



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

ROSÂNGELA RIBEIRO DE SOUSA

INCIDÊNCIA DE *Fusarium verticillioides* EM SEMENTES DE MILHO E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO EM DIFERENTES GENÓTIPOS E ESTÁGIOS FENOLÓGICOS

GURUPI - TO
DEZEMBRO DE 2017

ROSÂNGELA RIBEIRO DE SOUSA

INCIDÊNCIA DE *Fusarium verticillioides* EM SEMENTES DE MILHO E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO EM DIFERENTES GENÓTIPOS E ESTÁGIOS FENOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos

GURUPI – TO
DEZEMBRO DE 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins

S725i Sousa, Rosângela Ribeiro de.
 Título: Incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho e métodos de inoculação em diferentes genótipos e estágios fenológicos. / Rosângela Ribeiro de Sousa - Gurupi, 2017. 68f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi – Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Produção Vegetal, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos.

1. Sanidade. 2. *Zea mays*. 3. *Fusarium verticillioides*. 4. PCR. I.Título.

CDD 635

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.



Universidade Federal do Tocantins
Câmpus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal

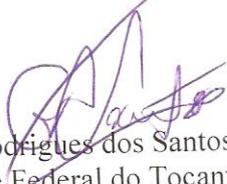
ATA nº09/2017

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE ROSÂNGELA RIBEIRO DE SOUSA,
DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TOCANTINS**

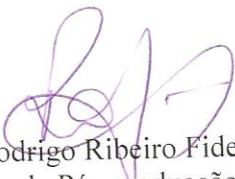
Nos 15 dias do mês de dezembro do ano de 2017, às 14:30 horas, na Sala de defesa do Bloco PG-PV, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos, do Câmpus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dra. Talita Pereira de Souza Ferreira do Câmpus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Fernando Wächter Haesbaert, do Câmpus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ROSÂNGELA RIBEIRO DE SOUSA, intitulada "INCIDÊNCIA DE *Fusarium verticillioides* EM SEMENTES DE MILHO E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO EM DIFERENTES GENÓTIPOS E ESTÁGIOS FENOLÓGICOS". Após a exposição, a discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-a ao título de Mestre em Produção Vegetal. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Talita Pereira de Souza Ferreira
Dra. Talita Pereira de Souza Ferreira
Primeiro examinador

Fernando M. Haesbaert
Dr. Fernando Machado Haesbaert
Segundo examinador


Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 15 de dezembro de 2017.


Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mudaste o meu pranto em dança, a minha veste de lamento em veste de alegria, para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale. Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.

Salmos 30:11-12

A ti meu Deus agradeço.

Aos meus pais João Pinto de Souza (*In memoria*) e Raimunda Luiza Ribeiro de Souza, ao meu irmão Jonário Ribeiro de Sousa e a todos os

meus amigos e familiares, que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por sempre me dar forças para continuar, mesmo com tantas adversidades e dificuldades, por sempre que precisar encontrar nele a paz que tanto preciso, por acalmar meu coração.

Agradeço em especial a minha mãe e meu irmão pelo apoio incondicional, e aos meus familiares que de alguma forma contribuíram incentivando-me a continuar sempre.

Ao meu orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos pela paciência que sempre teve comigo. Por receber-me sempre bem para sanar minhas dúvidas e por acreditar no meu potencial.

Agradeço em especial a Dra. Talita, que é uma pessoa sempre muito paciente e carinhosa com todos que procuram sua ajuda, não mede esforços para nos ajudar, e no meu caso não foi diferente, sempre que precisei e preciso de sua ajuda está pronta a servir com muita paciência e carinho. Muito obrigada por você ser essa pessoa maravilhosa e tão especial com a gente.

Aos meus queridos amigos Jara Lúcia e José Roberto e também ao Dr. Otávio, que são mais que familiares, pelo imenso apoio recebido ao acalmar minha mãe nos momentos que estava com dúvidas e nos momentos de dificuldades sempre nos apoiaram e também se preocuparam conosco.

A minha querida prima Joselina e minha madrinha Mágda Lúcia que mesmo de longe sempre se preocupou e me incentivou.

Aos amigos Herminia e Amoacir, por me darem apoio em relação a moradia em Gurupi no início dessa jornada, e ao Sr. Geraldo e sua filha Gisele que me receberam de braços abertos em sua residência, mesmo sem me conhecer, muito obrigado a todos.

Aos meus amigos de laboratório de fitopatologia pela a ajuda sempre que precisava, Claudiany, Luana Schmitt, João Vinícius, Patrícia Resplandes, João Henrique, Oelton Rosa, Oziel, Pedro Raymundo e demais colegas de laboratório. Em especial Dalmácia Mourão por sempre ter muita paciência com todos do laboratório, você é uma pessoa iluminada que sempre está pronta para nos ajudar, amamos muito você mãe Dal. A você também Mateus, mesmo sendo muito brigão gosto muito de você e obrigada pela a ajuda;

Vanilza e Priscila, não sei o que faria sem vocês, muito obrigada por me consolar nas horas de estresse total, quando estava triste e você Vava por ficar até altas horas me ajudando com a dissertação;

Aos queridos amigos Thays Queiroz, Laianne Carvalho, Dioga, Daniele de Cássia, Dayane Barros, Tiago Mateus, Edíhones Lima, Cássio Brandão, Felipe Rodrigues, Bruna Lazzaretti, Oziel Lourenço, Iraíz Dolorez. Alzenira Borges, que sempre me tratou como filha. Gente amo vocês, muito obrigada;

Não posso esquecer de agradecer em especial ao meu amigo Oelton Rosa, pela parceria e amizade adquirida e compartilhamento de conhecimentos, e por ter ajudado tanto para a realização desde projeto;

À Universidade Federal do Tocantins juntamente ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade da concretização de mais este sonho. Agradeço especialmente à Erika e ao Professor Rodrigo Fidelis por sempre me receberem bem e ajudarem no que preciso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Obrigada a todos por tornarem possível a realização desse objetivo, a conquista dessa vitória!!!

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 12 |
| 2.1 Fungos na alimentação animal..... | 12 |
| 2.2 Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos..... | 13 |
| 2.3 <i>Fusarium</i> | 14 |
| 2.4 Grãos ardidos..... | 14 |
| 2.5 Micotoxinas..... | 15 |
| 2.6 Fumonisinas..... | 16 |
| 2.7 Ações preventivas..... | 17 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 19 |
| CAPITULO 1 - QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE MILHO PRODUZIDAS NO SUL DO TOCANTINS COM DIFERENTES GRAUS DE INFECCÃO POR <i>Fusarium verticillioides</i>..... | 24 |
| RESUMO..... | 24 |
| ABSTRACT..... | 25 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 26 |
| 2 OBJETIVOS..... | 28 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 28 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 28 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 3.1 Isolamento do fungo e produção de inóculo..... | 29 |
| 3.2 Identificação molecular do isolado..... | 29 |
| 3.3 Amplificação do DNA por PCR..... | 30 |
| 3.4 Origem das sementes e local do experimento..... | 31 |
| 3.5 Colheita das espigas e avaliação do experimento..... | 32 |
| 3.6 Avaliação de Severidade..... | 33 |
| 3.8 Transporte de fungos associados às sementes..... | 34 |
| 3.9 Teste de patogenicidade..... | 35 |
| 3.10 Teste de emergência e transmissão semente-plântula de <i>Fusarium verticillioides</i> em diferentes órgãos de plantas de milho..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.11 Procedimento estatístico..... | 36 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 4.1 Identificação molecular e amplificação de DNA de <i>Fusarium verticillioides</i> | 36 |
| 4.1.1 Sensibilidade na detecção de <i>Fusarium verticillioides</i> em sementes de milho infectadas..... | 37 |
| 4.2 Transporte de fungos associados às sementes..... | 37 |
| 4.3 Teste de patogenicidade..... | |
| 4.4 Teste de transmissibilidade e emergência..... | 41 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 45 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 46 |
| CAPITULO II – TRANSMISSÃO DE <i>Fusarium verticillioides</i> EM SEMENTES DE MILHO EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DE INOCULAÇÃO DAS PLANTAS..... | 50 |
| RESUMO..... | 50 |
| ABSTRACT..... | 51 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 52 |
| 2 OBJETIVOS..... | 53 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 53 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 53 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 54 |
| 3.1 Condução e instalação do experimento..... | 54 |
| 3.2 Isolamento do patógeno e produção de inóculo..... | 54 |
| 3.3 Teste de patogenicidade em plântulas..... | 55 |
| 3.4 Análise Sanitária..... | 55 |
| 3.5 Extração e amplificação do DNA..... | 56 |
| 3.6 Procedimento estatístico..... | 57 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 59 |
| 4.1 Extração de DNA de <i>Fusarium verticillioides</i> | 59 |
| 4.2 Patogenicidade..... | 59 |
| 4.3 Análise Sanitária..... | 61 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 66 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 67 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Análise de variância sobre a incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho em função do genótipo e do método de inoculação38
- Tabela 2.** Incidência (%) de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho em função do genótipo e do método de inoculação.....39

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Análise de variância envolvendo duas épocas de plantio em vasos, inoculados com *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos.....60
- Tabela 2.** Médias de incidência (%) nos grãos com *Fusarium verticillioides* inoculados em diferentes estádios fenológicos de plantas milho61
- Tabela 3.** Massa de 1000 grãos (g) de grãos de milho inoculados com *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos63

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da região VER-1 e VER-2 do produto da extração de DNA de sementes de milho com diferentes incidências de *Fusarium verticillioides* presentes.....36
- Figura 2.** Incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho submetidas a inoculação de forma natural, injetável e spray39
- Figura 3:** Emergência de plântulas provenientes de genótipos de milho inoculados com diferentes métodos com *Fusarium verticillioides*.....41
- Figura 4:** Incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho não germinadas inoculadas por meio natural, injetável, spray.....43

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da região VER-1 e VER-2 de *Fusarium verticillioides* em diferentes concentrações de DNA purificado.....58
- Figura 2:** Severidade em espigas de milho oriundas de plantas inoculadas com *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos.....59
- Figura 3.** Espigas de milho oriundas de plantas inoculadas com *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos.....60

1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é plantado em todas as regiões do Brasil e é encontrado em diversas condições de clima e de cultivo. A produção brasileira é de cerca de 80 milhões de toneladas de grãos por ano, classificando o país como um dos maiores produtores mundiais e exportadores desta *commodity* (FAO, 2017).

O estado do Tocantins está inserido na Fronteira Agrícola do MATOPIBA (Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia) e sua área cultivada encontra-se em franca expansão, onde nos últimos anos, o cultivo do milho vem se mantendo estável, ocupando as áreas posteriores à colheita da soja (CONAB, 2017). O aumento de produtividade tem sido um dos grandes desafios por parte de técnicos e produtores de milho segunda safra no Tocantins. O estado destaca-se como uma nova fronteira agrícola, com expansão acentuada na área plantada e na produção de grãos, superando mais de um milhão de hectares e mais de três milhões de toneladas de grãos, mas a produtividade do milho segunda safra ainda é considerada baixa. Um dos principais fatores de sucesso no seu cultivo é a escolha correta da época de plantio e das cultivares a serem utilizadas em cada região. O plantio de segunda safra no estado do Tocantins é caracterizado por um curto período de tempo entre a colheita da soja e o plantio do milho, de modo a aproveitar, ao máximo, o final do período chuvoso na região (SIMON et al., 2016).

Apesar da grande importância desta cultura, poucos produtores conseguem explorar todo potencial produtivo. Além de pragas e deficiências nutricionais, a incidência de doenças causa diversos danos e redução drástica na produção e qualidade final das sementes de milho.

Entre vários fatores que afetam a qualidade das sementes de milho, os microrganismos são considerados um dos mais importantes. Além de estarem relacionados à qualidade sanitária, podem afetar a germinação e o vigor e acelerar o processo de deterioração durante o armazenamento. Além disso, agentes etiológicos da maioria das doenças que afetam a cultura podem ser disseminadas e transmitidas por sementes infectadas contaminadas (FANTAZZINI et al, 2016). Recebe destaque o fungo *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg, o qual é a espécie de maior incidência em lavouras de milho e em outras culturas por todo o mundo (CAO et al., 2014; DEEPA; NAGARAJA; SREENIVASA, 2016).

Com isso objetivou-se com este trabalho avaliar a incidência de *F. verticillioides* inoculados em diferentes épocas e métodos de inoculação em plantas de milho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, em termos de área plantada, os destaques são as culturas da soja, milho e arroz. A cultura do milho, isoladamente, gera grande impacto positivo na economia do país, sendo a segunda cultura que mais gera receita na cadeia produtiva de grãos no Brasil, com uma produção estimada de 33.840 milhões de toneladas somente na safra 2016/17 (MAPA, 2017).

Entretanto, tamanha produtividade pode ser afetada pela presença de vários patógenos, dos quais os fungos do gênero *Fusarium* são de grande relevância fitossanitária (TORRE-HERNÁNDEZ et al., 2014). São responsáveis por levarem às perdas consideráveis de produtividade e sanidade dos grãos. O milho é um dos principais cereais cultivados no mundo, fornecendo produtos para humanos e animais, bem como matérias-primas para a indústria. Devido à importância econômica desta cultura e adoção de tecnologias pelos produtores, está aumentando a demanda por sementes de milho de alta qualidade, fazendo com que as empresas de sementes adotem muitas vezes padrões de qualidade mais restritos do que os estabelecidos somente pelo sistema de certificação (FANTAZZINI et al, 2016). Os grãos são utilizados na alimentação humana e na fabricação de vários subprodutos, principalmente na alimentação animal, sendo oferecido em grãos, ou em rações formuladas e balanceadas. Devido a isso, 70 a 80% da produção desse cereal é diretamente empregada na composição de rações para produção de proteína de origem animal como carne, leite e ovos (ALVES et al., 2015).

2.1 Fungos na alimentação animal

Os fungos são caracterizados por serem microrganismos que têm ampla distribuição no meio ambiente, com alta dispersão geográfica. Eles são importantes em várias atividades econômicas, como produção de alimentos, remédios, enzimas e ácidos orgânicos. Outro aspecto destes organismos é que alguns fungos são patogênicos às plantas e deterioram alimentos, o que pode causar redução no valor nutricional dos alimentos, produção de produtos com metabólitos secundários e doenças em seres humanos e animais (SILVA et al., 2015).

Os fungos mais comuns associados às sementes de milho no Brasil são os do gênero *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. Algumas espécies, muitas vezes, podem ser transmitidas das sementes para as plantas (CASA; REIS, 2006). Esta associação, na maioria dos casos, reduz a qualidade fisiológica das sementes, favorecendo a dispersão de agentes patogênicos à longas distâncias e, patógenos, também podem ser transmitidos das sementes para as plantas (COUTINHO et al., 2007). Além disso, esses agentes fitopatogênicos também podem produzir metabólitos secundários tóxicos para seres humanos e animais, chamados micotoxinas (FREIRE et al., 2007; REIS et al., 2004).

Após a infecção por fungos patogênicos, algumas forragens gramíneas mostram mudanças bioquímicas que levam a uma perda de qualidade nutricional e, conseqüentemente, também a palatabilidade para animais devido à redução da concentração de proteínas, aminoácidos, açúcares solúveis, carboidratos e digestibilidade da matéria seca, no entanto os compostos fenólicos e lignina são aumentados em plantas infectadas (MARTINEZ et al., 2010).

A contaminação de matérias-primas afeta diretamente a alimentação dos animais, produtividade e contribui para a perda de culturas, o que provoca perdas econômicas para a indústria de alimentos e custos para controle e análise de micotoxinas (CHELI et al., 2013).

Nas infecções causadas por fungos em animais, patógenos podem estabelecer infecção oportunista invadindo o tecido hospedeiro e afetando o sistema imunológico. Para sobreviver, os fungos vão nutrir-se dos tecidos e nos casos de infecção sistêmica, eles se espalham para novos tecidos ou órgãos (NEGRI et al., 2012).

2.2 Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos

Fungos são microrganismos eucarióticos, multicelulares, que podem ocasionar alterações no sabor e qualidade de alimentos. Em alguns casos essas alterações são desejáveis, como na fabricação de queijos. Todavia, em muitos outros, podem causar transformações indesejáveis, produzindo sabores e odores desagradáveis, causados por diferentes graus de deterioração ou ainda trazer riscos à saúde humana e animal devido à produção de micotoxinas (OLIVEIRA et al., 2013).

