



CAROLINA DA SILVA SIQUEIRA

**TRANSMISSÃO E DESEMPENHO DE
SEMENTES DE MILHO PORTADORAS DO
COMPLEXO *Stenocarpella* SOB CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

**LAVRAS - MG
2013**

CAROLINA DA SILVA SIQUEIRA

**TRANSMISSÃO E DESEMPENHO DE SEMENTES DE MILHO
PORTADORAS DO COMPLEXO *Stenocarpella* SOB CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

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

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Siqueira, Carolina da Silva.

Transmissão e desempenho de sementes de milho portadoras do complexo *Stenocarpella* sob condições controladas / Carolina da Silva Siqueira. – Lavras: UFLA, 2013.

131 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. *Stenocarpella maydis*. 2. *Stenocarpella macrospora*. 3. Fungo.
4. Patologia de sementes. 5. Fitopatologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

CAROLINA DA SILVA SIQUEIRA

**TRANSMISSÃO E DESEMPENHO DE SEMENTES DE MILHO
PORTADORAS DO COMPLEXO *Stenocarpella* SOB CONDIÇÕES
CONTROLADAS**

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

APROVADA em 2 de agosto de 2013

Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes	ESALQ-USP
Dr. João Almir Oliveira	UFLA
Dra. Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA

Dr. José da Cruz Machado
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Com eterna gratidão e amor, a minha mãe Ivone

Aos meus irmãos Janaina e Vinícius

A minha avó, tias e tios

Aos meus companheiros primos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. José da Cruz Machado, pela orientação, ensinamentos, apoio e disposição que sempre me dedicou em todos estes anos.

À professora Dra. Antônia dos Reis Figueira, pelos ensinamentos, apoio e colaboração neste trabalho.

À Dra. Maria Heloísa e aos Professores Dr. Eduardo Alves e Dr. João Almir, pela disposição para participação na banca examinadora.

Aos pesquisadores Dr. Jan van der Wolf e Dr. Theo van der Lee pela oportunidade concedida em seus respectivos grupos de pesquisa no Plant Research International na Universidade de Wageningen na Holanda.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Aos amigos do LAPS, Ângela, Biotita, Mirian, Patrícia, Vanessa, Nádia, Pepe, Luiz Eduardo, Rayanna, Victor, Gabriel, Elenice, Amanda e Fernanda, que ajudaram com tanta disposição para a realização deste trabalho e pela amizade. Ao Glauco e a Cecília, pela amizade e ajuda no trabalho.

À Ana Flávia, Carla, Ellen, Iara, Luana, Luiza, Marcela, Mirella e Ursula por toda amizade, ajuda e colaboração, durante toda a realização deste trabalho. À Flávia e a Priscila, pela amizade, ajuda e excelente convivência durante todos esses anos.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

RESUMO

Stenocarpella maydis e *Stenocarpella macrospora* são espécies causadoras da podridão do colmo e da espiga e de manchas foliares em milho e que podem ser transmitidas pelas sementes deste cereal. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar as relações de *S. maydis* e *S. macrospora* com sementes de milho, com foco na transmissão destes organismos, de sementes para a planta e nos efeitos resultantes dessa interação, levando-se em consideração alguns importantes fatores que podem interferir nesta relação. Para a determinação da taxa de transmissão e a avaliação dos efeitos dos patógenos no desempenho das sementes/plântulas de milho, foram utilizados dois isolados de cada espécie de *Stenocarpella*, sendo a inoculação realizada pelo método de condicionamento osmótico em sementes de duas cultivares de milho, uma suscetível (C1-RB9308YG) e outra moderadamente resistente (C2-RB9108). Foram obtidos diferentes potenciais de inóculo, por meio da variação dos tempos de contato das sementes com as colônias dos fungos, sendo estabelecidos, neste caso, os períodos de 24 (P1), 48 (P2), 72 (P3) e 96 (P4) horas. Os experimentos foram desenvolvidos em câmaras de crescimento vegetal com temperaturas de 20 °C e 25 °C, sendo os efeitos avaliados diariamente. A taxa de transmissão total de cada patógeno foi calculada pelo somatório da taxa de morte em pré-emergência e as taxas de transmissão com infecção sintomática e assintomática. Para *S. maydis* a transmissão ocorreu em todos os potenciais de inóculo, a taxa total variando entre 25% para sementes da cultivar C2 com potencial P1 em cultivo a 20 °C e 93% para esta mesma cultivar com P3 a 25 °C. As taxas de transmissão total de *S. macrospora*, da semente para planta, foram diretamente proporcionais ao aumento dos potenciais de inóculo, sendo de 84% a maior taxa que ocorreu na cultivar C1 no maior potencial de inóculo (P4), com cultivo a 20 °C e a menor taxa de 6,75% em sementes da cultivar C2 com P1 e cultivo a 20 °C. Em relação aos efeitos fisiológicos, avaliaram-se a germinação e o vigor (índice de velocidade de emergência ou IVE), o estande inicial e final, a altura e o peso de matéria fresca e seca das plantas, o teste de frio e a condutividade elétrica e, também, o teste de sanidade, nas sementes inoculadas nos mesmos potenciais de inóculo utilizados para avaliar as taxas de transmissão dos patógenos. Observou-se que, para as duas espécies de *Stenocarpella*, quanto maior o potencial de inóculo inicial nas sementes, maiores foram os efeitos negativos na qualidade das sementes inoculadas e nas plantas oriundas delas. Nas plantas provenientes de sementes com potencial P4 ocorreram os mais baixos valores de IVE, estandes, pesos e alturas de plantas. Pelos testes de qualidade das sementes, observou-se que quanto maior os potenciais de inóculo, menores foram as porcentagens de plântulas normais, tanto no teste de germinação como no teste de frio, ocorrendo nestes potenciais os maiores

percentuais de incidências dos patógenos nas sementes. Também nessas sementes infectadas verificou-se avançado processo de degradação pelas análises de condutividade elétrica. Para os estudos utilizando os marcadores genéticos que expressam *green fluorescent protein* (GFP) e *red fluorescent protein* (DsRed), isolados de *S. maydis* e de *S. macrospora* foram transformados com sucesso, por meio da utilização de seus respectivos protoplastos e plasmídeos selecionados. Nas sementes infectadas artificialmente, pelos isolados transformados de ambas as espécies, foram observados diferentes padrões de colonização de acordo com as intensidades de fluorescência reveladas por análises em microscopia de fluorescência. Os potenciais de inóculo P3 e P4, nas sementes infectadas, foram os que provocaram as maiores intensidades de fluorescência pelas colonizações dos patógenos. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, as análises realizadas foram eficazes para observar a dinâmica da colonização de *S. maydis* e *S. macrospora* nos tecidos das sementes inoculadas, em todos os potenciais de inóculo. Nos potenciais mais elevados (P3 e P4), visualizou-se crescimento micelial abundante e abrangente nas estruturas das sementes analisadas.

Palavras-chave: *Stenocarpella maydis*. *Stenocarpella macrospora*. Fungo. Patologia de sementes. Fitopatologia.

ABSTRACT

Stenocarpella maydis and *Stenocarpella macrospora* are species causing stem/ear rot and leaf spots in corn and can be transmitted by seeds of this cereals. The objectives in this study were to evaluate the relationship of *S. maydis* and *S. macrospora* with maize seeds with a focus on transmission of these organisms, from seeds to plants, and the resulting effects of this interaction taking into account some important factors that may affect this relation. To determine the rate of transmission and to evaluate the effects of the pathogens on the performance of seeds/seedlings of corn, two isolates of each species of *Stenocarpella* were used. Inoculation was performed by the osmotic conditioning method using two cultivars of maize, one susceptible (C1-RB9308YG) and the other moderately resistant (C2-RB9108). Different inoculum potentials were obtained by varying the time of contact between seeds and fungal colonies, establishing the periods of 24 (P1), 48 (P2), 72 (P3) and 96 (P4) hours. The experiments were conducted in growth chamber with temperatures of 20 °C and 25 °C, the effects being evaluated daily. The total transmission rate of each pathogen was calculated by the sum of the death pre-emergence rate and transmission rate with symptomatic and asymptomatic infection. Transmission of *S. maydis* occurred at all inoculum potentials, the total rate ranging from 25% for C2 with P1 potential at 20 °C and 93% for C2 with P3 at 25 °C. The total transmission rates of *S. macrospora*, from the seed to plant, were directly proportional to the increase of the inoculum potentials, the highest rate 84% occurred in the cultivar C1 at the highest potential inoculum (P4), with cultivation at 20 °C and the lowest rate of 6.75% in the C2 with P1 and cultivation at 20 °C. Regarding the physiological effects the germination and vigor index (Emergency Speed Index- ESI), initial and final stands, height and fresh and dry weights of plants, cold test and electrical conductivity, and in addition to the health test, in inoculated seeds with the same inoculum potential used to assess the rates of transmission of pathogens were applied. It was observed that for both species of *Stenocarpella*, higher initial inoculum potentials in the seeds provoked bigger damages on the quality of seeds and in the resulting plants. In plants emerged from seeds with the highest potential (P4) it was observed the lowest values of ESI, stands, weights and heights of plants. By the quality seed test, it was also observed that the higher the inoculum potential caused the lower percentages of normal seedlings, both germination and cold test. At these potentials higher percentages of incidences of the pathogens in seeds were observed. In those infected seeds it was verified the occurrence of an enhancement effect of membrane degradation as indicated by the electrical conductivity analyzes. For studies using genetic markers that express green fluorescent protein (GFP) and red fluorescent protein (DsRed),

isolates of both *S. maydis* and *S. macrospora* have been successfully transformed by the use of their respective protoplasts and selected plasmids. In the artificially infected seeds by the transformed isolates of both species, it was observed different colonization patterns in accordance with the intensities of fluorescence revealed by fluorescence microscopy analyzes. The inoculum potentials P3 and P4, in the infected seeds, were the ones that produced the highest levels of emitted fluorescence in the colonization by the pathogens. By scanning electron microscopy, the analyzes were effective to demonstrate the dynamics of colonization of *S. maydis* and *S. macrospora* in the tissues of inoculated maize seeds at all inoculum potentials. In the higher inoculum potentials (P3 and P4) abundant and comprehensive mycelial growth in the structures of seeds were observed.

Keywords: *Stenocarpella maydis*. *Stenocarpella macrospora*. Fungus. Seed pathology. Phytopathology.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	Erro! Indicador não definido.
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Importância da cultura do milho e suas doenças	14
2.2 Agentes etiológicos causadores de podridões no milho.....	15
2.3 Sintomatologia, danos, epidemiologia e diagnose das doenças causadas pelo complexo <i>Stenocarpella</i>	17
2.4 Disseminação e transmissão da doença	22
REFERÊNCIAS	27
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	33
ARTIGO 1 Transmissão de <i>Stenocarpella maydis</i> a partir de sementes de milho	343
ARTIGO 2 Potencial de transmissão de <i>Stenocarpella macrospora</i> em sementes de milho infectadas e cultivadas em condições controladas Erro! Indicador não definido.	
ARTIGO 3 Efeitos de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Stenocarpella macrospora</i> em sementes de milho sob condições controladas Erro! Indicador não definido.	
ARTIGO 4 Estudo da colonização de sementes de milho por espécies de <i>Stenocarpella</i> transformadas com proteínas fluorescentes e microscopia eletrônica de varredura.....	105
CONSIDERAÇÕES GERAIS	129

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo com alto potencial produtivo. É uma planta altamente sensível a fatores abióticos e bióticos, como fertilidade do solo, condições climáticas, práticas culturais, época de semeadura, população de plantas e ocorrência de pragas e doenças. Tais fatores são determinantes na sua produtividade, por isso o seu cultivo deve ser criteriosamente planejado para que possa expressar todo o potencial genético selecionado para o plantio.

A semente representa um dos principais componentes para tal sucesso produtivo, uma vez que funciona como o veículo de informações genéticas ao qual ainda é possível agregar valores, pela incorporação física de outros insumos como fungicidas e inseticidas, que também contribuem para o aumento da produtividade.

A incorporação desses insumos às sementes tem sido cada vez mais aceita devido aos prejuízos que a associação de patógenos e pragas pode resultar. A interferência de doenças em determinadas circunstâncias tem limitado o incremento das produções de milho e as doenças associadas às sementes podem desencadear consequências indesejáveis, como a introdução de patógenos em novas áreas de plantio ou a sua disseminação entre áreas produtoras.

As podridões de colmo e espiga, causadas pelos fungos *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, têm merecido destaque em lavouras no Brasil, devido aos prejuízos que essas doenças podem provocar. Ambos os organismos têm representado um problema em grandes regiões produtoras, por causarem apodrecimento do colmo, levando a planta ao acamamento, e podridão

dos grãos, estando ambos associados à perda no valor de venda do milho além da possibilidade de presença de micotoxinas produzidas pelos referidos agentes. O fungo *S. maydis* encontra-se na lista de pragas não quarentenárias regulamentadas, com proposições para o estabelecimento de um nível de tolerância, em programas de certificação no país (MACHADO; POZZA, 2005). Já para o fungo *S. macrospora* ainda não existem estudos que o enquadrem nessa categoria, porém tem sido observado o aumento constante de sua incidência nas lavouras, principalmente na região centro-oeste do Brasil.

Para que programas de certificação de sementes possam ser implementados, são necessários o entendimento dos processos de transmissão e disseminação dos patógenos e o conhecimento dos efeitos que tais patógenos podem causar, estando eles associados às sementes, além da sua dinâmica de infecção e colonização, dentre outros fatores.

