26. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983.

27. Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins AE. Production of fumonisins by *Fusarium verticillioides* strains from various substrates and geographic areas. Applied Environmental Microbiology, 57:2410-2412, 1991.

28. Nelson PE. Taxonomy and Biology of *Fusarium verticillioides*. Mycopathologia, 117: 29-36, 1992.

29. Polge C, Smith AU, Parkes S. Revival of spermatozoa after dehydration at low temperatures. Nature, 164- 666, 1949.

30. Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2101-2105, 2002.
31. Ryan MJ, Bridge PD, Smith D, Jeffries P. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 163-168, 2002.
32. Ryan MJ, Smith, D. Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. *Mycology Research*, 108: 1351–1362, 2004.
33. Santos IM, Abrunhosa L, Venancio A, Lima N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum*. *Letters in Applied Microbiology* 35: 272–275, 2002.
34. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13:2077–2087, 1990.
35. Smith D, Ryan MJ. Current status of fungal collections and their role in biotechnology. In *Handbook of Fungal Biotechnology* (D. K. Arora, ed.): 527–538. 2nd ed. Dekker M, New York, 2004.
36. Sydenham EW, Marasas WFO, Shepard GS, Thiel PG, Hirooka EY. Fumonisin concentrations in brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 994-997, 1992.
37. Sweeney MJ, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 43: 141-158, 1998.
38. Tan CS. Preservation of fungi. *Cryptogamic Mycology*, 18: 157–163, 1997.
39. Ueno Y, Aoyama S, Sugiura Y, Wang, DS, Lee US, Hirooka EY, Hara S, Karki T, Chen G, Yu SZ. A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, 9: 27-34, 1993.
40. Voss KA, Howard PC, Riley RT, Sharma RP, Bucci TJ, Lorentzen RJ. Carcinogenicity and mechanism of action of Fumonisin B<sub>1</sub>: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). *Cancer Detection and Prevention*, 26: 1-9, 2002.