Vários alimentos, seja devido à forma de armazenamento, sejam por meio de instrumentos utilizados em seu manejo, estão passíveis de sofrerem contaminações, incluindo as fúngicas. Essa contaminação ocorre pela incorporação do contaminante ao produto,

podendo ser incorporado ao alimento durante seu manejo oferecendo risco de gerar danos à saúde do consumidor (GONÇALEZ et al., 2013).

Os alimentos, de um modo geral, podem sofrer contaminação fúngica durante a colheita, processamento e armazenamento até o momento do consumo humano ou animal. Portanto, faz-se necessário um rígido controle qualitativo na produção de alimentos para que os riscos de contaminação por micotoxinas possam ser diminuídos de modo a evitar intoxicações (SOUZA et al, 2017).

2.3 *Fusarium*

O *Fusarium* é um fungo cosmopolita, que é amplamente habitante do solo e é mais encontrado em condições favoráveis nas regiões temperadas e tropicais. Muitas espécies são agentes patogênicos de plantas cultivadas, especialmente aqueles que são importantes no setor agrícola (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

O gênero *Fusarium* tem uma ampla distribuição geográfica, e sua dispersão é fator de desenvolvimento no meio ambiente. Pode ser associada aos tipos de clima, à vegetação, a microbiota, o tipo de solo e nutrientes. Isso é também distinguido por crescimento rápido, colônias com pálido e coloridos micélios aéreos e ramificados (MACIEL, 2012; FRIAS, 2014). A importância deste fungo é evidenciada pela maioria das espécies as quais são patógenos de plantas e habitam amplamente no solo (GUARRO, 2013). Neste gênero, os esporos têm duas formas que são chamadas microconidiais e macroconidiais. Microconidia é unicelular, uninucleado e fusiforme. A macroconidia é multicelular, mas cada célula possui apenas um núcleo (SANDOVAL, 2010).

Patologias desencadeadas em culturas pelo *Fusarium* tem como resultado eminente a podridão das raízes, caules e frutas (MENEZES et al., 2010). Na cultura do milho, *F. verticillioides* e *F. graminearum* são as principais espécies fitopatogênicas que podem causar várias doenças associadas à reduções da produtividade resultando em danos na qualidade dos grãos (KUHNEM JÚNIOR et al., 2013).

2.4 Grãos ardidos

A semente é considerada infestada quando o patógeno está ligado à superfície, e infectada quando o patógeno é encontrado dentro de seus tecidos (GALLI et al, 2005). Neste contexto, seria conveniente que a colheita ocorresse logo após a maturidade fisiológica,

quando os grãos de milho apresentam máxima qualidade, máximo acúmulo de massa seca e baixa incidência de fungos toxigênicos (EGLI e TEKRONY, 1997; SAINI e WESTGATE,1999). Entretanto, nesta fase, os grãos ainda apresentam elevado teor de umidade, o que torna inviável a colheita mecanizada, em função da dificuldade de debulha, decorrente do excesso de partes verdes e úmidas de plantas, fato que causam severas injúrias mecânicas por amassamento de grãos (ALVES et al, 2001)

Segundo Farias et al. (2000), a contaminação por fungos com potencial toxigênico, tais como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., pode ocorrer em grãos de milho aparentemente saudáveis. A qualidade dos grãos de milho é alterada direta ou indiretamente quando estes são infectados por fungos, pela produção de micotoxinas, que ocasionam danos à saúde tanto humana quanto animal em razão da atividade tóxica que podem exercer sobre o organismo (FARIAS et al, 2000; KUMAR et al, 2008)

O fungo *F. verticillioides* é a principal espécie produtora de fumonisinas, grupo de micotoxinas que ocorrem no milho e seus derivados (WORDELL FILHO; CASA, 2010). Rocha (2010) estudou a distribuição de fungos e micotoxinas em grãos recém-colhidos, provenientes dos estados de São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Bahia. Constatou que o fungo *F. verticillioides* foi o patógeno mais encontrado e as fumonisinas foram as micotoxinas mais frequentes nos grãos desse cereal.

2.5 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que apresentam efeito tóxico ao organismo humano e outros animais. Entre elas se destacam as aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), ocratoxinas (A, B e C), patulina, zearalenona e tricotecenos (OLIVEIRA et al., 2013).

As micotoxinas levam ainda a uma perda econômica preocupante em decorrência da redução da qualidade de alimentos para os seres humanos e animais. Ainda produzem efeitos deletérios, principalmente quando absorvidas por via oral, mas podem também ao serem inaladas ou absorvidas pela pele (MEDEIROS et al., 2015).

A presença de fungos em produtos agrícolas não significa que o fungo produziu micotoxinas. Contudo, a detecção de micotoxinas pode ocorrer sem presença do fungo em alimentos, uma vez que as micotoxinas são altamente resistentes a condições adversas, tais como processos envolvendo fases mecânicas e térmicas. Dentro desta forma, as micotoxinas

podem permanecer na alimentação mesmo depois da eliminação do fungo que os produz (OLIVEIRA; KOLLER, 2011).

Assim como no crescimento fúngico, a produção de micotoxinas é governada por uma série de fatores, entre eles (TANIWAKI; IAMANAKA; SILVA, 2013):

- Fungo: apenas alguns gêneros são toxigênicos, embora nem todas as espécies desses gêneros sejam produtores de micotoxinas;
- Substrato: alimentos com alto teor de carboidratos e algumas sementes oleaginosas são mais susceptíveis à produção de micotoxinas quando comparados a outros tipos de alimentos;
- Umidade relativa e atividade de água (aw): grande parte dos fungos necessita de umidade relativa acima de 80% e valores de aw entre 0,6 e 0,9 para a produção de micotoxinas;
- Temperatura: a temperatura ótima de produção de micotoxinas geralmente encontra-se na faixa de temperatura de crescimento fúngico (mínima-máxima). Climas tropicais e subtropicais favorecem o crescimento da maioria dos fungos toxigênicos;
- Atmosfera: são aeróbios, em sua maioria;
- Interação microbiana: a presença de outros microrganismos pode alterar a produção de micotoxinas de diferentes maneiras, ou seja, a produção pode ser estimulada ou mesmo inibida. Além disso, alguns microrganismos são capazes de remover ou degradar as micotoxinas presentes no meio.

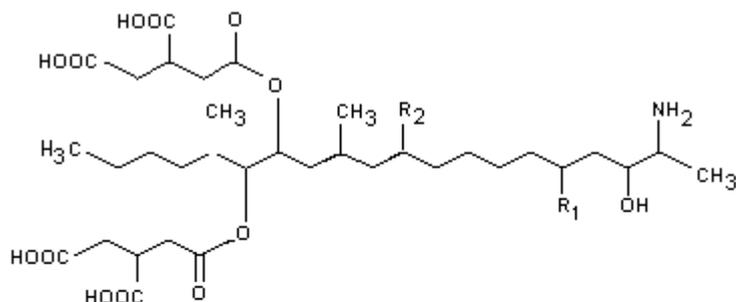
As micotoxinas podem causar vários efeitos biológicos nocivos no organismo animal, inclusive, hiperestrogenismo, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (ROCHA et al., 2014).

2.6 Fumonisinias

As fumonisinas tiveram seus primeiros registros em 1988. As principais espécies que produzem fumonisinas são: *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. subglutinantes*, *F. polyphialidicum* e *F. oxysporum* (CRUZ, 2013; MALLMANN et al., 2013).

Existem vários tipos de fumonisinas devido a grande quantidade de espécies produtoras. Até agora, são conhecidos em torno de 25 substâncias, destas as fumonisinas B1, B2 e B3 (figura 1), ocorrem com mais frequência em alimentos (CRUZ, 2013; PEREIRA; SANTOS, 2011; SANTANA, 2012).

Figura 1: Fórmula estrutural química das fumonsinas B1-B4.



| | R ₁ | R ₂ | Formula | CAS Number | Molecular mass |
|--------------------------|----------------|----------------|--|-------------|----------------|
| Fumonisin B ₁ | OH | OH | C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅ | 116355-83-0 | 721.838 |
| Fumonisin B ₂ | OH | H | C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄ | 116355-84-1 | 705.839 |
| Fumonisin B ₃ | H | OH | C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄ | 136379-59-4 | 705.839 |
| Fumonisin B ₄ | H | H | C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₃ | 136379-60-7 | 689.840 |

O clima é um dos principais fatores para a contaminação dos grãos por fungos. As condições de alta umidade e temperaturas de cerca de 20 a 26 °C são ótimas para a produção desses metabólitos (CRUZ, 2013).

2.7 Ações preventivas

O uso da rotação de pastagem em plantas não hospedeiras e a eliminação de resíduos de culturas são as formas que favorecem a diminuição das cepas patogênicas. O aumento da atividade microbiana é diminuída por práticas efetivas que aumentam a supressividade do solo pela capacidade antagonista destes métodos proporcionarem contra os potenciais agentes patogênicos (ZHAO et al., 2013).

Os avanços nas tecnologias das culturas aumentaram a produtividade do milho. Exemplos dessas novas técnicas é o sistema de semeadura direta, que usa correção e adequada fertilização do solo; uso extensivo de gerenciamento integrado de ervas daninhas, doenças e pragas e aumento da adoção de sementes melhoradas com alta capacidade de produção. As contribuições mais importantes no uso dessas novas técnicas é o uso de híbridos e adoção de sementes geneticamente modificadas (GRAVINA; 2011).

As condições para o crescimento de fungos, a produção de micotoxina depende de fatores ambientais e parâmetros errôneos, como a produção agrícola com medidas técnicas e

preventivas inadequadas, envolvendo os processos de secagem, manuseio, embalagem, armazenamento e condições de transporte que podem promover o crescimento de fungos (MARIN et al., 2013).

Em geral, as infestações fúngicas são difíceis de serem tratadas por métodos convencionais devido à capacidade destes patógenos sobreviverem em diferentes ambientes. Entre esses lugares, o solo e os restos culturais podem ser citados, que favorecem a persistência desses patógenos no ambiente. Uma das medidas de controle eficiente e econômica é o uso de cultivares resistentes (BAKSHSH et al., 2007).

O controle químico também poderá ser utilizado. Os fungicidas carbendazim, thiram + benomil e thiram + captan, são bastante utilizados para tratamento de sementes (NENE et al., 2012). O problema é que estes fungicidas não podem prevenir a infecção e a colonização de raízes pelo patógeno habitante do solo (ANIMISHA et al., 2012).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. M.; CARGNELUTTI FILHO, A.; TOEBE, C. B. M.; SILVA, L. P. Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e da qualidade nutricional. **Ciência Rural**, Santa Maria - RS, v. 45, n. 5, p. 884-891, maio 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140471>

ALVES, W. M.; FARONI, L. R. A.; CORRÊA, P. C.; QUEIROZ, D. M.; TEXEIRA, M. M. Influência dos teores de umidade de colheita na qualidade do milho (*Zea mays* L.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 26, n. 2, p. 40-45, 2001

ANIMISHA S. Z.; JAISWAL K. K.; PANDEY, P. Integrated Management of Chickpea Wilt Incites by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, **International Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 5, p. 284-290, 2012.

BAKSH, A.; IQBAL, S. M.; HAQ, I. K. Evolution of chickpea germplasm for wilt resistance. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 583-593, 2007.

CAO, A.; SANTIAGO, R.; RAMOS, A. J.; SOUTO, X. C.; AGUÍN, O.; MALVAR, R. A. BUTRÓN, A. Critical environmental and genotypic factors for *Fusarium verticillioides* infection, fungal growth and fumonisin contamination in maize grown in northwestern Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 63-71, 2014.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 427-439, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000500001>

CHELI, F.; PINOTTI, L.; ROSSI, L.; DELL'ORTO. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. **Food Science and Technology**, London, v. 54, p. 2, p. 307-314, 2013.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Décimo Primeiro Levantamento, Safra 2016/17. v. 4, n. 11, 2017.

COUTINHO, W.M.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, C.F.; MACHADO, J.C. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.458-464, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000600002>

CRUZ, C. S. A. **Emprego de óleos vegetais e glicerina no controle do gorgulho do milho**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Campina Grande – PB, Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, p. 88, 2013.

DEEPA, N.; NAGARAJA, H.; SREENIVASA, M. Y. Prevalence of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* associated with cereals grown in Karnataka (India). **Food Science and Human Wellness**, v. 5, p. 156–162, 2016.

EGLI, D. B.; TEKRONY, D. M. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v.7, p.3-11, 1997.

FANTAZZINI, T. B.; GUIMARÃES, R. M.; CLEMENTE, A. da C. S.; CARVALHO, E. R.; MACHADO, J. da C.: *Fusarium verticillioides* INOCULUM POTENTIAL AND ITS RELATION WITH THE PHYSIOLOGICAL STORED CORN SEEDS QUALITY. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 32, n. 5, p. 1254-1262, Sept./Oct. 2016. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v32n5a2016-33056>

FAO. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em 03 nov. 2017.

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *aspergillus spp.* em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FREIRE, F. das C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal, **Embrapa Agroindústria Tropical**, ISSN 1677-1915. Fortaleza. p. 48, 2007

FRIAS, A. G. **Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* e f.sp. lactucae obtidos de campos de produção comercial no estado de São Paulo e avaliação de genótipos de alface**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo. p. 56, 2014.

GALLI, J. A.; FESSEL, S. A.; PANIZZI, R. C. Effect of *Fusarium graminearum* and infection index on germination and vigor of maize seeds. **Fitopatologia Brasileira**, DF, v. 30, n. 5, p. 470-474, 2005.

GONÇALEZ, E.; SILVA, J. L.; REIS, T. A.; NAKAI, V. K.; FELÍCIO, J. D.; CORRÊA, B. **Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim**. São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico, 2013.

GRAVINA, M. Milho GM no Brasil. **Revista Agroanalysis**. v. 31, n. 01, p. 30-31, 2011.

GUARRO, J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. Euro. **Journal of Clinical Microbiology**. Infect. Dis. p. 32, 2013.

KUHNEM JÚNIOR, P. R.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 43 n. 4, p. 583-588, 2013.

KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905, 2008.

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

MACIEL, C. G. *Fusarium sambucinum* associados a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle. Dissertação (Mestrando em Engenharia Florestal), Universidade de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. p. 94. 2012.

MALLMANN, A. O.; MARCHIORO, A.; OLIVEIRA, M. S., MINETTO, L.; WOVST, L. R. S.; RAUBER, R. H.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Dois planos de amostragem para análise de fumonisinias em milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 43, n. 3, p. 551-558, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, DF, p. 160, 2017.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**. v. 60, p. 218-237, 2013.

MARTINEZ, A. S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Dano causado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia. **Ciências agrárias**, v. 31, n. 4, p. 863-870, 2010.

MEDEIROS, V. P. B.; SILVA, G. S.; LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O. Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 74, n. 3, p. 266-73, 2015.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E. J.; MANZONI, C. G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J.; SILVA, S. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288-305, 2012.

NENE, Y. L.; REDDY, M. V.; HAWARE, M. P.; GHANEKAR, A. M.; AMIN, K. S.; PANDE, S.; SHARMA, M. **Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control**. Information Bulletin No. 28 (revised). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2012.

OLIVEIRA, J. N.; OLIVEIRA, A. V.; MENEGHELLO, E. R. Análise Molecular de espécies de *Aspergillus* contaminantes de uvas vendidas no comércio de Maringá PR. **Iniciação Científica CESUMAR**. v. 15, n. 2, p. 157-163, Jul/Dez, 2013.

OLIVEIRA, L. S. F.; KOLLER, F. F. C. Ocorrência de *Aspergillus spp.* e aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas. v. 5, n. 1, p. 57-68, 2011.

PEREIRA, C. K.; SANTOS, F. C. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico, Ensaios e Ciências. **Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Campo Grande, Brasil, v. 15, n. 4, p. 147-165, 2011.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Lages: Graphel, 2004, 144 p.

ROCHA, L. O. **Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém-colhidos e variabilidade genética das cepas de *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus* isolados**. 174f. Tese (Doutorado em microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA; D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control Journal Elsevier**. v. 36, p. 159-165, 2014.