O estudo da transmissão das espécies de *Stenocarpella* e seus efeitos causados em sementes infectadas, podem ajudar a elucidar diferentes pontos do processo de transmissibilidade desses agentes para as plantas emergidas de milho e as consequências originadas de diferentes níveis de infecção nas sementes.

O processo de colonização dos agentes patogênicos pode ser realizado de diferentes formas e, levando em consideração diferentes níveis de infecção, estudos podem simular as ocorrências no campo e embasar tomadas de decisão no manejo e no controle de epidemias. A utilização de marcadores moleculares e microscopia eletrônica pode ajudar no acompanhamento e no estudo destes processos.

Portanto, neste estudo, os objetivos foram: determinar taxas de transmissão de *S. maydis* e *S. macrospora* de sementes para plantas, avaliar os efeitos de sementes inoculadas sobre o seu desempenho, levando-se em consideração diferentes fatores, como potenciais de inóculo, temperaturas,

genótipos e virulência dos isolados, além de avaliar os diferentes níveis de infecção e colonização das sementes inoculadas com a utilização de marcadores moleculares e microscopia eletrônica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura do milho e suas doenças

O milho (*Zea mays* Linné) é produzido em quase todos os continentes do mundo e sua importância econômica está nas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia como a produção de filmes e embalagens biodegradáveis. Cerca de 70% da produção mundial de milho são destinados à alimentação animal, podendo este percentual chegar a 85%, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (PAES, 2006).

A cultura do milho constitui, para o Brasil, uma das mais importantes atividades no contexto do agronegócio, sendo amplamente cultivada e consumida em todo o país e destinada à exportação. A exportação também é muito visada pelos produtores brasileiros, principalmente pelo aumento da valorização do produto, nos últimos anos. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2013), a área cultivada com milho no Brasil, em 2012/13, foi de 15.686.200 hectares e a produção estimada para a safra de 2013 é da ordem de 77.998.200 toneladas. Minas Gerais responde por uma produção de 11.951.700 toneladas, com área plantada de 3.021.700 ha.

A produção do milho pode ser afetada negativamente pela ação de várias doenças causadas por fungos, que podem comprometer o potencial de rendimento da cultura (WHITE, 1999). A expansão da área cultivada em plantio

direto proporcionou uma alteração no microclima e na biologia do agroecossistema, com reflexos nas populações dos agentes causais das doenças do milho (REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

A presença dos restos culturais sobre a superfície do solo beneficia a sobrevivência de muitos fitopatógenos, fazendo com que doenças antigas ressurgam com maior intensidade e que novas doenças se manifestem. A importância de cada uma dessas doenças é variável de ano para ano e de região para região. Dentre as doenças antigas do milho, que vêm aumentando em várias regiões do Brasil, estão as podridões de espiga e do colmo, causadas pelo complexo *Stenocarpella*, antes mais comumente encontradas na região sul do país e em algumas áreas do centro-oeste (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

2.2 Agentes etiológicos causadores de podridões no milho

Taxonomicamente, os fungos *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton (sin. *Diplodia maydis* (Berkeley) Saccardo; *D. zaeae* (Schweinitz) Leveille) e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton (sin. *D. macrospora* Earle) pertencem à Classe dos Ascomycetes e à Ordem Dothideales, sendo caracterizados morfológicamente por apresentarem picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados e conídios cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, bicelulados, comumente com um septo, para a espécie *S. maydis*, e com um ou dois septos, na espécie *S. macrospora* (SUTTON, 1980; SUTTON; WATERSTON, 1966). Em relação aos hospedeiros, estas espécies parasitam, preferencialmente, plantas de milho; entretanto, *S. maydis* já foi encontrada como parasita de bambu, não havendo relatos de outros hospedeiros nas condições brasileiras (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

S. maydis e *S. macrospora* são os fungos que constituem o comumente chamado “complexo *Stenocarpella*” e estas duas espécies são diferenciadas morfológicamente, basicamente pelo tamanho dos conídios, sendo os de *S. maydis* de duas a três vezes menores do que os conídios de *S. macrospora* (44-82 x 7,5-11,5 µm, com 1 a 3 septos) (SUTTON, 1980). Mario e Reis (2001) ressaltam que estas duas espécies também podem ser distinguidas por meio da coloração característica de suas colônias, *S. maydis* apresenta-se com cor salmão-escura, com o reverso de cor bege a pardo-clara, podendo tornar-se escura e *S. macrospora* permanece com coloração superficial branca e o reverso da colônia com cor bege. Em meio de cultura *S. macrospora* tem uma produção de picnídios lenta e em menor quantidade se comparada a *S. maydis*; contudo, esta distinção não tem sido consistente em alguns casos. Além disso, existem meios que podem estimular a esporulação desses fungos, facilitando sua identificação, como o meio de cultura feito de grãos de sorgo e o de farinha de aveia-ágar acrescido de vitaminas, para *S. maydis*, e de milho-ágar e de farinha de aveia-ágar, para *S. macrospora* (SILVA; JULIATTI, 2005).

Alguns fatores podem ser importantes para favorecer a esporulação e o desenvolvimento desses fungos. Casa et al. (2007) estudaram o efeito da temperatura e do período luminoso no crescimento do micélio, na germinação de esporos e na liberação do cirro de conídios de *S. macrospora* e *S. maydis*. A faixa de temperatura entre 23 °C e 28 °C proporciona maior crescimento do micélio das duas espécies, sob fotoperíodo de 12 horas. As temperaturas entre 28 °C e 33 °C propiciam uma maior porcentagem de germinação dos conídios de *S. maydis*, enquanto, que para *S. macrospora*, a germinação ocorre com temperatura mais baixa, na faixa de 26 °C a 29 °C. Os conídios de ambas as espécies germinam mais rapidamente na presença da luz. A liberação do cirro através do ostíolo do picnídio, em pedaços de colmos de milho, é maior na faixa térmica de 30 °C a 35 °C sob luz contínua, para as duas espécies.

Na literatura não se encontram relatos sobre a existência de raças de *S. macrospora* e *S. maydis*. Sabe-se, no entanto, da existência de variação no grau de agressividade entre diferentes isolados desses patógenos (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006). Latterell e Rossi (1983), comparando a patogenicidade dos fungos, verificaram que *S. macrospora* é mais agressivo do que *S. maydis*, durante os estádios iniciais de desenvolvimento da planta. Rheeder et al. (1990) relataram uma associação negativa entre as espécies crescendo no mesmo local, tendo *S. macrospora* restringido o crescimento de *S. maydis* em plântula.

Contudo, apesar de a espécie *S. macrospora* estar ganhando atenção pelo constante aumento de perdas em lavouras de milho, causadas pela sua associação, ainda é encontrado na literatura, maior número de informações sobre *S. maydis*, provavelmente pela sua maior incidência em testes de sanidade de sementes e grãos, e constatação nas áreas de cultivo (DENTI; REIS, 2003).

2.3 Sintomatologia, danos, epidemiologia e diagnose das doenças causadas pelo complexo *Stenocarpella*

Geralmente, a doença causada pelas espécies que formam o complexo *Stenocarpella* é denominada podridão do colmo ou da espiga, mas quando os sintomas são encontrados no colmo, ela é conhecida como podridão do colmo, podridão de diplodia e podridão da base do colmo. Quando ocorre na espiga, é chamada de podridão da espiga, podridão de diplodia ou podridão branca da espiga e, ainda, quando aparecem manchas foliares, é utilizada a designação mancha de diplodia ou mancha de macrospora (REIS; CASA, 1996; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

No caso de podridão do colmo, os sintomas secundários manifestam-se várias semanas após a polinização. Os entrenós basais das plantas infectadas apresentam lesões externas, de forma localizada, de cor parda a escura,

iniciando, preferencialmente, nos nós. Um sinal importante para a diagnose da doença é a presença de picnídios subepidérmicos, pequenos, pardos-negros, agrupados nas lesões próximas aos tecidos dos nós, principalmente quando o tecido encontra-se senescido. As folhas infectadas murcham, tornando-se verde-acinzentadas e secas, semelhantes ao dano causado por geada. O quadro sintomatológico inclui alteração da cor externa do colmo, parte interna dos nós e desintegração da medula, deixando apenas os feixes vasculares intactos. As plantas severamente atacadas podem ser prematuramente mortas. As podridões do colmo são favorecidas por temperaturas entre 28 °C e 30 °C e alta umidade, principalmente na forma de chuva (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

Os sintomas de mancha foliar são característicos da espécie *S. macrospora*. As lesões iniciais, em alguns híbridos, apresentam-se na forma de tecido clorótico seguido de necrose. As lesões têm formato irregular, medem, normalmente, de 1 a 3 cm de comprimento, apresentam cor parda e podem apresentar anéis concêntricos mais escuros a partir do ponto inicial de infecção. As primeiras lesões também podem ser visualizadas na forma de pequenas estrias avermelhadas ou pardas que, mais tarde, aumentam de tamanho, estendendo-se no sentido longitudinal da folha, podendo dilacerar o tecido vegetal infectado. Sobre o tecido necrosado são observados os picnídios do fungo na forma de pequenos pontos negros, subepidérmicos, isolados ou agrupados. Sob clima úmido, com o auxílio de lupa de mão, podem ser observados os cirros longos extrudando dos picnídios. Os esporos produzidos sobre as lesões podem ser transportados pela água até a bainha foliar, onde, posteriormente, germinam e iniciam a infecção do colmo ou da base da espiga (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006).

Na espiga, os sintomas iniciam, principalmente, na base da espiga logo após a fecundação. As brácteas da espiga tornam-se despigmentadas e de

coloração parda. Quando a infecção ocorre duas semanas após a polinização, toda a espiga pode tornar-se podre, apresentando coloração pardo-cinzenta a esbranquiçada, enrugada e leve, com as palhas internas fortemente aderidas umas às outras ou aos grãos, devido ao crescimento do micélio do fungo. Os picnídios negros podem formar-se sobre palha, brácteas florais, sabugo e grãos. Os grãos infectados apresentam cor cinza-fosco a marrom. As espigas infectadas, ao final do ciclo da cultura, não mostram sintomas externos e, quando são despalhadas e os grãos assintomáticos removidos, o micélio branco pode ser visto crescendo entre os grãos remanescentes nas espigas. Entretanto, as espigas mal empalhadas ou com palhas frouxas ou que não se dobram após a maturidade fisiológica são as mais suscetíveis. A alta precipitação pluvial na época da maturação dos grãos favorece o aparecimento dessa doença (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; PINTO, 2005).

Alguns isolados de *S. maydis* induzem à viviparidade, ou seja, a germinação prematura dos grãos. Também foi verificado que as plantas com podridão do colmo, normalmente, apresentam as espigas com a ponta voltada para baixo. Tanto no colmo como na espiga, não é possível determinar se a infecção foi causada por *S. maydis* ou *S. macrospora*, apenas com base nos sintomas (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; PINTO, 2005; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

A doença causada por *S. maydis* e *S. macrospora* apresenta, como um dos danos mais importantes, o efeito negativo sobre a germinação de sementes, podendo matar o embrião ou comprometer o vigor das plantas emergidas. Danos subsequentes podem ser observados na forma de podridão do colmo e da espiga. A podridão do colmo interfere no desenvolvimento normal da planta, afetando suas funções, ocasionando quebra da base do colmo, acamamento e, conseqüentemente, morte prematura da planta. A podridão branca da espiga

pode causar redução na produtividade e na qualidade dos grãos colhidos. Além disso, estes fungos são produtores de toxinas, o que afeta o valor econômico e nutricional do produto, sendo estas a diplodiatoxina, produzida por *S. maydis* (PINTO, 2005) e a diplodiol, produzida por *S. macrospora* (CUTLER et al.,1980), sobre as quais ainda não existem muitas informações disponíveis na literatura (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; PINTO, 2005; TRENTO; IRGANG; REIS, 2002).

A mancha de macrospora é detectada com maior frequência e intensidade nas lavouras de milho conduzidas em monocultura (CASA et al., 2000). Apresenta como importante dano a infecção das folhas e, em muitas situações, o dilaceramento do tecido foliar necrosado, reduzindo a área foliar da planta. Essa doença torna-se mais grave em virtude da grande produção de inóculo sobre lesões, que contribui para o aumento da infecção do colmo e da espiga.

Informações mais detalhadas sobre aspectos epidemiológicos das doenças causadas pelo complexo *Stenocarpella* são relatadas, com maiores detalhes, por alguns pesquisadores, como Casa et al. (2007), Casa, Reis e Zambolim (2003, 2004, 2006), Casa, Zambolim e Reis (1998), Reis e Casa (1996), Reis, Casa e Bresolin (2004) e Reis e Mario (2003).

A diagnose e a detecção de patógenos em sementes vêm se tornando cada vez mais importantes, principalmente pela relevância do aspecto sanitário em relação ao aumento da produção por meio da utilização de sementes sadias ou, mesmo, para o controle da disseminação de doenças. No caso da associação de fungos com sementes, para a realização da detecção neste material, procedimentos são recomendados por regras estabelecidas pela International Seed Testing Association – ISTA (1976) ou, também, por meio de regras indicadas pelo próprio país de origem, como no caso do Brasil, que disponibiliza, pelo Ministério da Agricultura (MAPA), o manual de Análise

Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009). Os testes de sanidade sugeridos são, em sua maioria, baseados em procedimentos que favorecem a manifestação dos microrganismos, por meio de suas estruturas típicas ou, em alguns casos, a obtenção de metabólitos que permitam a caracterização e a identificação desses patógenos.