SAINI, H. S.; WESTGATE, M. E. Reproductive development in grain crops during drought. **Advances in Agronomy**, v. 68, p. 59-96, 1999.

SANDOVAL, C. M. R. **Reconocimiento taxonómico preliminar de *Fusarium roseum* (clasificación pendiente) responsable de la pudrición basal del clavel comercial en la sabana de Bogotá**. Monografía (Graduação em Biologia) – Bogotá, Universidad Militar Nueva Granada, p. 114, 2010.

SANTANA, M. C. A. Principais tipos de micotoxinas encontradas nos alimentos de animais domésticos. **Revista eletrônica de veterinária**, Salvador, BA, Brasil, v. 13, n. 7, p. 1-18, 2012.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C., LIMA, N. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: uma revisão. **Revista Ifes Ciência**, v.1, n. 1, p. 18-40, 2015.

SIMON, J.; COSTA, R. V. da; ALMEIDA, R. E. M. de; CAMPOS, L. J. M.; LAGO, B. C.; FERREIRA, L. L.; LOPES, E. R.; DINIZ FILHO, R. Época de plantio e cultivares de milho safrinha no Tocantins. . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016.

SOUZA, D. R.; SOUZA, G. A. DE; ARAUJO, I. F. B. DE; PEREIRA, L. M.; BEZERRA, V. DE S.; MARQUES, R. B. Efeitos tóxicos dos fungos nos alimentos. **Revinter**, v. 10, n. 02, p. 73-84, jun. 2017. <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol10ed2.281>

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SILVA, N. **Fungos deterioradores de alimentos: Ocorrência e detecção**. Campinas - São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 2013.

TORRE-HERNÁNDEZ, M. E. DE et al. Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. TIP Revista Especializada en **Ciencias Químico-Biológicas**, v. 17, n. 1, p. 77-91, 2014.

WORDELL FILHO, J. A.; CASA, R. T. Doenças na cultura do milho. In: Wordell Filho, J. A.; Elias, H. T. (Eds.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, p. 207-227, 2010.

ZHAO, Q.; RAN, W.; WANG, H.; LI, X; SHEN, Q; SHEN, S.; XU. Y. Biocontrol of Fusarium wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. **BioControl**, Amsterdam, The Netherlands, v. 58, n. 2, p. 283-292, 2013.

CAPITULO 1 - QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE MILHO PRODUZIDAS NO SUL DO TOCANTINS COM DIFERENTES GRAUS DE INFECCÃO POR *Fusarium verticillioides*

RESUMO

A maioria dos patógenos responsáveis pelas principais doenças do milho (*Zea mays* L.) é transmitida pelas sementes, trazendo consequências como a podridão de sementes e o tombamento de plântulas, redução da germinação e do vigor, diminuindo assim a qualidade das sementes de milho. Este trabalho teve por objetivo avaliar a patogenicidade, transmissão e incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho oriundas de espigas inoculadas com diferentes métodos. No presente trabalho foram realizados testes de detecção de *F. verticillioides* para confirmação da presença do patógeno nas plantas de milho inoculadas nas formas de spray, injetável e natural. Foi avaliada a porcentagem de emergência, qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho produzidas com diferentes graus de infecção por *F. verticillioides*, relacionando-se com a produtividade. Foi possível identificar a sensibilidade das técnicas de PCR, que amplificaram as concentrações de DNA testadas. A técnica de PCR utilizada foi capaz de detectar até 1% de infecção. Foi observado que as inoculações feitas nas espigas das plantas com spray resultaram em maior incidência do patógeno nas sementes quando comparada aos demais tratamentos. Os dez híbridos inoculados apresentaram incidência de *F. verticillioides* nas sementes que foram submetidas às três formas de inoculação. Quanto à emergência das plântulas verificou-se porcentagem superior à 90% em todos os híbridos estudados.

Palavras chave: PCR, transmissibilidade, micoflora, sanidade, *Zea mays*.

PHYSIOLOGICAL AND SANITARY QUALITY OF CORN SEEDS PRODUCED IN THE SOUTH OF TOCANTINS WITH DIFFERENT DEGREES OF INFECTION BY *Fusarium verticillioides*

ABSTRACT

Most of the pathogens responsible for the main diseases of maize (*Zea mays* L.) are transmitted by seeds, with consequences such as seed rot and seedling tipping, germination and vigor reduction, thus reducing the quality of maize seeds. The objective of this work was to evaluate the pathogenicity, transmission and incidence of *Fusarium verticillioides* in corn seeds from spikes inoculated with different methods. In the present work, *Fusarium verticillioides* detection tests were performed to confirm the presence of the pathogen in maize plants inoculated in spray, injectable and natural forms. The percentage of emergence, physiological and sanitary quality of maize seeds produced with different degrees of infection by *F. verticillioides* was evaluated, being related to productivity. The PCR technique used was able to detect up to 1% of infection. It was observed that the inoculations on the spikes of the spray plants resulted in a higher incidence of the pathogen in the seeds when compared to the other treatments. The ten inoculated hybrids showed incidence of *F. verticillioides* in the seeds that were submitted to all forms of inoculation. To verify the transmissibility of the seed pathogen to the plants, after extractions of leaf and stem tissues, DNA extraction analyzes with specific primer of *F. verticillioides* were made. Seedling emergence showed a percentage higher than 90% in all hybrids studied.

Key words: PCR, transmissibility, mycoflora, sanity, *Zea mays*.

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos patógenos responsáveis pelas principais doenças do milho (*Zea mays* L.) é transmitida pelas sementes, trazendo consequências como a podridão de sementes e o tombamento de plântulas, redução da germinação e do vigor (KIMATI, 1980). Além dos microrganismos fitopatogênicos, também podem ser encontrados os contaminantes ou oportunistas, como por exemplo, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e outros, os quais podem deteriorar as sementes armazenadas, reduzindo as porcentagens de germinação e vigor.

O fitopatógeno *Fusarium verticillioides* ((Saccardo) Nirenberg) está entre os mais importantes na cultura do milho, causando doenças diversas como podridão radicular, morte de plântulas, podridão de espiga, podridão de colmo, podendo levar à reduções na produtividade e qualidade de grãos em todo o mundo (MUNKVOLD, 2003).

No Brasil, *F. verticillioides* é de ocorrência comum e frequente em sementes e grãos de milho produzido em todas as regiões do país (RIBEIRO et al., 2005; NERBASS et al., 2008).

É sabido que *F. verticillioides* tem a capacidade de transmissão das sementes para as espigas de forma sistêmica (WILKE et al., 2007). No entanto, é importante estudar na cultura do milho sua introdução, estabelecimento e transmissão da parte aérea para as sementes em função da época de infecção das plantas.

A semente representa uma das vias mais eficientes de transporte de fitopatógenos, e por consequência, a transmissão de doenças. Do ponto de vista sanitário, a semente ideal seria aquela livre de qualquer microrganismo indesejável. Porém, isso nem sempre é possível, uma vez que a sua qualidade é altamente influenciada pelas condições climáticas sob as quais são produzidas e armazenadas.

Os fungos associados às sementes podem causar sua deterioração, interferir na população de plantas e também serem transmitidos da semente para plântula ou planta jovem, colonizando órgãos radiculares e aéreos (MCGEE, 1988; CASA et al., 2006). Machado (2000) relata que os fungos também são responsáveis pela transmissão de patógenos para a parte aérea e sistema radicular da planta, decréscimo da qualidade fisiológica e morte das plântulas resultantes.

O controle das podridões de grãos envolve ações integradas, dentre elas destacam-se o manejo dos restos culturais, a rotação de culturas e a utilização de cultivares resistentes. Porém, cada vez mais tem se tornado uma prática comum, a utilização por parte de alguns

agricultores, de híbridos com resistência variada aos fungos causadores de podridão de grãos, fazendo com que a importância dessas doenças aumente a cada safra (CASA et al., 2006).

Na busca para obtenção de genótipos mais resistentes à podridão de espigas, deve-se testar métodos artificiais de inoculação do fungo *F. verticillioides*, agente causal da doença. Por outro lado, é importante diagnosticar a presença e identificação, em laboratório, dos fungos que estão incidindo sobre as espigas. Segundo Mendes et al, 2011), o teste de sanidade (*blotter test*) é uma alternativa prática e viável para esta finalidade. Corroborado com essa afirmativa, Mario e Reis (2001), afirmam que este teste permite identificar e estudar a reação de cada espécie de fungo separadamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a patogenicidade, transmissão e incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho oriundas de espigas inoculadas com diferentes métodos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a patogenicidade de *F. verticillioides* em plantas de milho e a transmissão planta-semente;

Avaliar a incidência de *F. verticillioides* e métodos de inoculação;

Avaliar a influência do grau de infestação da semente e a interferência na germinação e emergência das plantas de milho;

Identificar a sensibilidade das técnicas de PCR e detecção de *F. verticillioides* em amostras de sementes com diferentes incidências fúngicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia e campo experimental da Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi-TO.

3.1 Isolamento do fungo e produção de inóculo

Para o isolamento do fungo, sementes sintomáticas foram analisadas quanto à presença de *F. verticillioides*, identificados com base em sua morfologia típica, que se resume na produção de longas cadeias de microconídios produzidos em monofiálides (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Em seguida, o fungo foi transferido para placas de Petri com meio BDA (Batata Dextrose Ágar), onde permaneceu incubado por sete dias em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a produção do inóculo foi realizada a purificação dos isolados, onde foi utilizada a técnica da cultura monospórica (FERNANDES, 1993). Os fragmentos dos micélios dos fungos foram colocados em 5mL de água destilada e esterilizada, agitados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar. Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a observação dos conídios germinados em microscópio óptico. Os conídios que germinaram isoladamente foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA para a multiplicação dos inóculos.

3.2 Identificação molecular do isolado

O DNA de *F. verticillioides* foi extraído no laboratório de Controle Biológico de Doenças da Universidade Federal do Tocantins, em Gurupi, de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). A biomassa coletada, foi pulverizada em almofariz e pistilo, com auxílio de nitrogênio líquido até um pó bem fino, transferido para um microtubo de 2 mL. Adicionou-se 1 mL de tampão de extração pré-aquecido a 65°C (2% p/v de CTAB; 2,5% p/v de PVP-40; 2M NaCl; 2% de 2-β-mecaptoetanol; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) na amostra, homogeneizado em vórtex durante 30 segundos e incubados em banho maria por 40 minutos a 65°C , sendo estes homogeneizados por inversão a cada 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas ($18.000 \times g$) durante 10 minutos, logo após a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo microtubo de 2 mL. Foram adicionados 600 μL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (na proporção 24:1 v/v)

seguido por homogeneização em vórtex durante 30 segundos e centrifugados (18.000 x g) por 10 minutos, buscando-se desproteinar as amostras. O sobrenadante gerado foi coletado e transferido para um novo microtubo, agora de 1,5 mL e as amostras tratadas com 4 µL da enzima RNase (100 µL mL⁻¹) sendo sua reação realizada a 37°C durante 30 minutos. Logo após, foram adicionados 240 µL de álcool isopropílico gelado, seguido de uma homogeneização por inversão e incubado a -20°C por overnight. A extração foi finalizada com as amostras centrifugadas a (18.000 x g) durante 20 minutos, o sobrenadante formado foi descartado e lavado o precipitado com 400 µL de etanol absoluto, seguido de uma segunda centrifugação (18.000 x g) durante 5 minutos. O precipitado formado foi seco à 37 °C durante 10 minutos e ressuspendidos em 30 µL de água ultrapura. A concentração e qualidade do DNA foi determinada em espectrofotômetro tipo BioDRO, seguido por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X, corado com “Neotaq Brillhante Green Plus DNA stain” (Neobio), corridos em cuba de eletroforese (Loccus 22 Biotecnologia) a 110 V durante 30 minutos, analisados em fotodocumentador (Gel Logic 112). O marcador de DNA de 1 kb (Kasvi) foi usado como padrão de peso molecular.

3.3 Amplificação do DNA por PCR

Os pares de primers usados na reação foram os iniciadores VER-1 (5'-CTT CCT GCG ATG TTT CTCC-3') e VER-2 (5'-AAT TGG CCA TTG GTA TTA TAT ATCTA-3') para amplificar o gene específico calmodulina de isolados de *F. verticillioides*.

A amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, sendo 25 µL de Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (1,5 mM MgCl₂), 5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador VER-1 e VER-2 (10 mM), 10 µL de água ultrapura e 5 µL das amostras de DNA obtidas.

A reação de PCR foi conduzida em termociclador (Techne TC-5000). Para os iniciadores VER-1 e VER-2 foi programado com um ciclo inicial de 4 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 50 segundos a 94°C de desnaturação e anelamento de 50 segundos a 56°C, extensão de 1 minuto a 72°C e extensão final conduzida durante 7 minutos a 72°C.

Os produtos da amplificação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X, corado com “Neotaq Brillhante Green Plus DNA stain” (Neobio), corridos em cuba de eletroforese (Loccus Biotecnologia) a 110 V durante 30 minutos, analisados em fotodocumentador (Gel Logic 112). O marcador de DNA de 1 kb (Kasvi) foi usado como padrão de peso molecular.

Isolados da mesma amostra submetida a análise de PCR foram enviados para o Laboratório Agrônomo, credenciado pelo Ministério da Agricultura para uma segunda análise de PCR e sequenciamento para confirmação.

3.4 Origem das sementes e local do experimento

As sementes foram provenientes de ensaio implantado na área experimental da Universidade Federal do Tocantins - UFT, campus de Gurupi, localizado nas coordenadas geográficas: latitude de 11°44'44.866"S e longitude de 49°3'8.968"O e altitude de 278 metros. O município de Gurupi, no estado do Tocantins, Brasil, está inserido no Bioma Cerrado e segundo a classificação de Köppen, o clima da região é Aw, definido como tropical quente e úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno (KÖPPEN-GEIGER, 1928). A temperatura média anual está em torno de 26,4 °C, com precipitação de 1.632mm (SAMANI e HARGREAVES, 1985). O período de instalação deste experimento foi de 20 de fevereiro a 15 de junho de 2016.

As sementes utilizadas nos testes foram provenientes de 10 genótipos de milho, três métodos de inoculação (natural, injetável e spray), com três repetições.

Quadro 1: Características de híbridos de milho e suas respectivas detentoras.

| HÍBRIDOS | EMPRESA | CARACTERÍSTICAS |
|----------|----------------|--|
| P30K75Y | DuPont Pioneer | Híbrido simples modificado, de ciclo precoce, possui a tecnologia Yield gard que confere a resistência a insetos da ordem lepidóptera. |
| P32R48YH | DuPont Pioneer | Híbrido simples, de ciclo super precoce, possui a tecnologia Yield gard e Herculex que conferem resistência a insetos da ordem lepidóptera. |
| P3250 | DuPont Pioneer | Híbrido triplo, de ciclo precoce, convencional. |
| P3340YHR | DuPont Pioneer | Híbrido simples, de ciclo super precoce, possui a tecnologia Yield gard e Herculex que conferem resistência a insetos da ordem lepidóptera e também possui a tecnologia RR, que confere a resistente ao herbicida glifosato. |
| P3630H | DuPont Pioneer | Híbrido simples, de ciclo precoce, possui a tecnologia Herculex que confere a resistência a insetos da ordem lepidóptera. |

| | | |
|------------|---------------------|---|
| P4285H | DuPont Pioneer | Híbrido simples, de ciclo precoce, possui a tecnologia Herculex que confere a resistência a insetos da ordem lepidóptera. |
| DKB240PRO2 | Dekalb | Híbrido simples, de ciclo super precoce, possui a tecnologia VT PRO 2 que confere a proteção a pragas. |
| DKB390PRO2 | Dekalb | Híbrido simples, de ciclo precoce, possui a tecnologia VT PRO 2 que confere a proteção a pragas. |
| DKB310PRO2 | Dekalb | Híbrido simples, de ciclo normal, possui a tecnologia VT PRO 2 que confere a proteção a pragas. |
| DOW30A37PW | Dow AgroSciences | Híbrido simples possui tecnologia de tolerância ao glifosato e tolerância a algumas pragas. |

Cada repetição foi composta por 6 linhas de 4,5 metros e 30 plantas por cada linha. Cada método de inoculação foi composto por duas linhas. Nos tratamentos com inoculação, todas as plantas das linhas foram inoculadas, exceto as duas primeiras e duas últimas plantas. Duas linhas foram destinadas à inoculação da suspensão de conídios de *Fusarium verticillioides* na forma injetável no centro da espiga; outras duas linhas foram destinadas à inoculação da suspensão de conídios do fungo na forma de spray sob os estilo-estigmas; deixaram-se também duas linhas destinadas à testemunha (infecção natural), onde não sofreu nenhum tipo de inoculação artificial. Em ambos os métodos artificiais, realizou-se a inoculação de 2mL desta suspensão por espiga quando as plantas estavam em estágio fenológico R1, caracterizado como "florescimento e polinização", com os estilo-estigmas começando a escurecer, aproximadamente entre o sétimo e o décimo dia após o início do florescimento, período de maior susceptibilidade a infecção (MUNKVOLD et al, 1997). No tratamento testemunha, as plantas foram molhadas apenas com água da irrigação. Nenhum tipo de fungicida foi aplicado nas plantas do experimento.