Além disso, estudos na área da biologia molecular apresentam resultados positivos para o desenvolvimento de técnicas de detecção mais rápidas e eficazes. Por meio da técnica de *polimerase chain reaction* ou PCR, convencional e/ou quantitativa, a detecção molecular de patógenos em sementes tem sido realizada com eficiência, como nos patossistemas *Pyrenophora graminea* em sementes de cevada (TAYLOR et al., 2001), *Rhynchosporium secalis* em sementes de cevada (LEE; TEWARI, 2001; LEE; TEWARI; TURKINGTON, 2001), *Alternaria brassicae* em sementes de crucíferas (GUILLEMETTE; IACOMI-VASILESCU; SIMONEAU, 2004) e *Magnaporthe grizea* em arroz (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2006).

No caso do complexo *Stenocarpella*, alguns *primers* já foram desenvolvidos e utilizados com sucesso para a sua detecção em PCR (BARROS et al., 2008; XIA; ACHAR, 2001), mas eles funcionam para as duas espécies, sem diferir *S. maydis* de *S. macrospora*. Em muitos casos, lança-se mão da técnica de BIO-PCR, cujo objetivo é o enriquecimento da biomassa do fungo na semente ou na planta, para aumentar a sensibilidade da detecção.

Para estudos de detecção de patógenos em sementes, assim como estudos de transmissão, dentre outros, é necessário a utilização de sementes infectadas, e para a obtenção destas, atualmente, têm-se disponível a metodologia de restrição hídrica ou condicionamento osmótico. Nesse processo, a germinação das sementes é inibida temporariamente de maneira a possibilitar a sua exposição à colônias do patógeno por períodos variáveis e prolongados, obtendo-se desta forma sementes com níveis diferenciados de infecção. A inoculação de sementes

pela restrição hídrica não só torna possível a obtenção de lotes de sementes com diferentes níveis de incidência de determinados patógenos, como também obtém sementes com diferentes potenciais de inóculo desses organismos (MACHADO et al., 2012).

2.4 Disseminação e transmissão da doença

O principal veículo apontado como disseminador das espécies de *Stenocarpella* é a semente de milho infectada por estes organismos. Através desta via, os patógenos podem ser introduzidos em novas áreas de cultivo, mesmo distante de seu local de produção, constituindo-se, assim, importantes fontes de inóculo primário para podridão de semente, morte de plântulas e podridão de raízes.

Outra forma de disseminação em áreas de cultivo do milho é a dispersão vertical e horizontal dos conídios de *S. maydis* e *S. macrospora*, a partir dos restos culturais naturalmente contaminados. Em estudo realizado por Casa, Reis e Zambolim (2004), foi demonstrado que, na dispersão vertical, mais de 60% dos conídios foram coletados até uma altura de 25 cm. Esses valores ajudam a compreender por que as podridões causadas por *Stenocarpella* em milho apresentam sintomas frequentes e típicos na base do colmo, normalmente no primeiro e no segundo entrenó. Com altura superior a 50 cm verificou-se redução de mais de 50% no número de conídios encontrados, quando comparado com a altura de até 25 cm. Possivelmente, o tamanho e o peso dos conídios e/ou do cirro inteiro liberado do picnídio, e/ou a altura do respingo do impacto da gotícula d'água sobre o corpo frutífero contendo o inóculo, não permitem que eles sejam dispersos abundantemente a alturas superiores a 25 cm da fonte de inóculo. Os conídios de *Stenocarpella* capturados acima de 50 cm de altura, possivelmente, são responsáveis por uma das vias de inoculação dos fungos nas

espigas. Nessa situação, na lavoura, os conídios dispersos pelo vento são depositados pela força gravitacional na bainha foliar. Os conídios de *S. macrospora* coletados 50 cm acima da fonte de inóculo, provavelmente, são responsáveis pela infecção das folhas do milho, causando sintoma de mancha foliar. Na dispersão horizontal, os esporos dos fungos foram capturados nas armadilhas até uma distância de 120 m da fonte de inóculo. Apesar de terem sido capturados esporos distantes 120 m da palha infectada, dificilmente esse inóculo seria suficiente para causar epidemia, pois a frequência e a quantidade de esporos capturados foram consideradas baixas.

O armazenamento da semente infectada por *S. maydis* e *S. macrospora* garante a sobrevivência destes patógenos até o momento da semeadura, quando recebem os estímulos do ambiente para iniciar o processo de germinação. A partir deste momento, a transmissão dos patógenos pelas sementes assume um papel ainda mais preocupante, tendo esta como disseminadora desses patógenos. Desse modo, entender os mecanismos de transmissão garante subsídios para o estabelecimento de padrões de tolerância dentro do processo de certificação de sementes, sendo *S. maydis* hoje enquadrada como praga não quarentenária regulamentada (praga prejudicial associada aos materiais de propagação), com a proposta de um nível de tolerância de 2% para amostras de 400 sementes (BRASIL, 2009).

A transmissão de patógenos por sementes pode ocorrer da planta para a semente e da semente para a planta. No último caso, a semente pode veicular o patógeno, sem, contudo, desencadear a doença, já que essa associação nem sempre assegura a ocorrência da doença e a transmissão ocorre somente se houver o estabelecimento do patógeno (NEERGAARD, 1979).

O processo de transmissão das espécies de *Stenocarpella*, descrito na literatura, tem início por meio do micélio do fungo que coloniza o sistema radicular e a base do colmo. A passagem do inóculo da semente via mesocótilo,

alcançando a coroa, as raízes e, finalmente, a base do colmo, é um processo lento, que pode coincidir com o ciclo da cultura (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

Para os estudos sobre mecanismos de transmissão de patógenos, com o objetivo de acompanhar a trajetória do patógeno, a partir de sementes contaminadas/infectadas, à progênie, tem sido comum o uso de técnicas de isolamento convencionais em que tecidos de plantas suspeitas de infecção são incubados em meios de cultura agarizados ou em substrato de papel com assepsia. Após a incubação, observações microscópicas são realizadas para a identificação de estruturas típicas dos patógenos. Em níveis mais avançados, podem-se utilizar técnicas baseadas em análises de marcadores moleculares/bioquímicos ou observações em microscópios eletrônicos. Mais recentemente, marcadores genéticos para a expressão de proteínas fluorescentes, como *green fluorescent protein* (GFP) e *red fluorescent protein* (DsRed), têm sido utilizados com sucesso.

A proteína GFP, original da medusa *Aequorea Victoria* (PRASHER, 1992), é um polipeptídeo de 238 aminoácidos, com peso molecular de 28 kDa, que absorve luz em picos máximos de 395 e 475 nm e emite no pico máximo de 508 nm (CUBITT et al., 1995; LORANG et al., 2001). A fluorescência é derivada de uma sequência de ativação de duas fotoproteínas, aequorina e GFP. Inicialmente, a aequorina se liga ao cálcio, emitindo uma luz azul que, por sua vez, excita a GFP que produz fluorescência verde (FIGUEIRA, 2002). Entretanto, o DsRed, a proteína vermelha fluorescente, é originado de um coral, o *Discoma* sp., e se diferencia do GFP por necessitar de um comprimento de onda maior, aproximadamente 583 nm, para a sua visualização.

Diversos fatores são necessários para o sucesso da expressão das proteínas fluorescentes numa célula. É importante atentar para a qualidade do microscópio e dos filtros a serem utilizados e, para a possível detecção e

visualização, uma quantidade mínima de GFP e DsRed deve ser sintetizada dentro da célula. Com isso, torna-se importante a escolha dos promotores (plasmídios) e das metodologias empregadas para a transformação da célula (FIGUEIRA, 2002).

A expressão das proteínas GFP e DsRed não apresenta interferência no desenvolvimento normal das células fúngicas, não afetando, assim, a morfologia do fungo e da colônia, a taxa de crescimento, a pigmentação e a formação de conídios, e os isolados continuam tão patogênicos quanto o tipo selvagem. Portanto, a técnica empregada permite o acompanhamento de detalhes do processo de infecção, penetração, colonização e crescimento do fungo, dentro e fora dos tecidos (CHALFIE et al., 1994; COMARCK, 1998; LAGOPODI et al., 2002; LORANG et al., 2001; NAHALKOVA; FATEHI, 2003).

Diferentes patossistemas puderam ser estudados com a obtenção de fungos transformados, como *Colletotrichum lindemuthianum*, em feijão (DUMAS et al., 1999); *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola*, em banana (BALINT-KURTI; MAY; CHURCHILL, 2001); *Fusarium oxysporum*, em tomate (ABOUL-SOUD et al., 2003; LAGOPODI et al., 2002); *Fusarium verticillioides*, em milho (OREN et al., 2003); *Colletotrichum* sp., em tabaco (CHEN; HSIANG; GOODWIN, 2003); *Sclerotinia sclerotiorum*, em feijão, canola, girassol e soja (SILVA; BOLTON; NELSON, 2009) e o processo de infecção causada por *Rosellinia necatrix* (PLIEGO et al., 2009).

Fungos transformados com GFP foram utilizados em diferentes trabalhos envolvendo, principalmente, sementes. Du et al. (1999) conseguiram um bom nível de expressão do GFP em *Aspergillus flavus*, mostrando a viabilidade do uso da técnica para monitorar a colonização de sementes de milho e indicando, também, ser possível a sua utilização na triagem de sementes provenientes de linhagens resistentes obtidas em programas de melhoramento genético. Em estudo de sementes de algodão com *Aspergillus flavus*

transformado com GFP, conseguiu-se elucidar, com detalhes, a dinâmica do processo de colonização desse fungo. Assim, foram observados todos os tecidos das sementes colonizadas e a velocidade dessa colonização, concluindo-se que o fungo coloniza o interior da semente, o tegumento e os cotilédones, no prazo de 72 horas, e a sua entrada na semente ocorre através de poros. Ainda foi possível observar a produção de aflatoxina do fungo (RAJASEKARAN et al., 2008).

Em relação ao uso de microscopia eletrônica varredura inúmeros trabalhos têm sido realizados com diversos patossistemas. Esta ferramenta têm-se mostrado, extremamente, útil para elucidar alguns aspectos na interação entre microrganismos e tecidos de plantas hospedeiras. Especificamente, para estudos sobre a interação entre patógenos em sementes, com intuito, de obter estas infectadas para diversas finalidades, poucas informações são mencionadas na literatura. Para *S. maydis*, estudo voltado para essa interação patógenos-sementes, pode ser citado, o trabalho realizado de eventos ocorridos durante as fases de pré-penetração e penetração com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura em sementes de milho e aveia (MURPHY; CAMPBELL; PAPPELIS, 1974). Para *S. macrospora*, as informações existentes dizem respeito a estudos histológicos considerando a penetração do fungo em tecidos foliares de um híbrido suscetível de milho (BRUNELLI et al., 2005).

REFERÊNCIAS

- ABOUL-SOUD, M. A. M. et al. Transformation of *Fusarium oxysporum* by particle bombardment and characterisation of the resulting transformants expressing a GFP transgene. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 158, n. 4, p. 1-8, Dec. 2003.
- BALINT-KURTI, P. J.; MAY, G. D.; CHURCHILL, A. C. L. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 9-15, Dec. 2001.
- BARROS, E. et al. A dna-based method to quantify *Stenocarpella maydis* in maize. **Maydica**, Bergamo, v. 53, n. 1, p. 125-129, July 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 47**, de 26 de fevereiro de 2009. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://legisweb.com.br/legislacao/?id=213774>>. Acesso em: 10 fev. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, 2009. 200 p.
- BRUNELLI, K. R. et al. Germinação e penetração *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 187-190. Nov. 2005.
- CASA, R. T. et al. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 4, p. 353-357, abr. 2007.
- _____. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: SANDINI, I. A.; FANCELLI, A. L. (Ed.). **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 131-146.
- CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 355-361, jul./ago. 2003.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 141-147, mar./abr. 2004.

_____. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 427-439, set./out. 2006.

CASA, R. T.; ZAMBOLIM, L.; REIS, E. M. Transmissão e controle de *Diplodia* em sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 436-441, dez. 1998.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular Técnica, 83).

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 1147-1153, May 2006.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein a marker for gene expression. **Science**, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.

CHEN, N.; HSIANG, T.; GOODWIN, P. H. Use of green fluorescent protein to quantify the growth of *Colletotrichum* during infection of tobacco. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 113-122, Jan. 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos safra 2012/2013**. Disponível em: <<http://www.conaba.gov.br>>. Acesso em: 20 maio 2013.

CORMACK, B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 406-410, Aug. 1998.

CUBITT, A. B. et al. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 20, n. 11, p. 448-455, Nov. 1995.

CUTLER, H. G. et al. Diplodiol: a new toxin from *Diplodia macrospora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, n. 1, p. 135-138, Jan. 1980.

DENTI, E. A.; REIS, E. M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do planalto médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 585-590, ago. 2003.

DU, W. et al. Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 834-836, Mar. 1999.

DUMAS, B. et al. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1769-1771, Apr. 1999.

FIGUEIRA, A. R. O uso de *gfp* (Green Fluorescent Protein gene) como marcador da expressão gênica. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. 1 CD-ROM.

GUILLEMETTE, T.; IACOMI-VASILESCU, B.; SIMONEAU, P. Convencional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, n. 5, p. 490-496, May 2004.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 4, n. 1, p. 1-180, 1976.

LAGOPODI, A. L. et al. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 2, p. 172-179, Feb. 2002.

LATTERELL, F. M.; ROSSI, A. E. *Stenocarpella macrospora* (= *Diplodia macrospora*) and *S. maydis* (= *D. maydis*) compared as pathogens of corn. **Plant Disease**, Quebec, v. 67, p. 725-729, 1983.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P. A PCR-Based assay to detect *Rhynchosporium secalis* in barley seed. **Plant Disease**, Quebec, v. 85, n. 2, p. 220-225, 2001.

LEE, H. K.; TEWARI, J. P.; TURKINGTON, T. K. Symptomless infection of barley seed by *Rhynchosporium secalis*. **Canadian Journal of Pathology**, Ottawa, v. 23, n. 3, p. 315-317, May 2001.

LORANG, J. M. et al. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, May 2001.

MACHADO, J. C. et al. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 20, p. 1-24, 2012.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 375-398.

MARIO, J. L.; REIS, E. M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 670-672, jun. 2001.

MURPHY, J. A.; CAMPBELL, L. L.; PAPPELIS, A. J. Morphological observations of *Diplodia maydis* on synthetic and natural substrates as revealed by scanning electron-microscopy. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 232-250, Jan. 1974.

NAHALKOVA, J.; FATEHI, J. Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporterin *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 225, n. 2, p. 305-309, Feb. 2003.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The MacMillan, 1979. v. 1, 839 p.

OREN, L. et al. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1695-1701, Mar. 2003.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular Técnica, 75).

PINTO, N. F. J. A. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2005. 14 p. (Circular Técnica, 66).

PLIEGO, C. et al. GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 137-145, Feb. 2009.

PRASHER, D. C. Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 229-233, Feb. 1992.

RAJASEKARAN, K. et al. Development of a GFP-Expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 165, n. 2, p. 89-97, Feb. 2008.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80 p.

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

REIS, E. M.; MARIO, J. L. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar, e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 143-147, jan. 2003.

RHEEDER, J. P. et al. Incidence of *Fusarium* and *Diplodia* species and other fungi in naturally infected grain of South African maize cultivars. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, n. 97, p. 102, 1990.

SILVA, A. P. de; BOLTON, M. D.; NELSON, B. D. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 58, n. 3, p. 487-496, June 2009.

SILVA, A. R.; JULIATTI, F. C. Esporulação de *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* em diferentes meios de cultura. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 127-131, 2005.

SUTTON, B. C. **The coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

SUTTON, B. C.; WATERSTON, J. M. **Diplodia maydis**: descriptions of pathogenic fungi and bacteria. London: CMI, 1966.

TAYLOR, E. J. A. et al. Rapid- cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, n. 3, p. 347-355, 2001.

TRENTO, S. M.; IRGANG, H.; REIS, E. M. Efeito de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 609-613, jul. 2002.

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. 3rd ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999. 105 p.

XIA, Z.; ACHAR, N. Random amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction markers for the differentiation and detection of *Stenocarpella maydis* in maize seeds. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 1, p. 35-44, July 2001.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

TRANSMISSÃO DE *Stenocarpella maydis* A PARTIR DE SEMENTES DE MILHO

TRANSMISSION OF Stenocarpella maydis FROM CORN SEED

Preparado em acordo com Revista Ciência Agronômica (versão preliminar)

Carolina da Silva SIQUEIRA¹, Ellen Noly BARROCAS², José da Cruz MACHADO³, Carla Lima CORRÊA⁴

1. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, kerolpet@gmail.com; 2. Pós-doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, Bolsista CAPES; 3. Professor Doutor Titular do Departamento de Fitopatologia - UFLA, Bolsista CNPq, machado@dfp.ufla.br; 4. Pós-doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, Bolsista CAPES.

RESUMO

Stenocarpella maydis é um dos principais fungos que se associam às sementes de milho, sendo agente causal da podridão do colmo e de espiga, que ocasiona perdas consideráveis em regiões produtoras desta cultura no Brasil. O referido organismo tem sido enquadrado como uma praga sujeita à padronização sanitária em programas de certificação de sementes vigentes no país. O objetivo, neste trabalho, foi avaliar a taxa de transmissão do referido fungo a partir de sementes de milho infectadas. As sementes foram inoculadas com dois isolados, pelo método de condicionamento fisiológico no qual as sementes são mantidas em contato com colônias do fungo por 24 (P1), 48 (P2), 72 (P3) e 96 (P4) horas. Foram utilizadas duas cultivares, sendo uma suscetível (C1-RB9308YG) e outra moderadamente resistente (C2-RB9108), e o ensaio foi conduzido em duas temperaturas (20 °C e 25 °C). As sementes inoculadas foram distribuídas, individualmente, em copinhos plásticos contendo substrato. As plantas foram avaliadas diariamente quanto ao estande e ao aparecimento de sintomas em pós-emergência. Com base em sementes/plântulas mortas, o percentual máximo observado foi de 90,5% para o potencial de inóculo P4, sendo este resultado mais elevado do que os alcançados pelas taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas. Em relação à taxa de transmissão total, observou-se a transmissão do patógeno em todos os potenciais de inóculo, variando estes valores entre 20,3%, para C2, no potencial P1 sob temperatura de 20 °C e 94,4%, para C1, no potencial P3, sob temperatura de 20 °C.

Palavras-chave: Fitopatologia. Patologia de sementes. Restrição hídrica. Podridão do colmo e da espiga. Fungo.

ABSTRACT

Stenocarpella maydis is one of the major fungi that associate with corn seeds, being the causal agent of the stem and ear rot disease, causing considerable losses in this crop in Brazil. This organism has been considered as a pest subject to standardization in health programs for seed certification in force in the country. The aim in this study was to evaluate the transmission rate of the fungus from infected maize seeds. The seeds were inoculated with two isolates, using the physiological conditioning method in which the seeds are kept in contact with fungal colonies for 24 (P1), 48 (P2), 72 (P3) and 96 (P4) hours.

Two cultivars were used, one susceptible (C1-RB9308YG) and another (C2-RB9108) moderately resistant to stem and ear rot, and the test being conducted at two temperatures (20 °C and 25 °C). The inoculated seeds were distributed individually in plastic cups containing autoclaved soil substrate. Evaluation was made daily for plant emergency and disease symptoms in emerged plants. In relation to dead of seeds/seedlings, the maximum percentage observed was 90.5% for the inoculum potential P4, which was higher than the transmission rates observed for symptomatic and asymptomatic plants. Regarding the total transmission rate, it was observed in all the pathogen inoculum potentials varying between 20,3% for the potential P1, cultivar C2 and temperature of 20 °C and 94,4% for the cultivar C1 and potential P3 at 20 °C.

Keywords: Phytopathology. Seed pathology. Water restriction. Ear and stalk rot. Fungus.

INTRODUÇÃO

O fungo *Stenocarpella maydis* (Berk.) sacc. é um importante patógeno da cultura do milho, incitando podridões do colmo, raízes, espigas e morte de plântulas (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006). No Brasil, a doença está presente em todas as regiões produtoras e ocasiona perdas no rendimento e redução na qualidade dos grãos, além de ser potencial produtora de micotoxina causadora de morte de animais (DORRANCE; HINKELMAN; WARREN, 1998; EDDINS, 1930; PINTO, 2006).

Trata-se de um fungo que pode ser encontrado em restos de cultura, na forma de micélio livre no solo e dormente no interior das sementes (FLETT; WEHNER, 1991; FLETT; WEHNER; SMITH, 1992; PINTO; FERNANDES; OLIVEIRA, 1997). Devido a este fato, a semente desempenha papel fundamental na transmissão desse patógeno para plantas de milho e na disseminação do mesmo, constituindo-se importante fonte de inóculo primário da doença em questão.

A transmissão do *S. maydis* por meio de sementes assume papel importante em campos de cultivo onde o milho nunca foi cultivado, ou em áreas de plantio direto. Seu processo de transmissão a partir de sementes tem início com a colonização do sistema radicular e da base do colmo pelo micélio do fungo. O processo de colonização pode ser lento e coincidir com o ciclo da cultura (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

A extensão da colonização da planta por esse fungo e a porcentagem de sua transmissão da semente e para a planta dependem de características específicas da interação patógeno-hospedeiro. Vários fatores influenciam este processo, como a quantidade e a posição do inóculo nas sementes, a temperatura, a umidade, a microflora do solo, o tempo de sobrevivência do patógeno na semente e o genótipo do hospedeiro, dentre outros (ARAÚJO *et al.*,

2006; MACHADO, 1994; SHAH; BERGSTROM, 2000; TANAKA; MACHADO, 1985). Entender tais particularidades é importante por gerar subsídios para o estabelecimento de padrões de tolerância deste patógeno em programas de certificação de sementes.

Devido à importância da cultura do milho e aos prejuízos causados pela interação das sementes desta espécie com *S. maydis*, há, atualmente, no Brasil, uma proposição de padrão sanitário para este patossistema, com base em estudo de análise de risco, feito nos últimos anos no país (MACHADO; POZZA, 2005).

Com base na inexistência de mais detalhes sobre a transmissão do referido patógeno pelas sementes de milho é que se conduziu este trabalho, no qual foram levados em consideração o potencial de inóculo do patógeno nas sementes, o genótipo do milho e as condições de cultivo em condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Multiplicação dos isolados e perfil das sementes. Foram utilizados dois isolados de *S. maydis* denominados CML698 e MY2, obtidos da Coleção Micológica de Lavras - Universidade Federal de Lavras e Empresa Brasileira de da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Milho e Sorgo. Os isolados foram repicados para placas de Petri contendo o meio BDA (20 g de ágar, 20 g de dextrose e 200 g de batata/litro) e mantidos em câmara do tipo BOD à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. As sementes de milho, cultivares RB9308YG, suscetível à *S. maydis* (C1) e RB9108, moderadamente resistente à *S. maydis* (C2), ambas provenientes da Empresa

Riber Sementes/MG, foram submetidas, previamente, ao teste de germinação (rolo de papel) e sanidade (“Blotter test”), de acordo com a RAS (BRASIL, 2009a) e o Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009b).

Inoculação das sementes. Utilizou-se o método de condicionamento osmótico (MACHADO *et al.*, 2001), que permite o contato das sementes com o patógeno desenvolvido em substrato agarizado, por diferentes períodos. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e lavadas, em seguida, com água esterilizada. Placas de Petri foram anteriormente preparadas com meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol com potencial hídrico ajustado para -1,4 MPa, conforme o software SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). Os isolados foram repicados para estas placas e incubados, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, onde permaneceram por cinco dias. Em seguida, as sementes, de ambas as cultivares, foram depositadas em camada simples, de maneira uniforme, em contato com colônia fúngica, por 24, 48, 72 e 96 horas, sendo estes tempos correspondentes a diferentes potenciais de inóculo, nomeados P1, P2, P3 e P4, respectivamente. Para avaliar o efeito do restritor hídrico, na ausência do fungo, sementes de ambas as cultivares foram depositadas em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura BDA modificado com manitol, pelos mesmos períodos de tempo utilizados para a inoculação do fungo.

Teste de sanidade. Para obtenção das taxas de transmissão foram realizados *Blotters test* para estimativa real da transmissibilidade de *S. maydis* nos diferentes potenciais de inóculo. Dessa forma, as sementes de milho inoculadas foram distribuídas sobre substrato de papel embebido em meio OA (20 g de ágar e 30 g de farinha de aveia/L), meio favorecedor da formação de picnídios da espécie (SILVA; JULIATTI, 2005), em placas de Petri com 15 cm

de diâmetro, sendo, oito repetições de 25 sementes por placa. Em seguida, as sementes foram colocadas em freezer à -20 °C por 24 horas e posteriormente incubadas por 7-15 dias em câmara de crescimento com temperatura de 20±2 °C, fotoperíodo de 12 horas. Ao final desse período, as sementes foram examinadas individualmente ao microscópio estereoscópico, verificando-se a incidência do fungo *S. maydis*.

Avaliação da transmissão de S. maydis em câmara de crescimento vegetal. As sementes foram distribuídas em copos plásticos de 200 ml contendo substrato comercial (Multiplanta trop sc 25 kg), sendo semeada uma semente por copo e utilizando-se 100 copos igualmente distribuídos em quatro bandejas (repetições). O experimento foi conduzido em câmaras com temperaturas ajustadas a 20 °C e 25±2 °C e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK T10 40W 6500K FL40T10-6 60Hz)/12 horas escuro. Foi avaliada diariamente, a emergência de plantas sintomáticas e assintomáticas da doença em questão. Plantas sintomáticas foram assepticamente colocadas e incubadas em placas de Petri contendo o meio BDA para a confirmação da presença de *S. maydis* nos tecidos avaliados. Após 28 dias da semeadura (d.a.s), todas as plantas assintomáticas foram coletadas e fragmentos de 2 cm de extensão na altura do colo (C) e última inserção das folhas (IF) foram desinfestados em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e água destilada e esterilizada, por 1 minuto, e secos em papel esterilizado. Todos os fragmentos foram depositados em placas de Petri com o meio BDA e incubadas, à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 7 e 15 dias, os fragmentos foram avaliados individualmente no microscópio estereoscópico, para a observação de estruturas características de *S. maydis* (MARIO; REIS, 2001).

A detecção de *S. maydis* em pelo menos um dos fragmentos examinados por planta foi suficiente para a confirmação da transmissão de *S. maydis* da semente para a planta.

Delineamento experimental. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial triplo 2 x 2 x 4 (2 temperaturas, 2 cultivares e 4 potenciais de inóculo), com quatro repetições por tratamento.