3.5 Colheita das espigas e avaliação do experimento

Quando os genótipos estavam na fase fenológica R6, caracterizada como "Maturação fisiológica", iniciou-se o monitoramento da umidade dos grãos até atingir 17% de umidade. Em seguida, foram colhidas um total de 150 espigas, sendo coletadas 50 espigas por cada tratamento de inoculação. Posteriormente, as espigas foram dispostas no secador automatizado para que os grãos atingissem umidade entre 12-14%, para em seguida,

proceder-se a debulha. No ato da debulha, as espigas foram dispostas uma ao lado da outra para a avaliação de severidade da doença.

3.6 Avaliação de Severidade

A avaliação da severidade da doença foi realizada momentos antes da debulha dos grãos, quando estes se encontravam colhidos. A avaliação foi feita de forma visual e comparativa onde foi atribuída uma nota visual de acordo com os aspectos das espigas. A severidade foi avaliada por meio da seguinte escala diagramática que estima a porcentagem da área da espiga com sintomas de podridão, caracterizada pela cobertura com micélio de coloração branco a róseo e pela presença de grãos escurecidos e/ou com estrias brancas no pericarpo, sendo Grau 1 = 0% (sadia), 2 = 0,5%, 3 = 10%, 4 = 30%, 5 = 50%, 6 = 70%, 7 = 80%, 8 = 90% e 9 = 100% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção (AGROCERES, 1996).

As notas de 1 a 3 foram atribuídas aos híbridos classificados como de alta a mediana resistência. As notas 4 a 6 foram dadas aos híbridos classificados como de mediana susceptibilidade e as notas de 7 a 9 foram atribuídas aos híbridos classificados como de mediano a altamente susceptíveis.

3.7 Detecção de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho com diferentes níveis de incidência

Diferentes níveis de infecção fúngica foram formulados, obtidas a partir da inoculação artificial com cinco concentrações diferentes do fungo, sendo estas com uma variação de 100, 20, 10, 2, e 1% de incidência de *F. verticillioides* nas sementes, além de um controle negativo, usando sementes livres sadias com 0% de incidência.

As amostras de sementes sadias, e as amostras de sementes com diferentes níveis de infecção, foram trituradas em um moinho refrigerado até se obter um pó bem fino. Aproximadamente 1g de cada amostra foi pulverizado com auxílio de nitrogênio líquido e submetido a extração do DNA fúngico. Tanto o procedimento de extração, quanto a amplificação foram conduzidos sobre as mesmas condições aplicadas durante a extração e amplificação do DNA dos isolados, descritos anteriormente nas Seções 3.2 e 3.3.

3.8 Transporte de fungos associados às sementes

O levantamento da população fúngica associada às sementes de milho foi realizado por meio do método do papel de filtro ou *blotter test* (BRASIL, 2009). Para isso, utilizou-se caixa acrílica tipo *gerbox*, desinfestada com álcool 70%, contendo em seu interior duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com 50 mL de água destilada estéril. As sementes de milho utilizadas foram provenientes de plantas inoculadas com *F. verticilloides* no estágio fenológico R1, caracterizado como “florescimento e polinização”, com estilo-estigmas começando a escurecer aproximadamente entre o sétimo e o décimo dia após o início do florescimento, período de maior susceptibilidade a infecção (MUNVOLD et al, 1997).

Os experimentos seguiram o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 10 (genótipos de milho) x 3 (métodos de inoculação) e quatro repetições. Os genótipos utilizados foram: P30K75Y, P32R48YH, P3250, P3340YHR, P3630H, P4285H, DKB240PRO2, DKB390PRO2, DKB310PRO2, DOW30A37PW. Os três métodos de inoculação consistiram de natural, injetável e spray. Cada repetição consistiu de um Gerbox contendo 25 sementes.

As sementes provenientes de cada lote foram submetidas à assepsia. As desinfestações foram realizadas emergindo-se as sementes em uma sequência de solução de álcool 50%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos e posteriormente, duas sequências de lavagens em água destilada esterilizada.

As sementes foram dispostas individualmente e, posteriormente, acondicionadas em uma sala de incubação, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 24 horas. Em seguida, foram colocadas em congelador (-20°C) por 24 horas para inibir por completo o processo de germinação das sementes. Posteriormente, os *gerboxes* foram colocados novamente em câmara de incubação por cinco dias com fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram até a avaliação. A análise sanitária das sementes foi feita individualmente em cada *gerbox*, com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico. Para identificação dos fungos lâminas foram preparadas e visualizadas em microscópio ótico, anotando-se a incidência (%) de todos os gêneros encontrados. Foram utilizadas na identificação literaturas especializadas como Barnett e Hunter (1998) e Watanabe (2010). Os fungos foram isolados e cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA).

3.9 Teste de patogenicidade

A patogenicidade do fungo *F. verticillioides* foi avaliada por meio de inoculações na parte aérea de plantas de milho. Foram utilizados um total de seis plantas do híbrido 3H842 (híbrido triplo da Embrapa Milho e Sorgo).

Para a obtenção das plantas, 10 sementes sadias foram semeadas em vasos de 20L contendo uma mistura de 75% de solo, 15% de substrato estéreis e 10% de esterco bovino. Após 35 dias do plantio, realizou o desbaste deixando duas plantas/vaso e posteriormente a pulverização da suspensão de conídios de *F. verticillioides* com o auxílio de um borrifador manual, nas folhas das plantas de milho, na concentração 2×10^6 conídios mL⁻¹, ajustada com uma Câmara de Neubauer. Para testemunha foi borrifada água nas folhas das plantas.

Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida escura por 48 horas com temperatura controlada de 25°C. Em seguida, foram levadas para casa de vegetação, onde permaneceram até a colheita das espigas. Foram selecionadas um total de seis plantas (3 testemunhas e 3 inoculadas) foram cortadas, feitas assepsias e fragmentadas em pedaços de 5mm de raiz, caule e folhas. Em seguida foram incubadas em *gerboxes* para detecção da presença do fungo nos tecidos da planta assintomática. Quando visualizada a presença do fungo na planta inoculada, o fungo foi reisolado e cultivado em meio BDA (ALFENAS e MAFIA, 2007), com a finalidade de confirmação do agente causal visando o cumprimento de todas as etapas dos Postulados de Koch. Também realizou-se a análise molecular das mesmas, para confirmação da presença de *F. verticillioides* nas plantas.

3.10 Teste de emergência e transmissão semente-plântula de *Fusarium verticillioides* em diferentes órgãos de plantas de milho

O ensaio foi realizado em local isolado e distante de lavouras comerciais. Para cada tratamento foram semeadas 200 sementes não desinfestadas, divididas em quatro repetições de 50 sementes cada, em delineamento inteiramente casualizado. A semeadura foi realizada em bandejas de 10 cm de largura por 30 cm de comprimento, contendo areia estéril. Foi mantida diariamente a umidade do substrato por meio de irrigação manual. Aos sete dias após a semeadura, foi avaliada a emergência de plântulas.

Ao final de 35 dias da semeadura foram coletadas 30 plantas, sendo dez plantas de cada tratamento. As plantas foram coletadas separadamente, depois realizou-se processo de

assepsia com desinfestação em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 40 segundos e tríplice lavagem em água destilada estéril. Após desinfestação foram separados os órgãos das plantas: raiz, caule e folhas. Foram acondicionadas em placas contendo meio de cultura BDA devidamente identificadas, posteriormente levadas para sala de incubação, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante cinco dias.

Ao final do período de incubação realizou-se a avaliação para constatação da presença de *F. verticillioides* nos diferentes órgãos das plantas, com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico.

3.11 Procedimento estatístico

Após a realização da análise de variância, a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

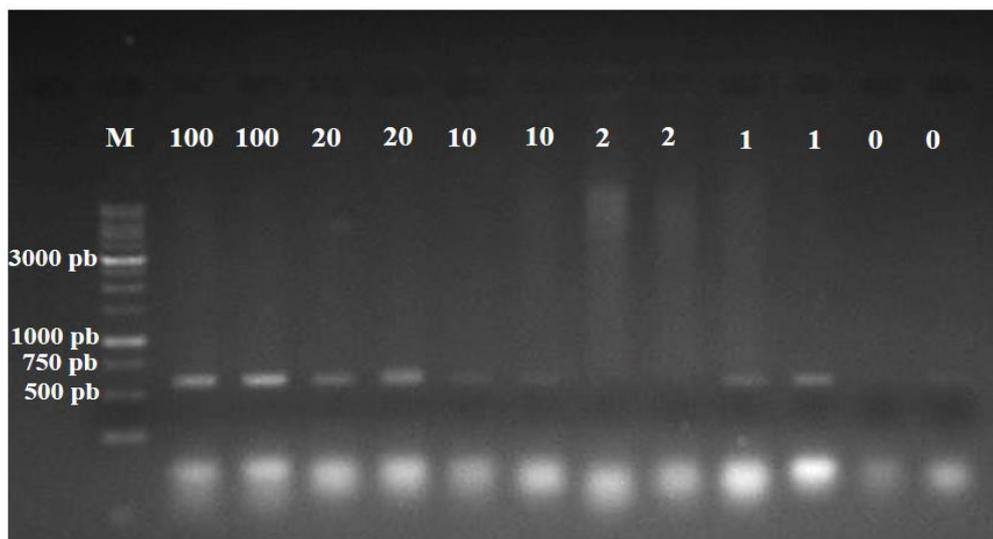
4.1 Identificação molecular e amplificação de DNA de *Fusarium verticillioides*

Os pares de primers e a reação de PCR amplificaram de maneira satisfatória todas as concentrações de DNA avaliadas. Revelando bandas de peso molecular igual a 580pb aproximadamente e resolução em gel, evidenciando a sensibilidade da técnica em produzir cópias de DNA; assim como sua capacidade em produzir resultados precisos de detecção em baixas concentrações de DNA-alvo presente. Desta forma, foi confirmado isolamento do patógeno *F. verticillioides*.

4.1.1 Sensibilidade na detecção de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho infectadas

Com a metodologia adotada, a técnica de PCR foi capaz de revelar até o menor nível de incidência de *F. verticillioides* produzida, sendo capaz de detectar em até 1% de infestação em sementes de milho, dentre o DNA extraído (Figura 1), os primers foram sensíveis ao ponto de revelar quantidades mínimas do material genético do patógeno.

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da região VER-1 e VER-2 do produto da extração de DNA de sementes de milho com diferentes incidências de *F. verticillioides* presentes. Sendo representados: 100, 20, 10, 2, 1 e 0 respectivamente as porcentagens de incidência 100%, 20%, 10%, 2%, 1% e nulo. Marcador (M) 1 kb (KASVI).



Resultados semelhantes foram encontrados por Barrocas et al. (2012), ao utilizarem a técnica de PCR na detecção de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho artificialmente infectadas, onde obteve uma sensibilidade de até 2% de incidência fúngica nas sementes utilizando primers específicos.

Segundo Magculia e Cumagun (2011), o uso de primers específicos para detecção de *F. verticillioides* aplicada à técnica de PCR, é uma excelente ferramenta para a classificação morfológica e molecular, quando usado para sua identificação em grãos armazenados de arroz e milho.

4.2 Transporte de fungos associados às sementes

Para a incidência de *F. verticillioides* inoculados de diferentes formas em plantas de milho em estágio reprodutivo R1 (florescimento e pendoamento) em função do genótipo, nota-se que houve significância ($P \leq 0,05$) para as variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância sobre a incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho em função do genótipo e do método de inoculação.

| FV | GL | SQ | QM | Fc | Pr>Fc |
|----------------------|-------|-----------|----------|--------|--------|
| INOCULA | 2 | 51476,13 | 25738,07 | 595,18 | 0,000* |
| LOCAL | 1 | 15232,27 | 15232,27 | 352,24 | 0,000* |
| CULTIVAR | 9 | 9780,27 | 1086,70 | 25,13 | 0,000* |
| INOCULA*CULTIVAR | 18 | 14566,53 | 809,25 | 18,71 | 0,000* |
| LOCAL *CULTIVAR | 9 | 629,07 | 69,90 | 1,62 | 0,113* |
| INOCULA*LOCAL | 2 | 3212,13 | 1606,07 | 37,14 | 0,000* |
| INOCULA*LOCAL *CULTI | 18 | 3286,53 | 182,59 | 4,22 | 0,000* |
| Erro | 180 | 7784,00 | 43,24 | | |
| Total | 239 | 105966,93 | | | |
| CV | 14,59 | | | | |
| Média | 45,07 | | | | |

*Significativo ao nível de cinco por cento de probabilidade, teste F, Scott Knott. $P \leq 0,05$

Foi observada a incidência predominante do fungo *F. verticillioides*, na forma spray comparando-se com os demais tratamentos, desta forma todos os genótipos avaliados apresentaram maior incidência do patógeno quando inoculados com spray (Tabela 02, Figura 02).

Tabela 2. Incidência (%) de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho em função do genótipo e do método de inoculação.

| Híbridos | Natural | Injetável | Spray | Média |
|---------------|---------|-----------|-------|-------|
| DKPDKB240PRO2 | 48 aB | 64 aA | 73 bA | 61.7 |
| P3340YHR | 53 aB | 50 bB | 71 bA | 58.0 |

| | | | | |
|---------------|-------|-------|-------|-------|
| P3630H | 43 aC | 61 aB | 71 bA | 58.3 |
| 32R48YH | 34 bC | 61 aB | 75 bA | 56.7 |
| MFRDKB310PRO2 | 28 bC | 52 bB | 72 bA | 50.7 |
| P3250 | 24 cC | 41 bB | 84 aA | 49.7 |
| DKPDB390PRO2 | 19 cC | 48 bB | 82 aA | 49.7 |
| 30K75Y | 32 bC | 63 aB | 78 bA | 57.7 |
| P4285H | 31 bB | 14 cC | 76 bA | 40.3 |
| DOW30A37PW | 37 bB | 21 cC | 85 aA | 47.7 |
| Média | 34.9 | 47.5 | 76.7 | 53.05 |

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Como foi possível observar, houve diferença estatística na incidência de *F. verticillioides* em sementes de milho entre os híbridos nas diferentes formas de inoculação, sendo que na inoculação de forma natural os híbridos DKPDB390PRO2 e P3250 apresentaram menor incidência do patógeno nas sementes. Dentre os genótipos testados os mais susceptíveis foram P3340YHR, DKPDKB240PRO2 e P3630H respectivamente. A infecção natural das espigas resultou em menor incidência do patógeno nas sementes que os demais tratamentos, demonstrando assim que a doença ocorre nas plantas, mesmo sem a inoculação artificial do patógeno nas espigas, porém, em menor nível quando comparado à inoculação de forma artificial.

Na inoculação pelo método injetável os híbridos P4228H e DOW30A37PW apresentaram menor incidência, diferindo assim dos demais genótipos. No entanto, os híbridos que foram inoculados com spray (DOW30A37PW, P3250, DKPDB390PRO2) apresentaram maior incidência, enquanto os demais híbridos não apresentaram diferença estatística. Corroborando com esses resultados Clements et al. (2003), observaram alta incidência de *F. verticillioides* em híbridos o que tem sido uma grande preocupação nas regiões produtoras de milho, pois além do dano causado na espiga e no grão, ocorre também a produção de toxinas, como por exemplo, as fumonisinas. Condições ambientais quente e seco deixam a cultura do milho predisposta a infecção de *Fusarium* e contaminação por fumonisinas.