Confirmação da presença de S. maydis em partes de plantas assintomáticas por meio da técnica de Bio-PCR. No mínimo, vinte por cento das plantas de cada tratamento, nas quais não foram observados sintomas da doença, foram coletadas de maneira aleatória e submetidas à análise em Bio-PCR. Para isso, fragmentos de 2 cm da região do colo (C) e da última inserção de folhas (IF) das plantas foram avaliados individualmente. Para as extrações de DNA, utilizou-se o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Os *primers* P1/P2 descritos por Xia e Achar (2001), específicos para o gênero *Stenocarpella*, foram utilizados para detectar a presença do fungo nos tecidos. A amplificação foi realizada em 25 µl da reação contendo tampão da PCR (tampão IB - Phoneutria, Brasil – 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, MgCl₂), dNTPs (2,5 mM de cada dNTP), *primers* (10 µM de cada *primer forward* ou *reverse*) e 5 u/µl unidades *Taq* DNA polimerase (Phoneutria, Brasil), sendo adicionados 2 µl do DNA para compor o volume total. O ciclo constou, inicialmente, de 95 °C, por 3 minutos, desnaturação, a 94 °C, por 30 segundos, anelamento, a 60 °C, por 1 minuto e extensão de 72 °C, por 1 minuto, com extensão final de 72 °C, por 10 minutos, perfazendo um total de 30 ciclos. Uma alíquota de 10 µl foi utilizada para analisar os produtos da PCR em gel de agarose 1% em tampão TBE, corado com GelRed[®], a 150 V por,

aproximadamente, 2 horas. Os produtos da PCR foram observados em transluminador UV, equipamento L-Pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil).

Análise estatística. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar[®] versão 5.3 (FERREIRA, 2011). As análises de variância foram realizadas individualmente para cada isolado de *Stenocarpella maydis*, além do controle (não inoculado), no esquema fatorial triplo. Para as variáveis, morte em pré-emergência e taxas de transmissão com observação de plantas sintomáticas e assintomáticas, as análises de variância foram corrigidas por meio da transformação dos dados em raiz quadrada de (dados+1) por conter muitos valores iguais a zero. As médias entre os tratamentos foram comparadas por regressão, teste Tukey ou teste t de Student ($P \leq 0,05$). Para a taxa de transmissão total, consideraram-se todos os percentuais das taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas e morte em pré-emergência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos testes de sanidade dos perfis dos lotes utilizados, observou-se na cultivar C1 (RB9308YG) a incidência de 28,5% de *Fusarium verticillioides* e de 13% de *Penicillium* sp. e, na cultivar C2 (RB9108), a incidência de 25,5% e de 11% desses fungos observados. Nas sementes utilizadas nos experimentos, não foi observada a presença de *Stenocarpella maydis*. Os percentuais de germinação foram de 98% de plântulas normais, para C1 e 96%, para C2.

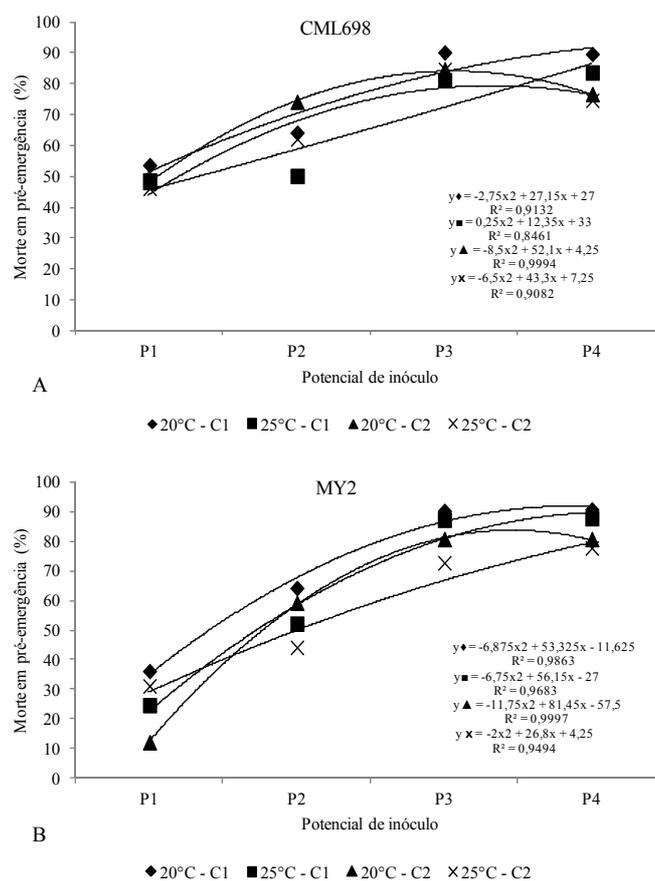
A análise de variância para a morte de sementes em pré-emergência e as taxas de transmissão de sementes para plantas, quando as sementes foram inoculadas com os dois isolados de *S. maydis*, revelou uma interação tripla não significativa ($p \leq 0,05$).

Uma das consequências causadas por *S. maydis* é a morte de sementes/plântulas em pré-emergência, sendo esta morte, também, muitas vezes, caracterizada como uma confirmação da infecção do fungo nas sementes que tiveram contato direto com o patógeno, ou indireto, por meio da transmissão oriunda da planta mãe. Neste caso, para a estimativa da morte de sementes/plântulas em pré-emergência de cada tratamento, foi observada a influência do manitol nos tratamentos controle. Então, o efeito do restritor hídrico foi subtraído dos tratamentos com fungo, eliminando-se, assim, a possível influência repressora que este pode causar na qualidade fisiológica das sementes (COSTA *et al.*, 2003).

Na Figura 1, é possível observar que houve variação no número de sementes/plântulas mortas em pré-emergência, considerando as duas cultivares e temperaturas avaliadas. De acordo com as avaliações, em média 50% das sementes plantadas emergiram quando foram expostas ao menor potencial de inóculo. À medida que se aumentou o tempo de exposição, aumentou também o número de sementes/plântulas mortas por causa do fungo *S. maydis*, independente da cultivar ou da temperatura. O maior número de sementes/plântulas mortas foi observado com o isolado CML698, no potencial de inóculo mais elevado (sementes expostas ao patógeno por 96 horas), para cultivar C1 e sob temperatura de 20 °C. Neste caso, somente 9,5% das sementes foram capazes de emergir e formar plantas normais. Já para as sementes da cultivar C2 infectadas pelo isolado MY2 (Figura 1B), houve uma maior variação entre os diferentes potenciais de inóculo. No potencial P1, houve um menor índice de sementes/plântulas mortas na temperatura de 20 °C, apesar de ocorrer um aumento deste índice com o aumento do potencial de inóculo do patógeno, a exemplo do que ocorreu com o isolado CML698. Para a cultivar C1, considerada suscetível a *S. maydis*, a emergência de plantas em P1 foi em torno de 65% nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.

O maior número de sementes/plântulas mortas da cultivar C1, nos potenciais de inóculo mais elevados de *S. maydis*, confirma a característica genética deste material, que é considerado mais suscetível ao referido patógeno, independente da temperatura em que foi desenvolvido este trabalho.

Figura 1 - Percentual de morte de sementes/plântulas de milho em pré-emergência, causada pelo fungo *Stenocarpella maydis*, em relação a dois isolados (A-CML698 e B-MY2), em diferentes potenciais de inóculo, sendo P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h), duas temperaturas (20 °C e 25 °C) e duas cultivares (C1-RB9308YG e C2-RB9108).



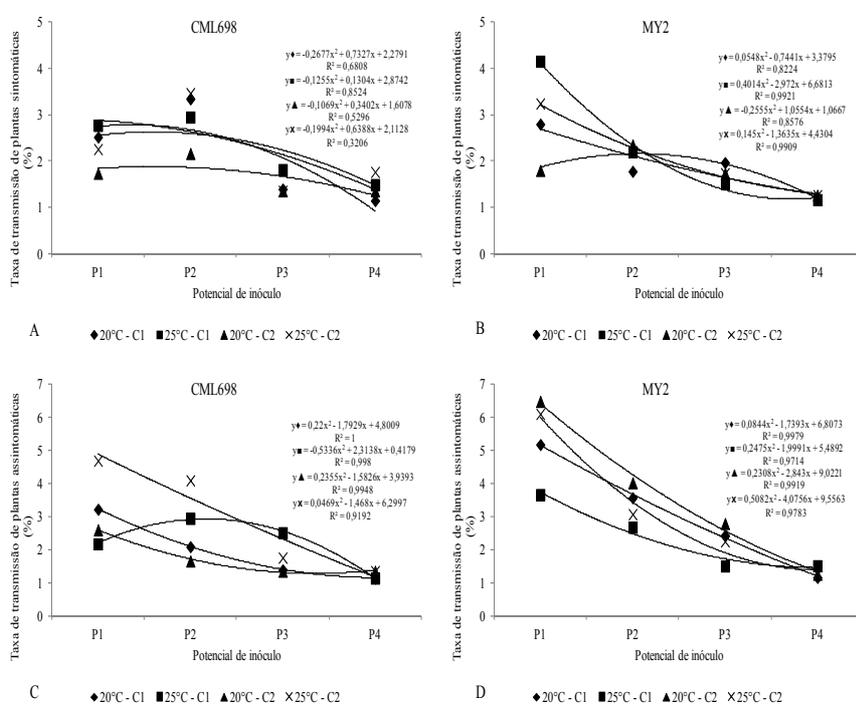
Por meio da literatura, sabe-se que o fungo *S. maydis* pode colonizar o embrião das sementes e ocasionar, por conseguinte, a morte destas em pré-emergência. Nos casos em que o patógeno coloniza outras partes das sementes, nem sempre há o impedimento da emergência de plantas, porém, ele pode conduzir ao comprometimento do vigor das plantas emergidas (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; REIS; CASA, 2001). Em ambos os casos, o plantio de sementes contaminadas e/ou infectadas é um meio eficaz de introdução do agente da podridão do colmo e da espiga em campos de cultivo do milho.

O uso de sementes de milho infectadas por *S. maydis* torna-se ainda mais preocupante em sistemas de plantio direto, nos quais a disponibilidade de substratos e a sua lenta decomposição favorecem a esporulação, a liberação e a dispersão deste organismo nas áreas de produção. Este fato tem sido considerado como um dos principais fatores para a maior intensidade das podridões do colmo e da espiga observadas em monocultura de milho (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2003; REIS; CASA, 2001).

A transmissão de *S. maydis* a partir de sementes às plantas emergidas com sintomas (sintomáticas) e sem sintomas (assintomáticas) foi observada neste estudo com confirmação da presença do fungo em tecidos dessas plantas por meio de isolamentos realizados em laboratório (Figura 2). Com base nestas observações verificou-se que as taxas de transmissão do fungo foram mais baixas quando comparadas à morte em pré-emergência. De modo geral, nos potenciais de inóculo inferiores, P1 e P2, a maior taxa de transmissão foi de 4,15%, para plantas sintomáticas e de 6,48% para P1, nas plantas assintomáticas. Nas plantas sintomáticas, apesar da presença de picnídios ser comum no campo (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004), neste estudo, isto não foi observado, provavelmente pela época de avaliação das plantas, ainda jovens. No entanto,

um sintoma observado neste trabalho, e citado como importante por Casa, Reis e Zambolim (2006), foram as folhas murchas de plantas infectadas, tornando-se verde-acinzentadas e secas, semelhante aos danos causados por geada.

Figura 2 - Taxas de transmissão de *Stenocarpella maydis* de sementes à progênie com formação de sintomas e sem formação de sintomas. A e C - isolado CML698; B e D - isolado MY2. Ambos os isolados nos potenciais P1, P2, P3 e P4 (24h, 48h, 72h, 96h), nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108) cultivadas a 20 °C e 25 °C.



Neste trabalho, foram observadas diferenças entre as taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas, em relação à temperatura de cultivo. Na temperatura de 25 °C, que é mais favorável ao desenvolvimento de *S. maydis*, foram observadas taxas de transmissão do patógeno mais elevadas. Para o fator genótipo verificou-se, na cultivar C2 (RB9108), uma resistência

ligeiramente superior à do patógeno do que na cultivar C1 (RB9308YG), confirmando as características genéticas de moderadamente resistente deste material a *S. maydis*. As taxas de transmissão de sementes com o isolado MY2 foram mais elevadas do que as taxas com o isolado CML698. Os fragmentos das plantas provenientes de sementes infectadas pelo referido isolado apresentavam também crescimento micelial mais intenso do que o outro, comprovando a diferença de agressividade entre os dois isolados utilizados neste trabalho.

De maneira geral, a taxa de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas foi variável entre 1% e 6,4%, considerando graus variados de resistência genética do hospedeiro, temperaturas e virulência de isolados do fungo. Apesar de esses valores serem considerados baixos no âmbito da transmissão do fungo de sementes para plantas, é importante salientar que a planta infectada pode prestar-se, também, como um agente de disseminação desse organismo no campo, sendo substrato para sua sobrevivência e constituindo importante fonte de inóculo para novos plantios na mesma área de cultivo.