Na média geral os híbridos inoculados de forma natural apresentaram menor incidência de *F. verticillioides* (34,9%) do que os demais inoculados na forma injetável (47,5%) e spray (76,7%), respectivamente. Corroborando com esses resultados, Mendes (2011), realizou a inoculação de 5 mL de uma suspensão com 4×10^4 conídios mL⁻¹ de *F. verticillioides* por aspersão nos estilo-estigmas de cada planta. As espigas de cada tratamento

foram colhidas e submetidas ao teste de sanidade, sendo que as mesmas apresentaram o patógeno sete dias após a incubação.

Dentre os vários fungos responsáveis pela deterioração de sementes destacam-se os do gênero *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Entre os prejuízos causados pelos fungos está o emboloramento visível, a descoloração, o odor desagradável, a perda de matéria seca, o aquecimento, as mudanças químicas e nutricionais, além da produção de micotoxinas (BENTO et al., 2012). Esta contaminação pode tornar as sementes impróprias para utilização, resultando em grandes perdas econômicas.

Os grãos dos híbridos inoculados na forma injetável apresentaram maior incidência do patógeno do que a testemunha, porém os híbridos DOW30A37PW e P4285H não apresentaram esta mesma tendência (Figura 02).

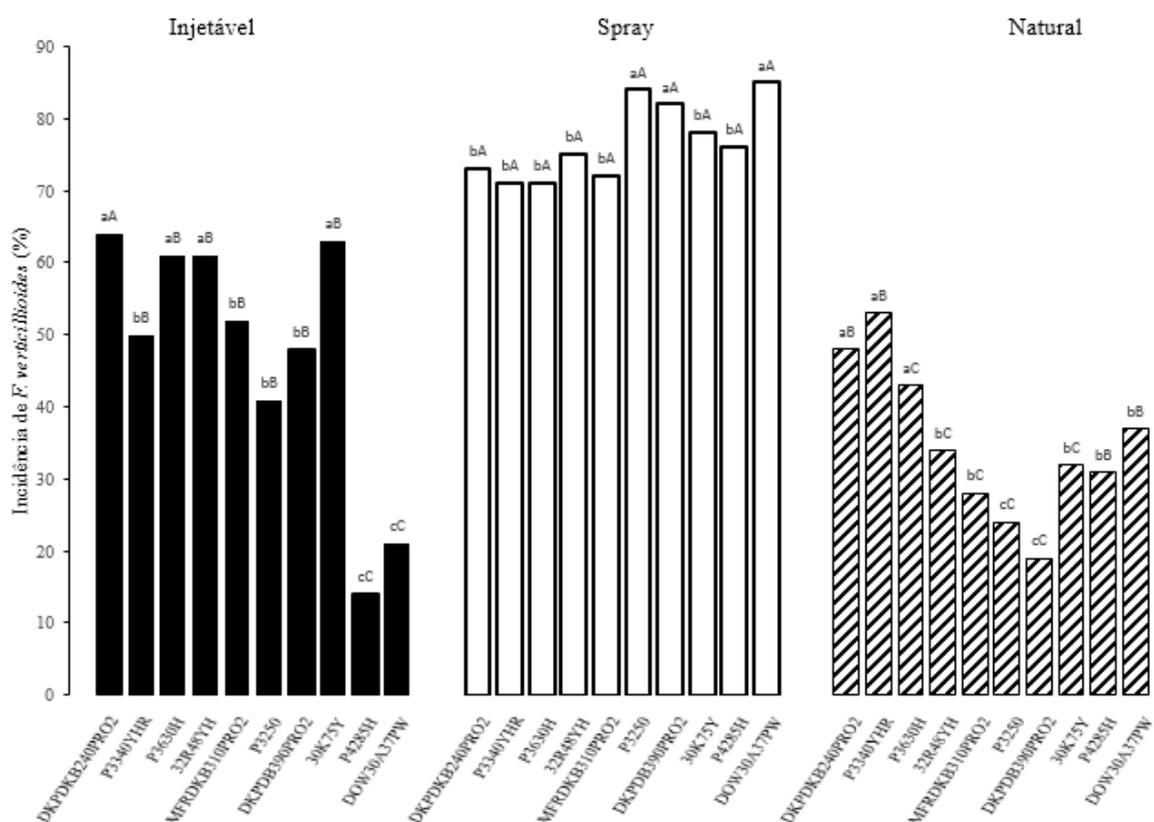


Figura 2. Incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho submetidas a inoculação de forma natural, injetável e spray.

Barros e Juliatti (2012) fizeram levantamento de fungos em amostras de sementes de milho através de testes de sanidade de sementes, pelo método *Blotter Test* e verificaram que a maior incidência foi de *Fusarium* spp. com 37%, seguido de *Penicillium* spp. com 17%.

A alta incidência de *Fusarium* spp. pode ser explicada com base nas características do fungo, que apresenta elevada taxa de esporulação e dispersão (MENDES et al., 2011) em condições de umidade e temperatura mais elevadas (BENTO et al., 2012).

4.3 Teste de patogenicidade

Após os isolamentos em meio BDA da micoflora presente em plântulas de milho lesionadas pôde-se comprovar a presença de *F. verticillioides* em todas as partes da planta. Fato este que pode estar relacionado ao fungo causar infecção latente na fase vegetativa. Desta forma, mesmo estando presente internamente na planta, a doença só se expressa na fase reprodutiva, causando assim maiores perdas na produção.

A partir da inoculação nas folhas da suspensão de conídios de *F. verticillioides* pode-se verificar descoloração no caule e pequenos pontos de coloração avermelhada no colmo das plantas próximas à bainha das folhas mais jovens, confirmando assim a patogenicidade do fungo. Após os reisolamentos, novamente pôde-se confirmar a presença do patógeno em todas as partes da planta.

Segundo Pereira et al. (2005), em plantas atacadas por *F. verticillioides* pode-se observar crescimento cottonoso de coloração branca, constituído de micélio e conídios. Segundo McGee (1990) e Pinto (1998), no milho, sob condições favoráveis, o fungo *F. verticillioides* pode infectar as raízes e os colmos diretamente ou invadindo a planta por ferimentos, além disso, este fungo pode ser transmitido pelas sementes e de acordo com a literatura produz grande quantidade de fumonisinas.

4.4 Teste de transmissibilidade e emergência

De acordo com a avaliação de emergência e transmissibilidade de *F. verticilliodes* em sementes de milho, o fungo é transportado na semente, mas não é visivelmente patogênico às plântulas de milho na fase vegetativa. Este fato pôde ser comprovado no presente trabalho (Figura 3), pois as porcentagens de emergência das sementes foram todas acima de 90% e nesta fase, as plântulas não demonstraram nenhum sintoma da doença. Para comprovar a

transmissibilidade do patógeno das sementes para as plantas, após as coletas dos tecidos de folhas e caules foram feitas análises de extração de DNA com primer específico VER-1 e VER-2 de *F. verticillioides*.

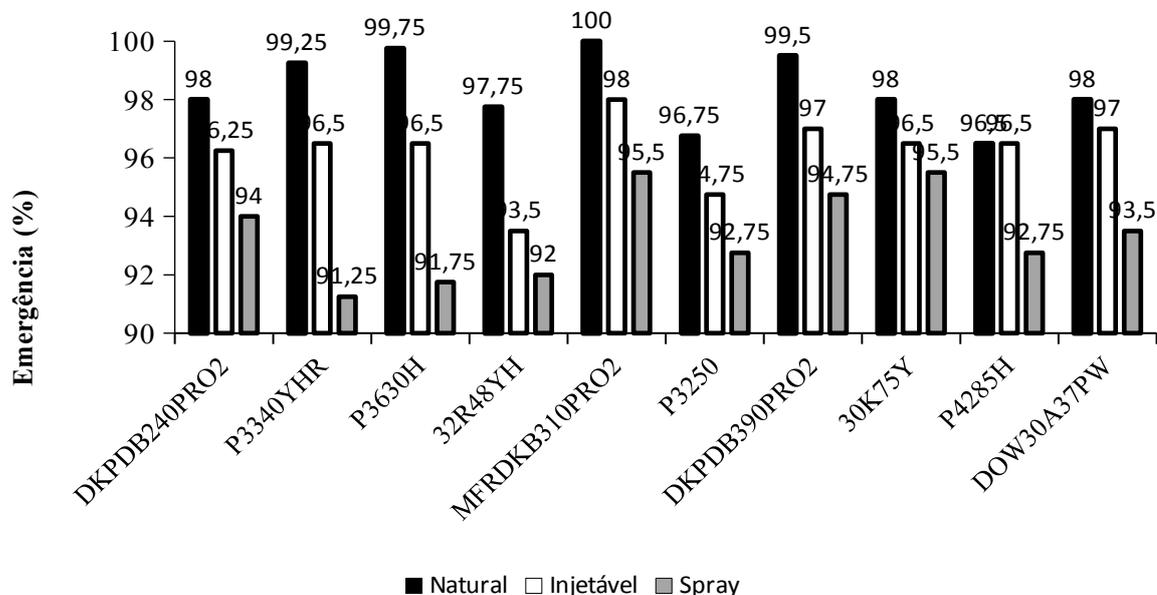


Figura 3: Emergência de plântulas provenientes de genótipos de milho inoculados de forma natural, injetável e spray com *Fusarium verticillioides*.

Pode-se observar que o fungo *F. verticillioides* não interferiu na emergência das plântulas de milho, pois as mesmas apresentaram porcentagem de emergência maior que 90% em todos os tratamentos. Isso pode ser explicado pelo fato do fungo atuar inicialmente como endofítico e cujos sintomas se expressarem apenas na fase reprodutiva, ocasionando maiores perdas nas espigas nesta fase.

Pode-se verificar que as sementes inoculadas na forma de spray apresentaram menor índice de emergência comparando-se com os demais tratamentos. Houve maior porcentagem de emergência das plântulas oriundas da testemunha, onde não houve inoculação artificial do patógeno, mas sim apenas infecção natural. Neste tratamento quase todos os híbridos apresentaram emergência superior a 95%. No entanto, os híbridos P3340YHR, P3630H e 32R48YH apresentaram menor porcentagem de emergência pelo método de inoculação com spray. Demonstrando assim que a inoculação com spray é o método que mais afeta a emergência de sementes de milho. Evidenciando ser a forma mais eficaz de inoculação.

Apesar de não ter sido observado sintomas nas plantas de milho, a análise da transmissibilidade de *F. verticillioides* pode comprovar sua transmissão via semente-planta a partir do isolamento de fragmentos das plantas. Em relação aos fungos do gênero *Fusarium*

sp. é sabido que este patógeno causa doenças diversas como podridão radicular, morte de plântulas, podridão de espiga e do colmo, podendo levar a reduções na produtividade e qualidade de grãos (MUNKVOLD, 2003). Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, Reid et al., (1999) consideram o *Fusarium* sp. como um fungo endofítico e onipresente na cultura, contudo, nem sempre patogênico.

Casa et al., (2006) relatam que quanto maior for a incidência do fungo na semente, maior será a eficiência da transmissão. Algumas espécies de *Fusarium* sp., dentre estas o *F. verticillioides*, apresentam padrões distintos, quanto à taxa de crescimento micelial e características patogênicas, em sementes e plântulas de milho, as quais podem representar risco ao estabelecimento da cultura, pela redução da germinação e emergência de plântulas (KUHNEM-JÚNIOR et al., 2013).

Segundo Glenn et al. (2008) e Yates et al. (2003), quando se utiliza a inoculação de uma suspensão de conídios de *F. verticillioides* aplicada diretamente na folha de milho, observa-se sintoma de redução de crescimento, e quando se utiliza a embebição prévia da semente em suspensão de conídios, se observa mais claramente a morte de plântulas.

Na figura 4, podemos observar que as sementes com maior porcentagem de germinação foram as da testemunha, inoculadas de forma natural. Somente com a contribuição dos fatores climáticos, como por exemplo, água e vento que são as formas de dispersão dos conídios do fungo mais comuns no campo. Em contrapartida, observa-se que a inoculação com spray apresentou maior quantidade de sementes não germinadas, o que pode ser explicado pelo fato do tratamento inoculado com spray apresentar maior incidência do fungo.

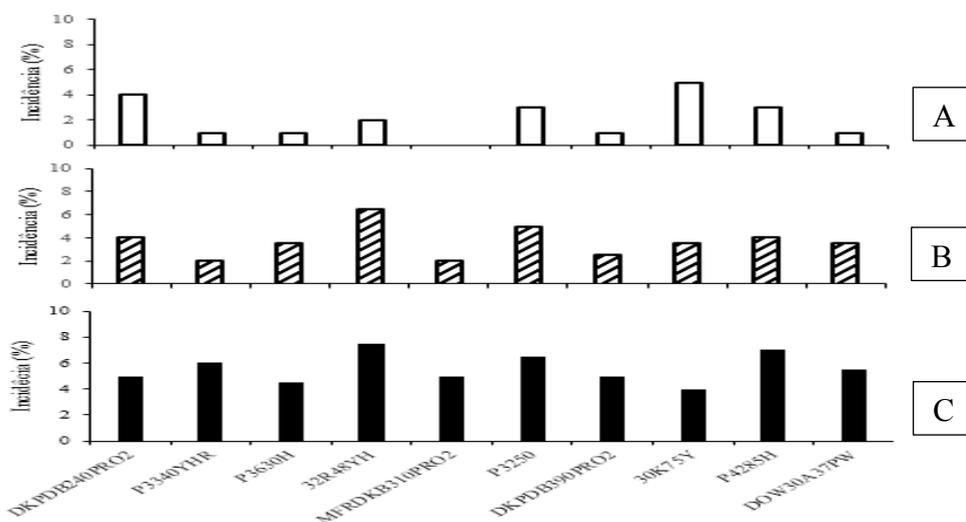


Figura 4: Incidência de *F. verticillioides* em sementes de milho não germinadas inoculadas com por meio natural (A), injetável (B), spray (C).

O híbrido 32R48YH apresentou maior quantidade de sementes não germinadas tanto na forma com spray quanto na injetável, entretanto na inoculação de forma natural todas as sementes germinaram e emergiram, ou seja, teve-se 100% de emergência.

A figura 4A, mostra que na testemunha, onde houve inoculação natural do fungo, houve menor número de sementes não germinadas, apresentando alguns híbridos com 100% de germinação e emergência. Em um estudo semelhante realizado por Kuhnem Júnior et al., (2013), trabalhando com isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *F. verticillioides* em sementes e plântulas de milho, observaram resultados diferentes dos encontrados neste trabalho, pois o mesmo verificou que nas sementes inoculadas com *F. verticillioides* houve uma redução na germinação em 69, 57%. No presente trabalho, a menor porcentagem de emergência foi de 92,5%, indicando que, mesmo o fungo estando presente nas sementes, não estava em nível de infecção suficiente que pudesse interferir na germinação e emergência das mesmas.

Foi possível notar que as sementes inoculadas na forma spray (figura 4 C) houve uma maior quantidade de sementes não-germinadas comparando-se com os demais tratamentos, porém pode ser observado também que em todas as sementes não germinadas tiveram presença de *F. verticillioides* em sementes de todos os tratamentos.

Em trabalhos realizados por Glenn *et al.* (2008) e Yates *et al.* (2003), mostraram sintomas de redução de crescimento, ou de estande, após o processo de inoculação de plântulas ou sementes de milho com *F. verticillioides* por meio de aspensão de uma suspensão de conídios ou por uma prévia embebição das sementes.

O fungo *Fusarium* spp. nem sempre afeta necessariamente a germinação das sementes, porém causa deterioração e compromete o desenvolvimento radicular da plântula (MUNKVOLD e O'MARA, 2002).

5 CONCLUSÕES

O método mais eficiente de inoculação artificial de *F. verticillioides* é do spray, na fase R1, caracterizado como "florescimento e polinização".

A transmissão planta-semente foi confirmada pela análise molecular, apesar do fungo em colonização inicial nas plantas apresentar infecção latente e as plântulas não terem apresentado sintomas aparentes.

As sementes oriundas de espigas inoculadas com spray apresentaram maior grau de incidência do patógeno e tiveram menor germinação e emergência em todos os híbridos de milho.

A técnica de PCR foi capaz de revelar a presença do patógeno nas sementes de milho em menor nível de incidência avaliado (1%).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCERES. **Guia agroceres de sanidade**. São Paulo: Sementes Agroceres. 1996, 72 p.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos de fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, p. 53-90, 2007.
- BACON, C.; GLENN, A.; YATES, I. *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. **Toxin Reviews**, n. 27, p. 1-36, 2008.
- BARNETT, H.; HUNTER, B. **Illustrated genera of fungi imperfect**. 4 ed., 1998, 218 p.
- BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. da C.; ALMEIDA, M. F. de.; BOTELHO, L. S.; VON PINHO, É. V. de R. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 218-224, 2012.
- BARROS, F. C.; JULIATTI, F. C. Levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de 2001-2008. **Bioscience Journal**, v.28, n.1, p.77-78, 2012.
- BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBURQUERQUE, M. C. F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, p. 44-49, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária**. Brasília, 2009.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; NERBASS, F.R. **Implicações epidemiológicas da transmissão de fungos em sementes de milho**. In: MANEJO de doenças de grandes culturas: feijão, batata, milho e sorgo. Lavras: UFLA. p. 202-212, 2006.
- CASA, R.T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia brasileira**, v. 31, n. 5, p. 427-439, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000500001>
- CLEMENTS, M. J.; KLEINSCHMIDT, C. E.; MARAGOS, C. M.; PATAKY, J. K.; WHITE, D. G. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 147-153, 2003.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.
- DUARTE, R. P.; JULIATTI, F. C.; LUCAS, B. V.; FREITAS, P. T. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Jornal**, v. 25, n. 4, p. 112-122, jul.ago. 2009.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 128 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciências e agrotecnologia**. v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.

GLENN, A. E.; ZITOMER, N. C.; ZIMERI, A. M.; WILLIAMS, L. D.; RILLEY, R. T. & PROCTOR, R. H. Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v. 21, n.1, p. 87-97, 2008.

IBGE. **Áreas dos Municípios**. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15761-areas-dos-municipios.html>>. Acesso em 03 nov. 2017.

KUHNEM-JÚNIOR, P. R.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v43n4/a11113cr2012-0864.pdf>

KIMATI, H. **Doenças do algodoeiro – *Gossypium* spp.** In: Galli, F. (Ed.) Manual de Fitopatologia. São Paulo. Editora Ceres, v. 2, p. 28-48, 1980.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory manual**. Blackwell Professional, Ames, p. 387, 2006.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. LAPS: UFPA: FAEPE, Lavras, MG, 2000.

MAGCULIA, N.; CUMAGUN, C. J. R. Genetic diversity and PCR based identification of fumonisin producing isolates of *Fusarium verticillioides* in corn. **Tropical Plant Pathology**. v. 36, p. 225-232, 2011.

MARIO, J.L. & REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia maydis* de *D. macrospora* em testes de patologia de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**. v. 26 p. 670-672, 2001.

MENDES, M. C.; PINHO, R. G. V.; MACHADO, J. DA C., ALBUQUERQUE, C. J. B.; FALQUETE, J. C. F. Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos fungos causadores de podridões de espiga. **Ciência agrotecnologia**. v. 35, n. 5, p. 931-939, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000500010>.

MUNKVOLD, G.P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 705-713, 2003.

MUNKVOLD, G. P.; O'MARA, J. K. **Laboratório e avaliação da câmara de crescimento dos tratamentos fungicidas de sementes para a semente de milho provocada por espécies de *Fusarium***. Doença das plantas v. 86, p. 143-150, 2002.

MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 2, p. 209-217, 1997.

MCGEE, D. C. Maize disease: a reference source for seed technologists. Saint Paul: **The American Phytopathological Society**, 1988.

MCGEE, D. C. **Maize diseases**. 2 ed. Minnesota: Apps Press, p. 150, 1990.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, p. 30-36, 2008.

PEREIRA, P.; IBÁÑEZ, F.; ROSENBLUETH, M.; ETCHEVERRY, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. **Analysis of the bacterial diversity associated with the Roots of maize (*zea mays* L.) through culture dependent and culture-independent methods**, International Scholarly Research Notices: Ecology, 2011. doi:10.5402/2011/938546.

PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 477-488, 2005.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; CASTILLO, C.; ETCHEVERRY, M. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biologic Control**, v. 53, p. 258-266, 2010.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Efficacy of bacterial seed treatments for the control of *Fusarium verticillioides* in maize. **Biocontrol**. v. 54, p. 103-111, 2009.

PINTO, N.F.J.A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 29), p. 44, 1998.

REID, L. M.; NICOL, R. W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J. D.; YOUNG, J.C.; ATEWART, D. W.; SCHAAFSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 1028-1037, 1999.

RIBEIRO, N. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E. N.; WILLE, L. A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1003- 1009, 2005.

SAMANI, Z. A.; HARGREAVES, G. H. **A crop water evaluation manual for Brazil – The Internation Irrigation Center**. Logan, Utah, USA: Department of Agricultural and Irrigation Engineering, Utha State University, 1985.

SARTORI, M.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Impact of osmotic/matric stress and heat shock on environmental tolerance induction of bacterial biocontrol agents against *Fusarium verticillioides*. **Reviews Microbiologic**. v. 161, p. 681-686, 2010.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species**. CRC press, 2010.

WILKE, A.L.; BRONSON, C. R. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v. 91, p. 1109-1115, 2007.

YATES, I. E.; ARNOLD J. W.; HINTON D. M.; BASINGER W.; WALCOTT, R. R. *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control. **Canadian Journal of Botany**, v. 81, p. 422-428, 2003.

CAPITULO II – TRANSMISSÃO DE *Fusarium verticillioides* EM SEMENTES DE MILHO EM FUNÇÃO DA ÉPOCA DE INOCULAÇÃO DAS PLANTAS

RESUMO

A maioria dos patógenos que ocorrem nos campos de produção de sementes podem ser transmitidos pelas sementes. Os mecanismos de transmissão utilizados pelos patógenos são variados e podem ser classificados de acordo com sua localização na semente (misturado, aderido à superfície ou localizado no interior da semente) e com o desenvolvimento do patógeno durante o crescimento da planta. Objetivou-se com este trabalho avaliar a transmissibilidade de *Fusarium verticillioides* inoculado em diferentes estádios fenológicos das plantas de milho. Foi inoculado o patógeno nas plantas nos estádios V7 e V9 (sete e nove folhas completamente abertas), R1 pendoamento, R2 grão leitoso, R4 grão farináceo e R6 maturação fisiológica. O experimento foi conduzido em vasos, em blocos casualizados, com seis repetições. Verificou-se a incidência do fungo através do teste de sanidade de sementes (*blotter test*). A significância do contraste entre os estádios fenológicos e as duas épocas de plantio, e a produtividade evidenciou a transmissão planta-semente de *F. verticillioides* em todos os estádios fisiológicos avaliados. Houve diferença significativa entre as épocas de inoculação do fungo nas plantas em diferentes estádios fenológicos e também na incidência do mesmo nas sementes. Foi verificado nos dois experimentos maior incidência do patógeno nas sementes oriundas de plantas inoculadas na fase reprodutiva. A utilização de inoculação artificial, em vasos, demonstrou que nos estádios fenológicos reprodutivos R2, R4 e R6 a planta de milho é mais susceptível à infecção com *F. verticillioides*, o que também resultou na diminuição da produtividade.

Palavras chaves: *Zea mays*, sanidade, grãos ardidos.

TRANSMISSION OF *Fusarium verticillioides* IN CORN SEEDS IN THE FUNCTION OF THE INOCULATION TIME OF THE PLANTS

ABSTRACT

Most of the pathogens that occur in the seed production fields can be transmitted by the seeds. The transmission mechanisms used by the pathogens are varied and can be classified according to their location in the seed (mixed, adhered to the surface or located inside the seed) and with the development of the pathogen during plant growth. The objective of this work was to evaluate the transmissibility of inoculated *Fusarium verticillioides* in different phenological stages of corn plants. The pathogen was inoculated in the stages V7 and V9 (seven and nine leaves completely open), R1 pendoamento, R2 milky grain, R4 farinaceous grain and R6 physiological maturation. The experiment was conducted in randomized blocks with six replicates. The incidence of the fungus was verified through the test of seed health (blotter test). The significance of the contrast between the phenological stages and the two planting seasons, and the productivity evidenced the plant-seed transmission of *F. verticillioides* in all the physiological stages evaluated. There was a significant difference between the inoculation times of the fungus in the plants at different phenological stages and also in the incidence of the same in the seeds. It was verified in both experiments a higher incidence of the pathogen in seeds from plants inoculated in the reproductive phase. The use of artificial inoculation in pots showed that in the reproductive phenological stages R2, R4 and R6 the maize plant is more susceptible to infection with *F. verticillioides*, which also resulted in decreased productivity.

Key words: *Zea mays*, sanity, burned grains.

1 INTRODUÇÃO

O patógeno *Fusarium verticillioides* ((Saccardo) Nirenberg) faz parte do complexo *Gibberella fujikuroi*, o qual compreende um grupo de aproximadamente 20 espécies associadas às doenças na cultura do milho (*Zea mays*), por exemplo, e a outras culturas de interesse econômico. Produz macroconídios e microconídios, constituindo um estado anamorfo da ordem Hypocreales (Walker et al., 2016). Esses microconídios são produzidos em grande quantidade nos resíduos do solo e são facilmente dispersos pelos insetos, pela chuva e em grandes distâncias pelo vento, o que o torna um foco de inóculo muito variável e de difícil quantificação dos microconídios (MAIORANO et al., 2008).

No milho, após as fases de polinização e fertilização, inicia-se o período de enchimento dos grãos, que se estende até a maturidade fisiológica. Esse período é bastante crítico para uma boa produção, por isso, o adequado equilíbrio em todo o sistema envolvido na fotossíntese é estritamente necessário. Qualquer fator que interfira negativamente no processo de fotossíntese nessa fase, como *stress* hídrico, temperaturas elevadas, desequilíbrios nutricionais, redução da radiação solar e perda de área foliar devido ao ataque de pragas e doenças, resultam em inadequado suprimento de carboidratos para enchimento dos grãos (EMBRAPA, 2010). Neste momento, os patógenos se aproveitam da debilidade da planta e causam injúrias, facilitando sua entrada (MENDES et al., 2012).

De acordo com a literatura consultada há carências de informações na cultura do milho em áreas tropicais relacionando os estádios fenológicos com a transmissão planta-semente, severidade da doença e produtividade.

Desta forma, o presente trabalho buscou identificar em qual estágio fenológico as plantas de milho estão mais susceptíveis à infecção por *F. verticillioides*, e o impacto sobre a severidade da podridão da espiga e produtividade do milho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar em qual fase fenológica a planta de milho está mais susceptível à infecção do fungo *Fusarium verticillioides* nas sementes.

2.2 Objetivos específicos

Comprovar a patogenicidade de *F. verticillioides* em plantas de milho.

Identificar em qual época as plantas de milho estão mais susceptíveis à infecção de *F. verticillioides* nas sementes.

Avaliar o nível de severidade das espigas e a presença de *F. verticillioides* através da análise sanitária de sementes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Influência da inoculação de *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos do milho sobre a transmissão pelas sementes

Os experimentos foram conduzidos em duas épocas dentro de um mesmo ano, em Gurupi, TO (um em janeiro e outro em julho de 2017). Foram conduzidos na área experimental da Universidade Federal do Tocantins (UFT), campus de Gurupi, localizado nas coordenadas geográficas: latitude de 11°44'44.866"S e longitude de 49°3'8.968"O e altitude de 278 metros. O município fica situado no sul do estado do Tocantins, Brasil, está inserido no Bioma Cerrado e segundo a classificação de Köppen, o clima da região é Aw, definido como tropical quente e úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno (Köppen-Geiger, 1928). A temperatura média anual está em torno de 26,4 °C, com precipitação de 1.632 mm (SAMANI e HARGREAVES 1985). Nesse local, os ensaios foram conduzidos por duas vezes, em vasos de 20 litros até a colheita. Com relação às datas, o primeiro experimento foi instalado na segunda quinzena do mês de janeiro e colheita na segunda quinzena do mês de maio de 2017; o segundo experimento foi implantado na segunda quinzena do mês de junho e colheita na primeira quinzena do mês de novembro em mesmo ano, após a maturidade fisiológica das plantas. Foi utilizado o híbrido 3H842 (híbrido triplo da Embrapa Milho e Sorgo), sendo dividido em estádios fenológicos para a inoculação de *F. verticillioides*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e seis repetições. Cada tratamento foi constituído de inoculações em diferentes estádios fenológicos, sendo: V7 (7 folhas abertas), V9 (9 folhas abertas), R1 (pendoamento), R2 (grão leitoso), R4 (grão farináceo) e R6 (maturação fisiológica). Para testemunha, foram utilizadas plantas sem inoculação do patógeno.

Para os dois ensaios foi utilizada a mesma metodologia. Foram inoculadas uma solução *F. verticillioides* na concentração de $2,7 \times 10^4$ conídios mL⁻¹ ajustada por meio de contagem em Câmara de Neubauer. As inoculações foram feitas nas plantas de cada tratamento, sempre no final do dia entre 17:00 e 18:00 horas, quando a temperatura se encontrava amena em torno de 28°C ± 2°C. Para a inoculação de *F. verticillioides*, foi utilizado o método de inoculação por aspersão da concentração de conídios direcionada para o tecido alvo da planta, de acordo com o estágio fenológico descrito.

3.2 Isolamento do patógeno e produção de inóculo

Para o isolamento do patógeno, sementes sintomáticas foram analisadas quanto à presença de *F. verticillioides*, identificados com base em sua morfologia típica, que se resume na produção de longas cadeias de microconídios produzidos em monofiálides (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Em seguida, com auxílio de uma pinça esterilizada conídios e hifas do fungo foram transferidos para placas de Petri com meio BDA (Batata Dextrose Ágar), onde permaneceu incubado por sete dias em BOD a 25 ± 2 °C. Para a produção do inóculo, foi realizada a purificação dos isolados, onde foi utilizada a técnica da cultura monospórica (FERNANDES, 1993). Os conídios do fungo foram colocados em 5mL de água destilada e esterilizada, agitados e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura ágar-ágar. Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a observação dos conídios germinados em meio ágar-ágar, através de microscópio óptico. Os conídios que germinaram isoladamente foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA para a multiplicação dos inóculos.

3.3 Teste de patogenicidade em plântulas

A patogenicidade do patógeno transportado pelas sementes de milho foi avaliada por meio de inoculações na parte aérea de plântulas. Para a condução do experimento, foram utilizadas sementes de milho híbrido triplo 3H842, utilizando DBC (Delineamento em Blocos Casualizados). As sementes foram semeadas em vasos (20 L), distribuídas em sete linhas com a testemunha, sendo que cada linha constitui de seis repetições (tratamento), onde foram inoculadas uma solução *F. verticillioides* na concentração de $2,7 \times 10^4$ conídios mL⁻¹ ajustada por meio de contagem em Câmara de Neubauer, em diferentes fases vegetativas da cultura (V7 – sete folhas abertas, V9 – nove folhas abertas, R1 - pedoamento, R2 - grão leitoso, R4 – grão farináceo, R6 – maturação fisiológica e testemunha).

As inoculações foram feitas nas seis plantas de cada tratamento, sempre no final do dia entre 17:00 e 18:00 horas, quando a temperatura se encontrava amena em torno de $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Para a inoculação de *F. verticillioides*, foi utilizado o método de inoculação por aspersão da concentração de conídios direcionada para o tecido alvo da planta, de acordo com o estágio fenológico descrito.

As espigas provenientes de cada um dos experimentos foram colhidas separadamente e em seguida foram debulhadas. Posteriormente os grãos provenientes de cada repetição foi pesada separadamente para análise da produtividade.