Em relação à taxa de transmissão de *S. maydis* de sementes às plantas assintomáticas, considerando-se a posição da planta analisada, colo (C) e a região da última inserção de folhas (IF), observou-se uma variação entre os valores, sem haver um padrão neste tipo de associação (Figura 3). Conforme já referenciado, os potenciais de inóculo P1 e P2 foram os que proporcionaram um maior número de plantas assintomáticas. O aparecimento de *S. maydis*, seja na região do colo (C) ou na inserção das folhas (IF), pode representar os vários caminhos que o fungo pode percorrer da semente até os tecidos das plantas emergidas. Tais trajetórias podem variar, dependendo da parte da semente contaminada e/ou infectada, da forma de germinação das sementes, do tempo no qual a semente foi exposta ao patógeno (potencial de inóculo), dentre outros fatores. Para sementes infectadas artificialmente pela técnica de

condicionamento fisiológico, as sementes são dispostas sobre a colônia fúngica, o que pode favorecer a infecção do pericarpo e do endosperma, sendo que nos potenciais mais elevados pode ocorrer a infecção do embrião. Mesmo que somente tenha acontecido a contaminação de sementes, no momento da emergência, o desenvolvimento do embrião pode representar um importante início do processo de transmissão da semente para a planta.

Outro ponto importante que merece atenção é a transmissão do fungo em plantas assintomáticas, que podem abrigar o patógeno na forma latente, podendo, assim, haver a infecção da planta em estádios mais avançados de desenvolvimento, que são mais favoráveis ao ataque desse patógeno, como ocorre no período de duas a três semanas após a polinização, com clima úmido e temperatura de 28-30 °C (CASA *et al.*, 2007; SHURTLEFF, 1992).

Nas avaliações feitas por meio da técnica de Bio-PCR, para detectar a presença de *S. maydis* nos fragmentos de plantas emergidas assintomáticas em todos os potenciais de inóculo (Figura 4), observou-se que a maior incidência do fungo foi de 6,72%, para a cultivar C2 com o isolado CML698, no potencial P2 e temperatura de 25 °C, apesar dos resultados positivos em maior número e com valores médios mais elevados terem ocorrido para o isolado MY2. Nos experimentos conduzidos na temperatura de 25 °C, nas duas cultivares e com ambos os isolados, verificaram-se as incidências mais elevadas.

Importante destacar que a técnica de Bio-PCR foi eficiente para detectar o patógeno em amostras nas quais o teste tradicional de isolamento, em meio de cultura, não foi suficientemente eficaz para a detectá-lo em plantas assintomáticas. Por meio dessas técnicas é possível detectar a presença dos organismos, mesmo em condição de dormência, ao contrário das demais técnicas, que revelam apenas a presença desses agentes em plena atividade biológica. Por outro lado, vale lembrar que o resultado positivo, revelado pelas técnicas moleculares tipo PCR, pode conduzir a resultados falsos positivos, em

que a detecção pode ocorrer de organismos inviáveis. Para a detecção de *Stenocarpella* associada às sementes de milho, essa técnica, embora recente, tem se revelada promissora (BARROCAS, 2008).

Figura 3 - Incidência de *Stenocarpella maydis* em plantas assintomáticas, seccionadas em: colo (C) e inserção foliar (IF). A- isolado CML698 e B- isolado MY2, nos potenciais de inóculo P1-24h, P2-48h, P3-72h e P4-96h, nas duas cultivares (C1-RB9308YG e C2-RB9108) e duas temperaturas de cultivo (20 °C e 25 °C).

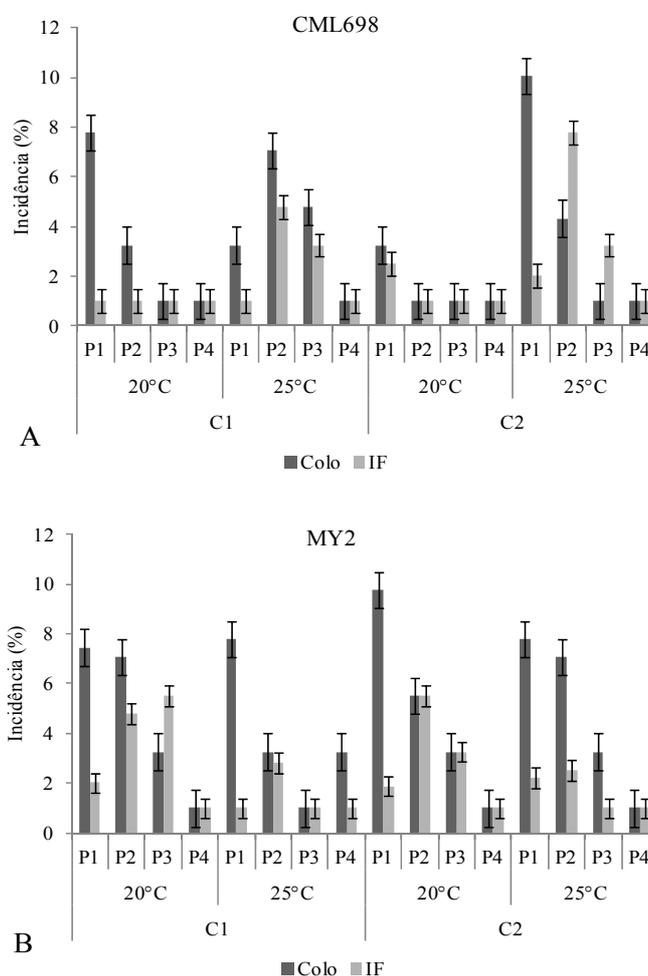
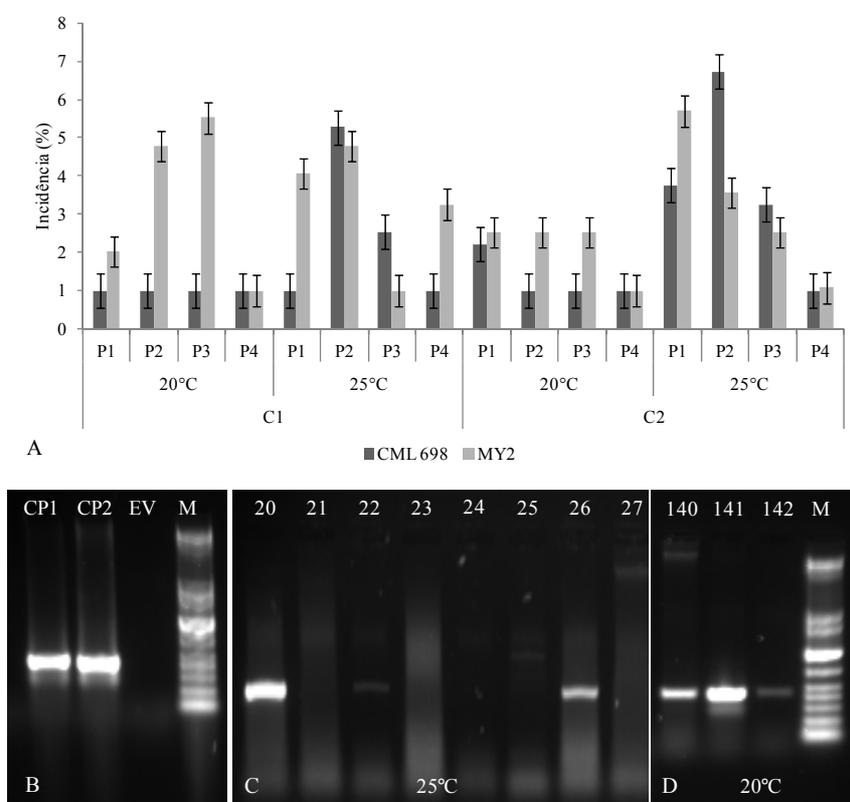


Figura 4 - A- Detecção dos isolados CML698 e MY2 de *Stenocarpella maydis*, nos potenciais de inóculo P1-24h, P2-48h, P3-72h e P4-96h, por meio da técnica de Bio-PCR, realizada em secções de plantas assintomáticas das cultivares C1-RB9308YG e C2-RB9108, desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. B- controle positivo da Bio-PCR (CP1 e CP2), água (EV) e o marcador (M). C- alguns resultados positivos de amostras de plantas mantidas a 25 °C (20, 21, 26). D- resultados positivos de amostras de plantas mantidas a 20 °C (140, 141 e 142).

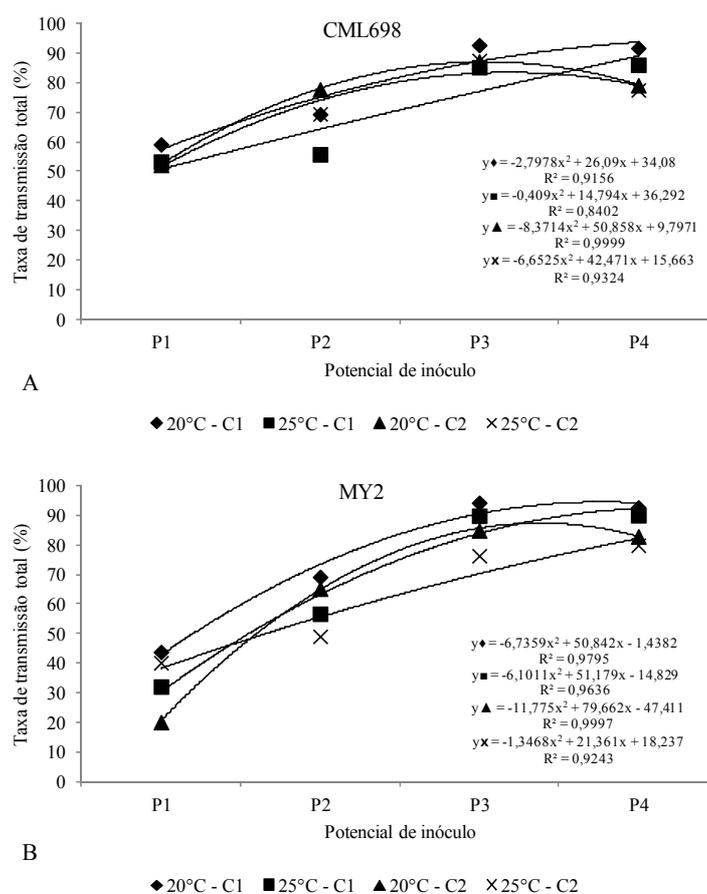


Do ponto de vista epidemiológico, a taxa de transmissão de um patógeno de sementes à progênie deve considerar, no cálculo final, o somatório de sementes/plântulas mortas pela ação do patógeno e as plantas emergidas com infecção comprovada pelo patógeno (MACHADO, 1994). Neste caso, para *S.*

maydis, os maiores valores dessas taxas foram observados para os potenciais mais elevados P3 e P4, chegando estes a um máximo de 94,4% (Figura 5). Para os potenciais mais baixos, P1 e P2, as taxas oscilaram em torno de 50%. A taxa mínima alcançada, de todos os tratamentos, foi de 20,3%, para P1, na temperatura de 20 °C e com a cultivar C2 (RB9108). Para o isolado CML698 os maiores percentuais da taxa de transmissão, nos potenciais P3 e P4, foram de 92,8% e 91,8%, e, para o isolado MY2, 94,4% e 92,8%, respectivamente, sendo estes referentes à temperatura de 20 °C e C1 (RB9308YG). Os resultados deste trabalho indicaram que, se a semente está infectada, a transmissão será realizada, no mínimo, por meio de plantas sintomáticas e/ou assintomáticas, como observado também em estudo com *Fusarium verticillioides* em milho (WILKE *et al.*, 2007).

Com base nestes resultados, a transmissão de *S. maydis* de sementes infectadas para a planta pode ocorrer de forma variável, de acordo com o potencial de inóculo do patógeno nas sementes, além de fatores como agressividade do fungo, temperaturas prevalentes por ocasião da germinação e grau de resistência do hospedeiro. Neste estudo revela-se, também, que plantas assintomáticas oriundas de sementes inoculadas podem abrigar em seus tecidos inóculo do patógeno em foco. Este fato faz com que o estabelecimento de taxas de transmissão de patógenos, em geral, leve em consideração este contingente de plantas que, aparentemente, estariam livres da infecção pelos patógenos.

Figura 5 - Taxa de transmissão total de *Stenocarpella maydis*, relativa ao somatório de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas. A - isolado CML698 e B - isolado MY2, nos potenciais de inóculo P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h), inoculados nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108), mantidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.



De suma importância também, neste trabalho, é a abertura que se cria para o prosseguimento dos trabalhos, levando-se em consideração o papel de sementes mortas pela ação de *Stenocarpella maydis* que permanecem no solo durante todo o cultivo do milho.

CONCLUSÕES

1. A morte de sementes/plântulas em pré-emergência é uma das consequências mais agravantes da transmissão de *S. maydis*.
2. Plantas assintomáticas podem apresentar o patógeno na forma latente.
3. A taxa de transmissão de *S. maydis* foi determinada com o mínimo de 20,3% para cultivar C2 no potencial P1 e cultivada na temperatura de 20 °C e o máximo de 94,4% para C1 no P3 sob temperatura de 20 °C.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, D. V. *et al.* Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 035-040, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.

BARROCAS, E. N. Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas. 110p. Lavras, Minas Gerais, 2008 (Tese de Doutorado em Fitopatologia- UFLA).

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 355-361, 2003.

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.

CASA, R. T. *et al.* Efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 137-142, 2007.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular técnica, 83).

COSTA, M. L. N. *et al.* Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.5, p.1023-1030, 2003.

DORRANCE, A. E.; HINKELMAN, K. H.; WARREN, H. L. Diallel analysis of *Diplodia* ear rot resistance in maize. **Plant Disease**, v. 82, p. 699-703, 1998.

EDDINS, A. H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. **Phytopathology**, v. 20, p. 439-448, 1930.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FLETT, B. C.; WEHNER, F. C. Incidence of *Stenocarpella* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **Journal of Phytopathology**, v. 133, n. 4, p. 327-333, 1991.

FLETT, B. C.; WEHNER, F. C.; SMITH, M. F. Relationship between maize stubble placement in soil and survival of *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*). **Journal of Phytopathology**, v. 134, n. 1, p. 33-38, 1992.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.

MACHADO, J. C. *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: International seed testing congress-seed symposium, 26, 2001, Angers. **Proceedings...** Angers: ISTA, 2001. p. 62.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. IN: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**: Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 502p.

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

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v. 87, n. 1, p. 131-136, 1995.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. cap. 17, p. 821-863.

PINTO, N. F. J de A. **Podridão branca da espiga do milho**. Boletim Técnico Comunicado Técnico, Sete lagoas, n.141, p. 1-6, dez. 2006.

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

REIS, E. M.; CASA, R. T. Milho: manejo integrado de doenças. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Eds.) **Milho: tecnologia e produtividade**. Piracicaba SP. ESALQ/LPV, 2001. p. 223-237.

SHAH, D. A.; BERGSTROM, G. C. Epidemiologia e manejo de patógenos transmitidos por sementes, com ênfase nos fungos que formam picnídios. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 8, n. 3, p. 339-364, 2000.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. Saint Paul MN. American Phytopathological Society. 1992, p. 105.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 122, p. 40-46, 1985.

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

XIA, Z.; ACHAR, N. Random amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction markers for the differentiation and detection of *Stenocarpella maydis* in maize seeds. **Journal Phytopathology**, v. 149, n. 1, p. 35-44, 2001.

ARTIGO 2

**POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE *Stenocarpella macrospora* EM
SEMENTES DE MILHO INFECTADAS E CULTIVADAS EM
CONDIÇÕES CONTROLADAS**

*POTENTIAL TRANSMISSION OF Stenocarpella macrospora IN MAIZE SEEDS
INFECTED AND CULTIVATED UNDER CONTROLLED CONDITIONS*

Preparado em acordo com Bioscience Journal (versão preliminar)

**Carolina da Silva SIQUEIRA¹; Ellen Noly BARROCAS²; José da Cruz
MACHADO³; Mirella Figueiró de ALMEIDA⁴**

1. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, kerolpet@gmail.com; 2. Pós-doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, Bolsista CAPES; 3. Professor Doutor Titular do Departamento de Fitopatologia - UFLA, Bolsista CNPq, machado@dfp.ufla.br; 4. Pós-doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, Bolsista CNPq.

RESUMO

Sementes de milho infectadas por *Stenocarpella macrospora* podem ocasionar morte de sementes/plântulas, podridão do colmo e da espiga e manchas foliares. A transmissão deste patógeno por meio de sementes pode variar de acordo com a cultivar, as condições climáticas e a virulência do patógeno, entre outros fatores. O objetivo, neste trabalho, foi avaliar a taxa de transmissão de *S. macrospora* (dois isolados) a partir de sementes de duas cultivares de milho, uma suscetível (C1-RB9308YG) e outra moderadamente resistente (C2-RB9108), infectadas artificialmente e cultivadas em duas temperaturas (20 °C e 25 °C). A inoculação das sementes foi realizada pelo método de condicionamento osmótico, pelo qual as sementes foram mantidas em contato com as colônias do fungo, por 24 (potencial de inóculo 1 - P1), 48 (P2), 72 (P3) e 96 (P4) horas. Após a inoculação, 25 sementes foram distribuídas, individualmente, em copos plásticos contendo substrato, com 4 repetições, totalizando 100 sementes semeadas por tratamento, e colocadas em câmara de crescimento vegetal. As plantas foram avaliadas, diariamente, quanto ao aparecimento de sintomas e à morte em pré e pós-emergência. Ao final de 28 dias, todas as plantas foram analisadas por métodos biológicos, e amostras de todos os tratamentos, por PCR. As taxas máximas de transmissão com morte em pré-emergência de sementes/plântulas foram de 74,5% e 82,5%, para os potenciais P3 e P4, respectivamente, sendo estas taxas mais altas do que as taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas. A transmissão de *S. macrospora* da semente para planta foi observada em todos os potenciais de inóculo, sendo as taxas crescentes do menor para o maior potencial de inóculo. A maior taxa de transmissão total do referido patógeno neste estudo, 85,8%, ocorreu no potencial de inóculo mais elevado (P4) em sementes da cultivar C1, com cultivo na temperatura de 20 °C. A menor taxa foi de 15%, no menor potencial de inóculo em sementes da cultivar C2, à temperatura de 20 °C.

PALAVRAS-CHAVE: Patologia de sementes. Potencial de inóculo. Podridão do colmo e da espiga. Fungo.

ABSTRACT

Stenocarpella macrospora can cause death of seeds/seedlings, stem and ear rot and leaf spot from infected maize seeds. The transmission of this pathogen by means of seeds can vary according with the cultivar, climatic conditions, virulence of the pathogen and other factors. The objective in this work was to evaluate the transmission rate of *S. macrospora* (two isolates) from seeds of two maize cultivars, one susceptible (C1-RB9308YG) and another moderately resistant (C2-RB9108) using artificially infected seeds and cultivation at two temperatures (20 °C and 25 °C). Seed inoculation was done by the osmotic conditioning method, through which seeds were kept in contact with the fungal colonies for 24 (inoculum potential 1 - P1), 48 (P2), 72 (P3) and 96 (P4) hours. After inoculation, 25 seeds were distributed individually in plastic cups with substrate, with 4 replicates, totalling 100 seeds sown per treatment and these were placed in plant growth chamber. Plants were daily evaluated for disease symptoms and death in pre and post-emergence. Twenty eight days after sowing all plants were analyzed by biological health methods, and samples of all treatments by PCR. The maximum transmission rates based on dead seeds/seedlings in pre-emergence were 74.5% and 82.5% for the highest inoculum potentials, P3 and P4, which were higher than the transmission rates for symptomatic and asymptomatic plants. Transmission of *S. macrospora* from seed to plant occurred in all inoculum potentials. The highest rate being of 85,8% on seeds for the cultivar C1 at the highest inoculum potential (P4) with cultivation under 20 °C and the lowest transmission rate, 15%, occurred on seeds of the cultivar C2 at the lowest inoculum potential, P1, under temperature of 20 °C.

KEYWORDS: Seed pathology. Inoculum potencial. Ear and stalk rot. Fungus.

INTRODUÇÃO

Stenocarpella macrospora (Earle) Sutton, cuja incidência vem aumentando em várias regiões produtoras de milho no Brasil, causa podridões do colmo e da espiga, além de manchas foliares características da espécie. Atualmente, é detectado com alta frequência em sementes, fato atribuído ao aumento na ocorrência e na intensidade da doença nas lavouras (CASA et al., 2006).

O fungo *S. macrospora* é necrotrófico, apresentando fase parasitária na planta viva e fase saprofitica em restos culturais. Dessa maneira, o patógeno pode ser encontrado sobrevivendo fora do período de cultivo como micélio no interior das sementes e formando picnídios nos restos culturais sobre a superfície do solo (REIS; CASA, 1996). Portanto, sementes infectadas constituem potenciais disseminadores do patógeno em áreas de cultivo e em áreas onde o milho ainda não foi cultivado. Além disso, os grãos de milho infectados pelo fungo (grãos ardidos) são impróprios para o consumo e para a formulação de rações, por apresentarem a toxina diplodiol (CUTLER et al., 1980).

O processo de transmissão de *S. macrospora* da semente à planta ocorre via mesocótilo, alcançando a coroa, as raízes e, finalmente, a base do colmo; é um processo lento, podendo ser encontrado em diferentes fases da cultura, do início ao final (CASA et al., 1998). A associação do patógeno com sementes garante acesso direto do parasita à fonte nutricional, por ocasião da germinação das sementes e da emergência das plântulas. Devido a diversos fatores físicos e biológicos, além da posição do patógeno dentro da semente e sua intensidade, o padrão de transmissão via sementes torna-se bastante variável, mesmo em se tratando de um único patógeno (MACHADO, 1988; NEERGAARD, 1979).

A quantificação da taxa de transmissão de *S. macrospora* em milho ainda não foi realizada e, segundo Casa (1997), é tarefa difícil, pelo fato de esse fungo estar ligado a não germinação de sementes, a plantas assintomáticas e à presença de outros fungos associados à semente, que podem interferir nesta quantificação uma vez que não se dispõe de meio totalmente seletivo para o patógeno.

Neste trabalho, o objetivo foi conhecer e avaliar a taxa de transmissão de *S. macrospora* em sementes de milho, considerando-se a interferência de aspectos como potenciais de inóculo do patógeno, temperatura e genótipos, sob condições controladas de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Obtenção e multiplicação de isolados fúngicos e perfil das sementes utilizadas

Da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA, foram utilizados dois isolados de *S. macrospora*, CMLAPS375 e o CMLAPS10. Os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (20 g de ágar, 20 g de dextrose e 200 g de batata/litro) e acondicionados em câmara do tipo BOD, à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As sementes de milho tiveram seus perfis sanitários e fisiológicos determinados de acordo com as Regras para análise de sementes, (BRASIL, 2009a) e o Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009b). As

cultivares utilizadas, RB9308YG (cultivar suscetível a *S. macrospora* - C1) e RB9108 (cultivar moderadamente resistente a *S. macrospora* - C2), foram cedidas pela Empresa Riber Sementes, de Patos de Minas, MG.

Inoculação das sementes, teste de sanidade, avaliação da transmissão e confirmação da presença de *S. macrospora* por meio da técnica de Bio-PCR

Todos os procedimentos realizados neste trabalho seguiram as mesmas etapas e metodologias do artigo 2. O delineamento experimental e as análises estatísticas, também, foram realizados da mesma maneira descrita no artigo anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os lotes de sementes utilizados neste estudo não eram portadores de *Stenocarpella macrospora*, conforme revelado pelos testes de sanidade, ocorrendo, para a cultivar C1 (RB9308YG), a incidência de 28,5% de *Fusarium verticillioides* e 13% de *Penicillium* sp. e, para C2 (RB9108), a incidência de 25,5% e 11%, para os respectivos fungos observados em C1. A germinação dos referidos lotes foram de 98% de plântulas normais, para a C1 e de 96%, para a C2.

A análise de variância para morte em pré-emergência e taxas de transmissão de sementes para plantas revelou uma interação tripla não significativa ($p \leq 0,05$), quando as sementes foram inoculadas com os dois isolados do patógeno.

As plantas dos tratamentos controles não demonstraram qualquer incidência de *S. macrospora* nas avaliações das mesmas em placas de Petri com meio BDA. Portanto, as sementes destes tratamentos responderam apenas à

possível interferência do restritor hídrico manitol em sua qualidade fisiológica e estes resultados foram utilizados para a estimativa real da porcentagem de morte em pré-emergência. O mesmo é realizado em diferentes estudos da interação fungo-semente, para a subtração das ocasionais e consequentes interferências que, no presente estudo, foram mínimas (ARAÚJO et al., 2006; COSTA et al., 2003).

Os resultados obtidos da avaliação de morte em pré-emergência de sementes/plântulas de milho foram mais altos do que as das taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas (Figura 1). De acordo com Tanaka e Machado (1985), a quantidade de inóculo presente na semente influencia a germinação e a transmissão de patógenos. Estes, quando associados à semente, podem ser causadores de morte em pré e pós-emergência de plântulas, reduzindo, portanto, o estabelecimento do estande.

Os maiores percentuais de morte em pré-emergência foram alcançados nos potenciais de inóculo P3 e P4, para ambos os isolados, temperaturas e cultivares. Nos potenciais P3 e P4, para o isolado CMLAPS375, as taxas máximas foram de 61% e 73,5%, respectivamente, para C1, cultivar com características de suscetibilidade ao patógeno, em ambas as temperaturas de cultivo utilizadas no estudo. Já para o isolado CMLAPS10, o mesmo não foi observado, sendo o valor máximo para P3 de 74,5%, ocorrendo para as duas cultivares mantidas a 20 °C e, para P4, o percentual máximo de 82,5% para C1, nas duas temperaturas de cultivo.

Estes resultados referentes à morte em pré-emergência, para sementes/plântulas de milho infectadas por *S. macrospora*, refletiram a ocorrência da consequência mais recorrente da atuação deste patógeno, que é o comprometimento total da germinação das sementes de milho (CASA et al., 2006; PINTO, 2006). Em estudo com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodoeiro, Araújo et al. (2006) também

observaram que maiores tempos de condicionamento osmótico aliados à presença de fungo, proporcionaram redução progressiva na germinação das sementes. Outro trabalho que corrobora os resultados obtidos no presente estudo, apesar das particularidades de cada patossistema, foi de sementes de feijão inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, em que, quando o período de inoculação aumentou de 0 até 144 horas, observou-se uma redução proporcional na germinação de plântulas normais (COSTA et al., 2003).