3.4 Avaliação de Severidade

A avaliação da severidade da doença foi realizada momentos antes da debulha dos grãos, quando estes se encontravam colhidos. A avaliação foi feita de forma visual e comparativa onde foi atribuída uma nota visual de acordo com os aspectos das espigas. A severidade foi avaliada por meio da seguinte escala diagramática que estima a porcentagem da área da espiga com sintomas de podridão, caracterizada pela cobertura com micélio de coloração branco a róseo e pela presença de grãos escurecidos e/ou com estrias brancas no pericarpo, sendo Grau 1 = 0% (sadia), 2 = 0,5%, 3 = 10%, 4 = 30%, 5 = 50%, 6 = 70%, 7 = 80%, 8 = 90% e 9 = 100% da área da espiga exibindo sintomas visíveis de infecção (AGROCERES, 1996).

As notas de 1 a 3 foram atribuídas aos híbridos classificados como de alta a mediana resistência. As notas 4 a 6 foram dadas aos híbridos classificados como de mediana susceptibilidade e as notas de 7 a 9 foram atribuídas aos híbridos classificados como de mediano a altamente susceptíveis.

3.5 Colheita das espigas e avaliação do experimento

Quando os genótipos estavam na fase fenológica R6, caracterizada como "Maturação fisiológica", iniciou-se o monitoramento da umidade dos grãos até atingir 17% de umidade. Em seguida, foram colhidas um total de 150 espigas, sendo coletadas 50 espigas por cada tratamento de inoculação. Posteriormente, as espigas foram dispostas no secador automatizado para que os grãos atingissem umidade entre 12-14%, para em seguida, proceder-se a debulha. No ato da debulha, as espigas foram dispostas uma ao lado da outra para a avaliação de severidade da doença.

3.6 Análise Sanitária

Para analisar em qual estágio fenológico a planta seria mais susceptível à infecção por *F. verticillioides*, foi feita análise sanitária, por meio do método do papel de filtro ou *Blotter test* (BRASIL, 2009). Para isso, utilizou-se caixa acrílica tipo *gerbox*, desinfetada com álcool 70%, contendo em seu interior duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com 50 mL de água destilada estéril. As sementes de milho utilizadas foram provenientes de plantas inoculadas com *F. verticillioides* em diferentes estágios fenológicos.

As sementes provenientes de cada tratamento foram submetidas à assepsia. As desinfestações foram realizadas emergindo-se as sementes em uma sequência de solução de álcool 50%, por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos e posteriormente, duas sequências de lavagens em água destilada esterilizada.

As sementes foram dispostas individualmente e, posteriormente, acondicionadas em uma sala de incubação, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante 24 horas. Em seguida, foram colocadas em congelador (-20 °C) por 24 horas para inibir por completo o processo de germinação das sementes. Posteriormente, os *gerboxes* foram colocados novamente em câmara de incubação por cinco dias com fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram até a avaliação. A análise sanitária das sementes foi feita individualmente em cada *gerbox*, com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico. Para identificação do patógeno em estudo lâminas foram preparadas e visualizadas ao microscópio ótico, anotando-se a incidência (%). Foram utilizadas na identificação literaturas especializadas como Barnett e Hunter (1998), Watanabe (2010) e Leslie & Summerell, (2006). Os isolados do patógeno cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) para estudos subsequentes.

3.7 Extração e amplificação do DNA

O DNA de *F. verticillioides* foi extraído no laboratório de Controle Biológico de Doenças da Universidade Federal do Tocantins, em Gurupi, de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). A biomassa coletada, foi pulverizada em almofariz e pistilo, com auxílio de nitrogênio líquido até um pó bem fino, transferido para um microtubo de 2 mL. Adicionou-se 1 mL de tampão de extração pré-aquecido a 65 °C (2% p/v de CTAB; 2,5% p/v de PVP-40; 2M NaCl; 2 % de 2-β-mecaptoetanol; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0) na amostra, homogeneizado em vórtex durante 30 segundos e incubados em banho maria por 40 minutos a 65 °C, sendo estes homogeneizados por inversão a cada 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (18.000 x g) durante 10 minutos,

logo após a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo microtubo de 2 mL. Foram adicionados 600 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (na proporção 24:1 v/v) seguido por homogeneização em vórtex durante 30 segundos e centrifugados (18.000 x g) por 10 minutos, buscando-se desproteinar as amostras.

O sobrenadante gerado foi coletado e transferido para um novo microtubo, agora de 1,5 mL e as amostras tratadas com 4 µL da enzima RNase (100 µL mL⁻¹) sendo sua reação realizada a 37°C durante 30 minutos. Logo após, foram adicionados 240 µL de álcool isopropílico gelado, seguido de uma homogeneização por inversão e incubado a -20 °C por overnight. A extração foi finalizada com as amostras centrifugadas a (18.000 x g) durante 20 minutos, o sobrenadante formado foi descartado e lavado o precipitado com 400 µL de etanol absoluto, seguido de uma segunda centrifugação (18.000 x g) durante 5 minutos. O precipitado formado foi seco à 37 °C durante 10 minutos e ressuspensos em 30 µL de água ultrapura. A concentração e qualidade do DNA foi determinada em espectrofotômetro tipo BioDRO, seguido por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X, corado com “Neotaq Brilhante Green Plus DNA stain” (Neobio), corridos em cuba de eletroforese (Loccus 22 Biotecnologia) a 110 V durante 30 minutos, analisados em fotodocumentador (Gel Logic 112). O marcador de DNA de 1 kb (Kasvi) foi usado como padrão de peso molecular.

Os pares de primers usados na reação foram os iniciadores VER-1 (5'-CTT CCT GCG ATG TTT CTCC-3') e VER-2 (5'-AAT TGG CCA TTG GTA TTA TAT ATCTA-3') para amplificar somente calmodulina de isolados de *F. verticillioides*.

A amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, sendo 25 µL de Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (1,5 mM MgCl₂), 5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador VER-1 e VER-2 (10 mM), 10 µL de água ultrapura e 5 µL das amostras de DNA obtidas.

A reação de PCR foi conduzida em termociclador (Techne TC-5000). Para os iniciadores VER-1 e VER-2 foi programado com um ciclo inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 50 segundos a 94 °C de desnaturação e anelamento de 50 segundos a 56 °C, extensão de 1 minuto a 72 °C e extensão final conduzida durante 7 minutos a 72 °C.

Os produtos da amplificação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0.8% em tampão TAE 1X, corado com “Neotaq Brilhante Green Plus DNA stain” (Neobio), corridos em cuba de eletroforese (Loccus Biotecnologia) a 110 V durante 30 minutos, analisados em fotodocumentador (Gel Logic 112). O marcador de DNA de 1 kb (Kasvi) foi usado como padrão de peso molecular.

3.8 Procedimento estatístico

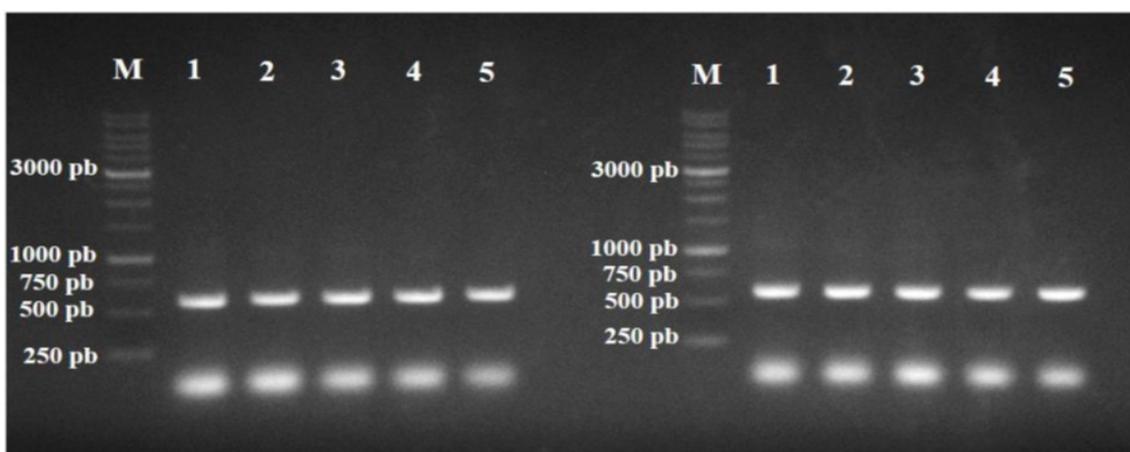
Após a realização da análise de variância, a comparação das médias foi feita pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de DNA de *Fusarium verticillioides*

Os pares de primers VER-1 e VER-2 na reação de PCR amplificaram de maneira satisfatória as concentrações do DNA avaliado, revelando bandas de peso molecular de aproximadamente 580 pb e resolução em gel. Desta forma, ficou evidenciado a sensibilidade da técnica em produzir cópias de DNA, assim como sua eficácia na obtenção de resultados precisos de detecção em baixas concentrações de DNA-alvo presente (Figura 1). Desta forma, foi confirmado a presença do patógeno *F. verticillioides*.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) da região VER-1 e VER-2 de *F. verticillioides* em diferentes concentrações de DNA purificado (duplicata em mesmo gel). Amplicons de 1 a 5: Sendo respectivamente de 20ng.µL⁻¹, 2 ng.µL⁻¹, 0,2 ng.µL⁻¹, 20 pg.µL⁻¹ e 2 pg.µL⁻¹. Marcador (M): 1 kb (KASVI).

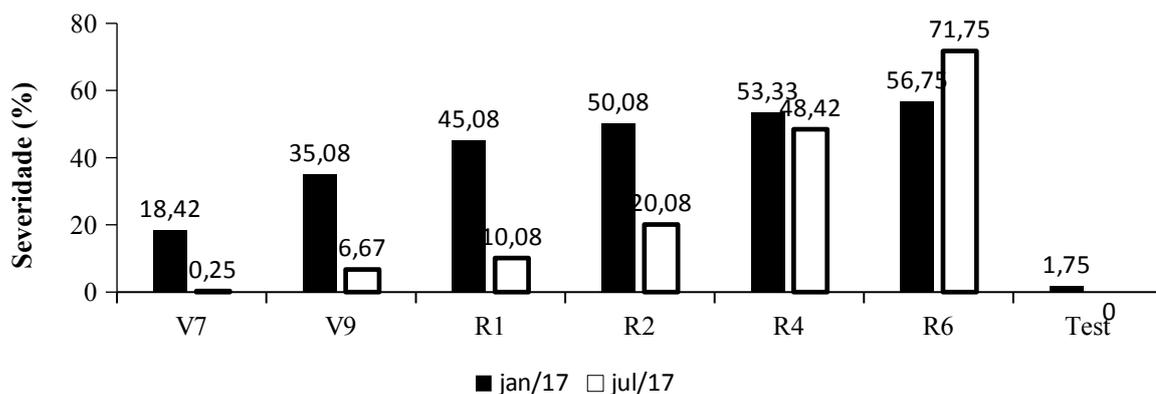


Este resultado indica que, a nível de gênero o uso dos iniciadores VER-1 e VER-2 no diagnóstico de fungos do gênero *Fusarium* é satisfatório, assim como para detecção de *Fusarium verticillioides* em diferentes incidências, pela qualidade dos produtos amplificados.

4.2 Influência da época de inoculação de *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos do milho sobre o nível de severidade da podridão de espigas

A severidade do patógeno nas espigas foi avaliada em duas épocas de plantio como mostra a figura 2, onde foi observado maior severidade no plantio do mês de janeiro nos estádios V7, V9, R1 e R2.

Figura 2: Severidade em espigas de milho oriundas de plantas inoculadas com *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos, em duas épocas.



Médias seguidas da mesma letra, minúscula nos diferentes estádios fenológicos e maiúsculas nas diferentes épocas de plantio, não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

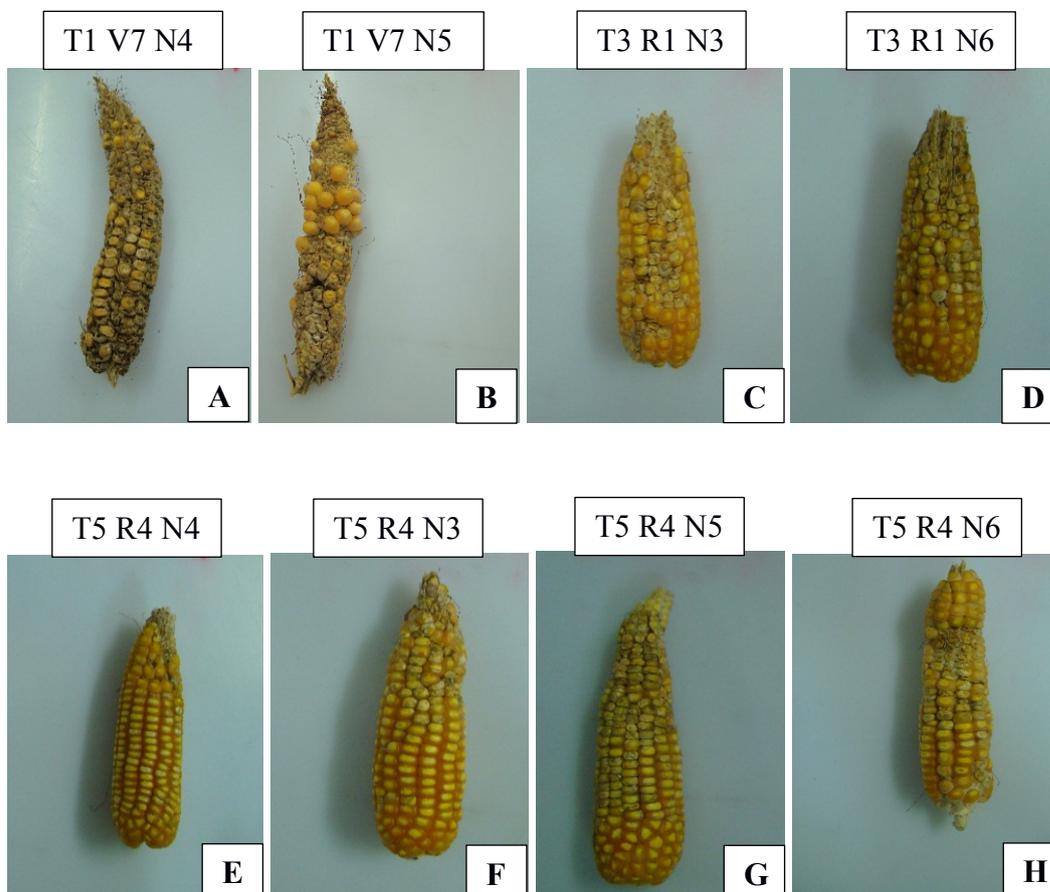
As espigas obtidas da testemunha apresentaram menor grau de severidade nas duas épocas de plantio diferindo estaticamente dos demais estádios e épocas. Nota-se que as espigas oriundas do plantio do mês de janeiro apresentaram maior severidade que as do mês de julho.

No plantio do mês de julho pode-se observar menor severidade nas espigas, nos estádios V7, V9, R1 e R2 apresentaram menor severidade que as demais espigas dos outros estádios. Já nos estádios R4 e R6 as duas épocas de plantio não diferiram estaticamente. Assim podemos afirmar que a época de plantio interferiu na severidade das espigas.

4.3 Patogenicidade de *Fusarium verticillioides*

A patogenicidade de *F. verticillioides* pode ser observada na figura 3, na qual pode-se observar os sintomas típicos de podridão de espigas em milho, ou seja, o patógeno demonstrou ser patogênico às plantas de milho.

Figura 3: Espigas de milho oriundas de plantas inoculadas com *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos. (T – Tratamento, R ou V – Estádio fenológico, N – Repetição).



O patógeno demonstrou ser virulento em todos os estádios fenológicos, apresentando sintomas típicos da doença nas espigas. Mesmo sendo inoculado em fase vegetativa, o fungo manteve-se latente na planta de milho até a fase reprodutiva.

A figura 2 A e 2 B são espigas inoculadas na fase vegetativa V7, ou seja, as plantas foram inoculadas com *F. verticillioides* quando as mesmas continham sete folhas totalmente abertas. No entanto, o fungo manteve-se latente nas plantas de milho, expressando-se somente na fase reprodutiva, sem causar nenhum dano aparente à planta nesta fase. Tal fato pode ser explicado pelo patógeno causar infecção latente nesta fase, para depois a planta manifestar os sintomas da doença. Reid et al. (1999) consideram o *Fusarium* sp. como um fungo endofítico onipresente na cultura, contudo, nem sempre patogênico.

Na fase reprodutiva figura 2 C, 2 D, 2 E, 2 F, 2 G e 2 H, pode-se observar as espigas de milho com sintomas típicos do patógeno, ocasionando assim perdas qualitativas. Esse fato pode comprovar o efeito das inoculações, mesmo em condições adversas ao desencadeamento

das podridões de espiga. A infecção deste patógeno é muito influenciada pelo clima, com chuvas e umidade relativa alta a partir do florescimento. Estes resultados também comprovam que a infecção ocorre principalmente a partir da fase reprodutiva, via estilo-estigma. As principais vias de infecção desse patógeno em espigas de milho são através do estilo-estigma e por ferimentos nos grãos (KOEHLER, 1942; SUTTON, 1982; REID et al., 1996), porém o patógeno pode utilizar outros meios e partes da planta para causar infecção. A podridão de espigas envolve o ataque direto do fungo aos grãos, os quais podem exibir sintomas da colonização, denominados de grãos ardidos (NERBAS, 2014). Além de afetar o valor econômico durante a comercialização, a presença de grãos ardidos altera o valor nutricional da ração pelo acúmulo de micotoxinas em grãos infectados que são indesejáveis a saúde humana e animal (MOLIN & VALENTINI, 1999).

De acordo com SUTTON (1982) para a ocorrência da infecção, a temperatura ótima situa-se na faixa entre 25 e 32°C, a presença de pólen, anteras, estilo-estigma e brácteas senescentes também podem atuar como potenciais substratos para o estabelecimento da infecção, sendo a presença de água essencial para a germinação dos conídios.

Várias estratégias têm sido utilizadas para o controle dos fungos causadores de podridões da espiga (ZAMBOLIM et al., 2000; REIS et al., 2004). No entanto, essas estratégias não têm sido eficientes. Desse modo, Nerbas et al., (2014), afirmam que o método mais eficiente para o controle da doença causada por este patógeno consiste na utilização de resistência genética do hospedeiro.

Diversos trabalhos confirmam a transmissão de diferentes espécies de *Fusarium* de sementes para plântulas, porém, se referindo, especialmente às espécies agrícolas, como o de Sartori et al. (2004) com sementes de milho (*Zea mays*), no qual confirmou a transmissão de *F. verticillioides*.

4.3 Análise Sanitária

Para as inoculações de *F. verticillioides* em diferentes estádios fenológicos, houve significância ($P \leq 0,05$) para estes estádios (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância envolvendo duas épocas de plantio em vasos, inoculados com *Fusarium verticillioides* nos grãos em diferentes estádios fenológicos.

| | Jan/2017 | | | Jul/2017 | |
|------------|----------|---------|--------|----------|--------|
| | GL | QM | Pr>Fc | QM | Pr>Fc |
| Tratamento | 6 | 5651,90 | 0,000* | 4854,90 | 0,000* |
| Residuo | 35 | 40,70 | | 45,40 | |

| | | |
|-----------|-------|-------|
| Total | 41 | |
| Média (g) | 66,10 | 71,81 |
| CV (%) | 9,65 | 9,38 |

*P ≤ 0,05

No primeiro plantio, os valores obtidos pela avaliação de épocas de inoculação, pelo teste de sanidade (*blotter test*), foram maiores nos tratamentos inoculados artificialmente com *F. verticillioides*, comparando ao tratamento testemunha (sem inoculação) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de incidência (%) nos grãos com *Fusarium verticillioides* inoculados em diferentes estádios fenológicos de plantas de milho, em duas épocas de plantio. Gurupi, Tocantins

| Tratamentos | Plantio Jan/2017 | | Plantio Jul/2017 | |
|----------------------------|------------------|---|------------------|---|
| | Média | | Média | |
| Testemunha | 14,67 | d | 24,00 | e |
| V7 (7 folhas abertas) | 48,00 | c | 46,67 | d |
| V9 (9 folhas abertas) | 46,00 | c | 66,00 | c |
| R1 (pendoamento) | 77,33 | b | 75,33 | b |
| R2 (grão leitoso) | 84,00 | b | 95,33 | a |
| R4 (grão farináceo) | 96,00 | a | 98,00 | a |
| R6 (maturação fisiológica) | 96,67 | a | 97,33 | a |

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

No plantio do mês de janeiro, os valores obtidos pela avaliação das inoculações em diferentes estádios fenológicos, foram menores nos estádios vegetativos comparando com os reprodutivos, como já era esperado, pois o patógeno, nas fases iniciais do ciclo da planta causa infecção latente, ou seja, não provoca sintomas visíveis na fase vegetativa. O fato de ter havido a presença do fungo *F. verticillioides* nas sementes das plantas não inoculadas, pode ser explicado com base nas características do fungo, que apresenta elevada esporulação e taxa de dispersão atmosférica. Os estádios fenológicos V7 e V9, (onde as plantas estavam com sete e nove folhas completamente abertas respectivamente), foram inoculadas com o patógeno e as mesmas apresentaram menor incidência que as plantas inoculadas no estágio reprodutivo. Esse fato pode comprovar que as plantas de milho estão mais susceptíveis à infecção com *F. verticillioides* nos estádios reprodutivos. Nestes estádios, destacando-se os estádios R4 (grão farináceo) e R6 (maturação fisiológica) com os maiores valores de incidência de *F. verticillioides*, mostrando que as inoculações feitas nestes períodos foram maiores que as inoculações feitas em R1 (pendoamento) e R2 (grão leitoso). Mendes et al. (2011), trabalhando com dez híbridos inoculados artificialmente com *F. verticillioides* observaram

que mesmo o tratamento testemunha (sem inoculação) apresentou alta severidade, mostrando assim que alguns híbridos são muito susceptíveis ao patógeno. Com isso, alertam para os cuidados que devem ser tomados quanto à utilização destes grãos na alimentação de humanos e animais, em decorrência de possíveis contaminações por micotoxinas, produzidas por *F. verticillioides*.

Todas as plantas inoculadas com o *F. verticillioides*, tanto nos estádios vegetativos, quanto reprodutivo se diferiram estatisticamente do tratamento testemunha, sem inoculação, mostrando assim que mesmo inoculado nos estádios vegetativos o patógeno afeta a planta de milho; desta forma, para obtenção de sementes de milho sadia, o produtor deve-se ter o devido cuidado em todas os estádios da planta.

No Brasil, 12 métodos de inoculação artificial foram comparados simulando a infecção via estilo-estigma e danos causados por insetos, variando em ausência de cobertura (câmara úmida), cobertura por 24 horas e por 48 horas (NASCIMENTO, 2010). Os resultados desse estudo mostraram não haver diferenças estatísticas significativas entre os métodos para a maioria dos híbridos avaliados.

No segundo plantio no mês de julho também foi observado menor incidência de *F. verticillioides* na testemunha, só que em maior porcentagem que o primeiro ensaio. Isso pode ser justificado pela presença de chuvas no final do ciclo da cultura e sua alta taxa de esporulação e dispersão. Corroborando com esses resultados Mendes et al. (2011), observaram que os valores médios de severidade do fungo *F. verticillioides* foram maiores na segunda safra (2007/08), para ambos os tratamentos, com e sem inoculação. Estes valores já eram esperados, pois na segunda safra houve um maior índice de pluviosidade condições mais favoráveis à doença na fase final do ciclo da cultura o que favoreceu a maior incidência deste patógeno.

Os estádios fenológicos vegetativos diferiram estatisticamente entre si e também da testemunha, mostrando assim que o estágio vegetativo V9 foi mais susceptível à infecção por *F. verticillioides* do que o V7.

Os estádios reprodutivos R2, R4 e R6 não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do R1, sendo o R2, R4 e R6 os de maior incidência. Mendes et al. (2011), observaram altos valores de incidência de grãos ardidos, causados por *F. verticillioides* na segunda safra (2007/08), devido à alta precipitação pluviométrica.

De acordo com Schaafsma et al. (1993) o sucesso da infecção de um método de inoculação é dependente do estágio fenológico da planta. Inoculações realizadas nas primeiras

semanas após o espigamento e métodos que causam ferimentos na planta são menos dependentes do tempo. Os métodos de inoculação com injeção no canal do estilo-estigma e de ferimentos nos grãos do centro da espiga apresentaram estas características, onde o inoculo foi depositado em contato direto com o estigma e grãos na fase inicial de desenvolvimento (estádio fenológico R1 e R2).

Quanto à produtividade houve diferença significativa entre os estádios fenológicos nas duas épocas de plantio (Tabela 3). Foi possível notar que os estádios vegetativos diferiram estatisticamente dos reprodutivos.

Tabela 3. Massa de 1000 grãos (g) de milho inoculados com *Fusarium verticillioides* em diferentes estádios fenológicos e duas épocas de plantio. Gurupi, Tocantins.

| Tratamentos | Janeiro/17 | | Julho/17 | |
|----------------------------|------------|-------|----------|-------|
| | Média | Grupo | Média | Grupo |
| Testemunha | 1330,81 | A | 1450,11 | A |
| V7 (7 folhas abertas) | 1030,82 | B | 1200,64 | B |
| V9 (9 folhas abertas) | 1090,13 | B | 1140,89 | B |
| R1 (pendoamento) | 1040,69 | B | 1060,70 | C |
| R2 (grão leitoso) | 1070,80 | B | 1090,42 | C |
| R4 (grão farináceo) | 880,70 | C | 950,24 | C |
| R6 (maturação fisiológica) | 800,48 | C | 800,06 | D |

¹Médias seguidas de mesma letra minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, em nível de significância de 5%.

A testemunha diferiu estatisticamente de todos os tratamentos, nas duas épocas de plantio, apresentando 1330,81g em janeiro e 1450,11g em julho, demonstrando maior produtividade no plantio de julho, isso pode ser explicado pelo o fato das condições climáticas mais favoráveis à planta e influenciarem diretamente na produtividade dos grãos.

Os estádios fenológicos V7, V9, R1 e R2 no plantio do mês de janeiro não diferiram estatisticamente entre si, assim pode se dizer que a incidência do patógeno não interferiu significativamente a produtividade dos grãos desses estádios. No entanto nos estádios R4 e R6 não diferiu estatisticamente entre si, apresentando os menores valores de produtividade, mostrando que o patógeno interferiu significativamente a produtividade desses grãos.

Para o plantio do mês de julho observou-se valores maiores que os do mês de janeiro em quase todos os tratamentos, obtendo assim maior média de produtividade no segundo plantio.

Os estádios vegetativos não diferiram estatisticamente um do outro. No entanto diferiram da testemunha e dos reprodutivos que apresentaram menores valores de

produtividade. Demonstrando assim que o patógeno é mais prejudicial à cultura nos estádios reprodutivo. De acordo com Boutigny et al., (2011), as espigas infectadas por fungos reduzem a produtividade e a qualidade dos grãos.

O estágio R6 diferiu de todos os tratamentos, apresentando menor valor de produtividade. Nerbass & Casa (2007) estimaram perda média de gordura de 28,85% e de proteína bruta de 3,5% ao comparar amostras de grão ardido em relação aos grãos regulares. Grãos ardidos também causam aumento na acidez do óleo no processo de fabricação do produto, incrementando custos com neutralização dessa acidez, diminuindo o rendimento do óleo e aumentando custos de clareamento.

Estudos foram realizados no Brasil avaliando a incidência de grãos ardidos em híbridos de milho em função do aumento da densidade de plantas, sistemas de manejo e aplicação de fungicidas foliares (CASA et al., 2007; JULIATTI et al., 2007; BRITO et al., 2012). Com relação ao uso de épocas de inoculação com *F. verticillioides* e avaliações de produtividade de milho através da análise de incidência de espigas, patogenicidade do patógeno o presente estudo foi pioneiro.

5 CONCLUSÕES

O patógeno *Fusarium verticillioides* foi patogênico às plantas de milho em todos os estádios fenológicos.

Nos estádios reprodutivos as plantas de milho são mais susceptíveis à infecção por *F. verticillioides*.

A produtividade foi menor quando as plantas de milho são infectadas nos estádios reprodutivos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, H.; HUNTER, B. **Illustrated genera of fungi imperfect.** 4 ed., 1998, 218 p.

BOUTIGNY, A.; WARD, T. J.; VANCOLLER, G. J.; FLETT, B.; LAMPRECHT, S. C.; O'DONNELL, L.; VILJOEN, A. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. **Fungal Genetics and Biology.** Article In Press, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. **Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária.** Brasília, 2009.

BRITO A. H.; PEREIRA J. L. A. R.; GARCIA R.; PINHO V.; BALESTRE M. Controle químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho (*Zea mays* L.) **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, p. 49-59, 2012.

CASA, R. T.; MOREIRA E. M.; BOGO A.; SANGOI L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 353-357, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.

Embrapa Milho e Sorgo. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de Produção. Versão Eletrônica – 6. ed. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicações/milho_6_ed/index.htm>. Acesso em: 20 nov. 2017. 2010.

FERNANDES, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia.** Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 128 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciências e agrotecnologia.** v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.

JULIATTI F. C.; ZUZA, J. L. M. F.; SOUZA, P. P.; POLIZEL A. C. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, p. 34-41, 2007.

LESLIE, J. F.; SUMMEREL, B. A. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell. **Professional Publishing**, Ames, Iowa, USA, 2006.

KOEHLER, O. Zum Heimflnden der Tiere. Zeitschrift für Tierpsychologie. **Microbial Endophytes**, v. 5, p. 152-182, 1942.

Doi: 10.1111 / j.1439-0310.1942.tb00651.x

MAIORANO, A.; BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VASARA, F. Effects of maize residues on the *Fusarium* spp. infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. **Crop Protection**. v. 27 p. 182-188, 2008.

MENDES, M. C.; PINHO, R. G. V.; MACHADO, J. DA C., ALBUQUERQUE, C. J. B.; FALQUETE, J. C. F. Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos fungos causadores de podridões de espiga. **Ciência agrotecnologia**. v. 35, n. 5, p. 931-939, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000500010>.

MENDES, M. C.; PINHO, R. G. V.; PINHO, E. V. R. V.; FARIA, M. V. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. **Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 275-292, 2012.

MOLIN, R.; VALENTINI, M. L. **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. Fundação Cargill, Fundação ABC. 208p, 1999.

NASCIMENTO, J. P. **Avaliação de métodos de inoculação de *Gibberella zeae* em espigas de milho**. 37 p. (Dissertação Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2010.

NERBASS, F. R. **Métodos de inoculação de *Fusarium graminearum* em espigas de milho, intensidade, danos e reação de híbridos à podridão de giberela**. 118p. (Tese Doutorado). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 2014.

NERBASS, F. R., CASA, R. T. Teores de gordura bruta e proteína bruta em grãos ardidos comparados a grãos regulares de milho, destinados a alimentação animal In: **VI Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão**, Concórdia, p. 80-83, 2007.

REID, L. M., HAMILTON, R. I., MATHER, D. E. Screening maize for resistance to gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON. **Technical Bulletin** 1996-5E. 1996.

REID, L. M.; NICOL, R. W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J. D.; YOUNG, J.C.; ATEWART, D. W.; SCHAAFSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 1028-1037, 1999.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2.ed. rev. atual. Lages: Graphel. 144p, 2004.

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n.4, p. 456-458, jul-ago, 2004.

SAMANI, Z. A.; HARGREAVES, G. H. **A crop water evaluation manual for Brazil – The Internation Irrigation Center.** Logan, Utah, USA: Departament of Agricultural and Irrigation Engineering, Utha State University, 1985.

SCHAAFSMA, A. W.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E.; EWING, R. J. Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid, and species of *Fusarium*. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 15, p. 185-192, 1993.

SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 4, p. 195-209, 1982.

ZAMBOLIM, L.; CASA, R. T.; REIS, E. M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 585- 595, 2000.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species.** CRC press, 2010.

WALKER, C., GONZATTO, C., MENDES, P., BRIÃO, M., MEZZOMO, R. Y SCHULTZ, C. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* E *Fusarium verticillioides* A *Cordia americana*. **Ciência Florestal**. 26 (2): 463-473, 2016.