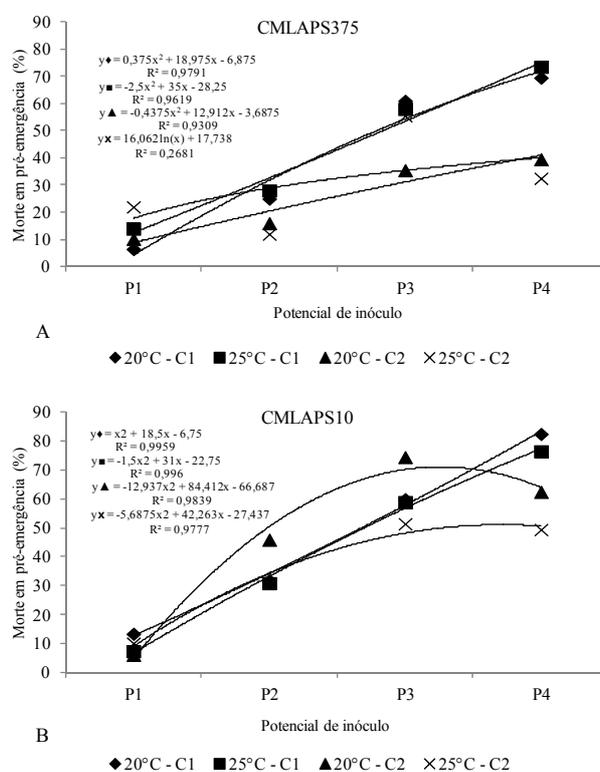


Figura 1. Avaliação de morte de sementes/plântulas em pré-emergência, causada pelo fungo *Stenocarpella macrospora*, em relação aos isolados CMLAPS375 (A) e CMLAPS10 (B) nos potenciais de inóculo P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h), nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108), mantidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.

S. macrospora é um patógeno que apresenta, mais comumente, sintomas no decorrer de estádios vegetativos mais avançados da planta, culminando em elevada incidência ao final do ciclo da cultura, o que pode estar diretamente relacionado com as baixas taxas de transmissão de plantas sintomáticas observadas neste estudo (Figura 2). As lesões encontradas nas plantas foram iguais às descritas na literatura nas fases iniciais da sintomatologia de manchas foliares, em que se verificaram lesões na forma de tecido clorótico, seguidas de necrose. As lesões tiveram formato irregular, medindo normalmente de 1 a 3 cm de comprimento, de cor parda e, algumas vezes, apresentando anéis concêntricos mais escuros a partir do ponto inicial de infecção. Além disso, essas primeiras lesões também puderam ser visualizadas na forma de pequenas estrias amareladas ou pardas que, mais tarde, aumentaram de tamanho estendendo-se no sentido longitudinal da folha, podendo dilacerar o tecido vegetal infectado (CASA et al., 2006).

As taxas de transmissão de plantas sintomáticas foram maiores nos potenciais P1 e P2, para ambos os isolados, observando-se que P1 tinha o maior estande de plantas, e que o P4 tinha o menor estande de plantas, comparado aos outros potenciais, tendo sido verificada, neste potencial, a menor ocorrência de sintomatologia nas plantas do experimento. Para o isolado CMLAPS375, os potenciais P1 e P2 ocasionaram taxas de transmissão máximas de plantas sintomáticas de 6,8% e 7,1%, respectivamente e, para CMLAPS10, de 7,4% (P2 e P3). Ambos os resultados ocorreram em C1 cultivada a 20 °C, o que indica que, sob condições menos favoráveis de temperatura, o patógeno pode ter encontrado condições mais favoráveis para a sua atuação nos tecidos parasitados. A temperatura de 25 °C é apontada, na literatura, como uma das mais favoráveis para o desenvolvimento de *S. macrospora* (CASA et al., 2007).

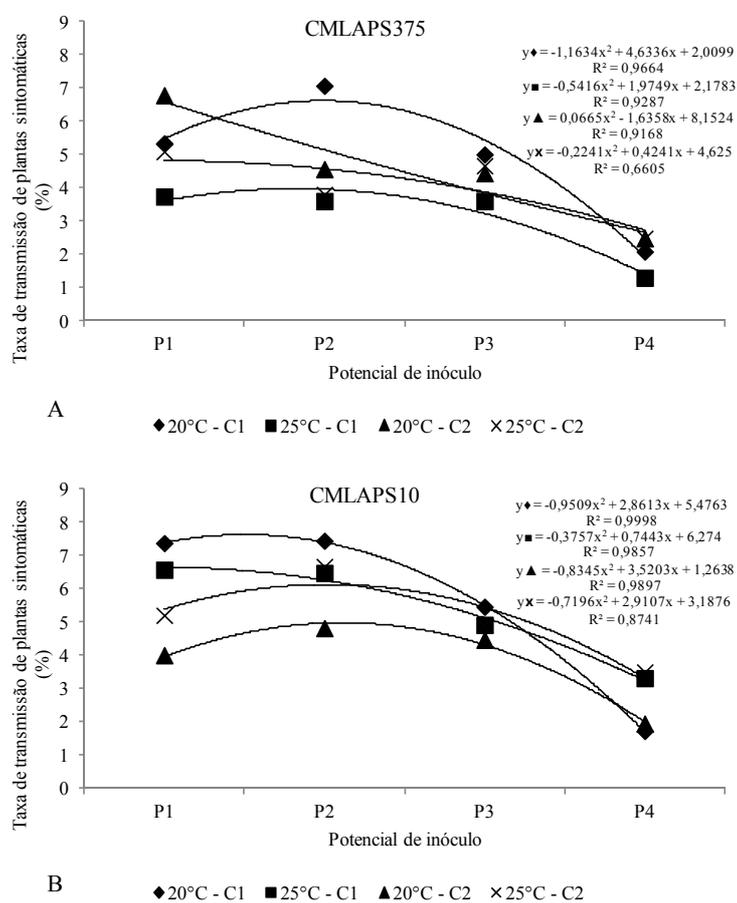


Figura 2. Taxas de transmissão de *Stenocarpella macrospora* em plantas com sintomáticas para os dois isolados (CMLAPS375-A e CMLAPS10-B), nos potenciais P1, P2, P3 e P4 (24h, 48h, 72h e 96h), cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108), nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.

Quando comparadas com as taxas de transmissão de plantas assintomáticas, as taxas referentes a plantas sintomáticas foram maiores, mas estas, geralmente, ocorreram nos potenciais P1 e P2, enquanto para as assintomáticas, as maiores taxas ocorreram em P1, sendo estes resultados para a cultivar C1 mantida na temperatura de 20 °C.

Nas plantas assintomáticas (Figura 3 A e B), representadas pelas partes amostradas, colo e última inserção de folhas, houve poucos resultados positivos para a incidência do fungo e isso refletiu nas baixas taxas de transmissão observadas nos tratamentos. Os maiores percentuais ocorreram no potencial de inóculo P1, em que foram observados, 6,9% para C1 na temperatura de 20 °C, com o isolado CMLAPS10, sendo este o isolado com a maioria dos resultados positivos para a infecção latente de *S. macrospora* nas plantas analisadas.

Estes resultados apresentados foram compilados com a adição dos resultados positivos obtidos também com a utilização da técnica de Bio-PCR, que possibilitou detectar *S. macrospora* em quase todos os tratamentos avaliados com plantas assintomáticas (Figura 4). A maior porcentagem de resultados positivos detectados para o patógeno ocorreu para o isolado CMLAPS375, verificando-se 8,21% de incidência nas plantas analisadas de C2 mantidas a 20 °C. No entanto, para o isolado CMLAPS10, a incidência máxima foi de 7,78%, nas mesmas condições de cultivar e temperatura de CMLAPS375. Resultados positivos em PCR, para a presença de fungos em plantas assintomáticas, devem ser analisados com cautela porque este patógeno pode já estar inviável para se desenvolver.

Em relação às partes das plantas assintomáticas avaliadas (Figura 3 – C e D), colo (C) e região da última inserção de folhas (IF), foi possível observar uma maior ocorrência do fungo na região do colo, para ambos os isolados, chegando ao máximo de 10,04% de incidência de CMLAPS10, no potencial P3 e 9,59% de CMLAPS375, no P1. Quanto à incidência na última inserção de folhas, o percentual máximo alcançado foi de 8,13%, para o isolado CMLAPS375, no P2.

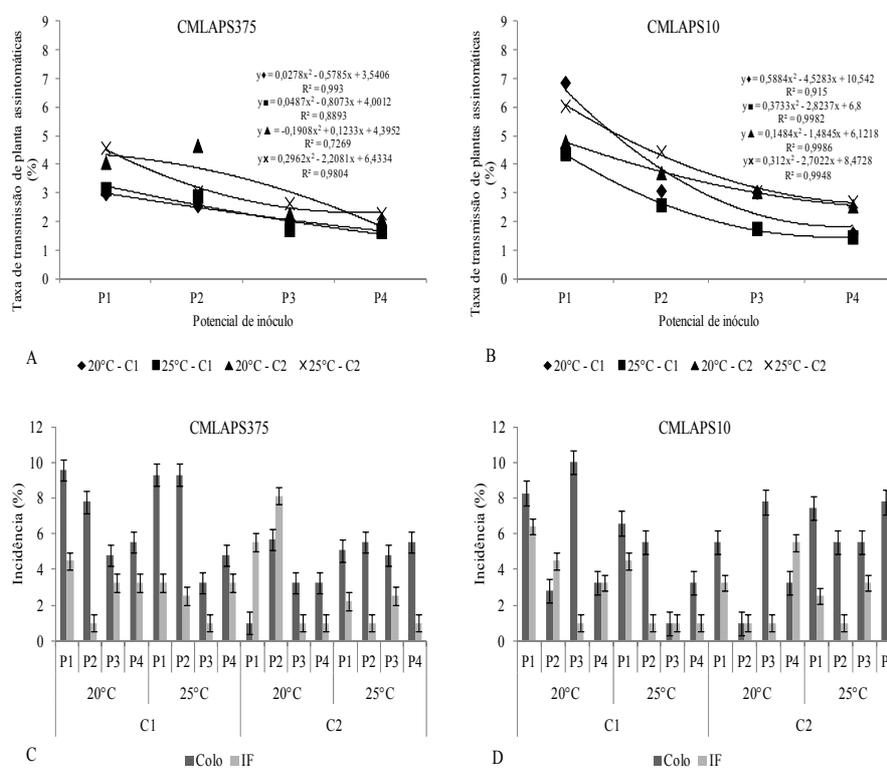
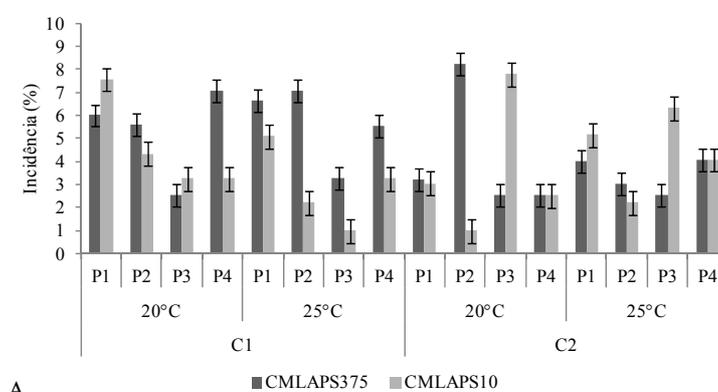


Figura 3. A e B - Taxa de transmissão de *Stenocarpella macrospora* em plantas assintomáticas. C e D - Incidência de *S. macrospora* nas partes das plantas seccionadas: colo (C) e a última inserção de folhas (IF). C- isolado CMLAPS375 e D- isolado CMLAPS10, nos potenciais de inóculo P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h), nas duas cultivares (C1-RB9308YG e C2-RB9108) e duas temperaturas de cultivo (20 °C e 25 °C).

Quando observado que as plantas assintomáticas tiveram uma maior incidência do patógeno na região do colo, o resultado pode estar relacionado com a permanência deste fungo nesta parte da planta, esperando pela ocorrência de condições adequadas para se desenvolver, coincidindo com o que ocorre no campo, onde a podridão da base do colmo de plantas de milho pode ter origem com a infecção nos órgãos próximos ou abaixo do nível do solo, a partir do inóculo presente nas sementes, ocasionando o tombamento das plantas. No

entanto, considera-se que a infecção da espiga ocorre a partir de esporos disseminados pelo vento que, ao germinarem na presença de água sobre o tecido do hospedeiro, emitem o tubo germinativo, penetrando diretamente a palha da espiga (CASA et al., 2006; REIS et al., 2004). A partir das taxas de transmissão obtidas neste estudo, pode-se concluir que as plantas assintomáticas, certamente, serão capazes de transmitir o patógeno da planta-mãe até as sementes na espiga.



A

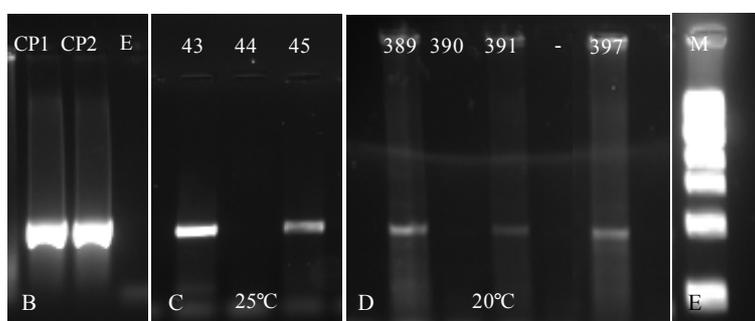


Figura 4. A- Detecção dos isolados CMLAPS375 e CMLAPS10 de *Stenocarpella macrospora*, nos potenciais de inóculo P1-24h, P2-48h, P3-72h e P4-96h, por meio da técnica de Bio-PCR realizada em secções de plantas assintomáticas das cultivares C1-RB9308YG e C2-RB9108 desenvolvidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C. B- controle positivo da Bio-PCR (CP1 e CP2) e água (E). C- alguns resultados positivos de amostras de plantas mantidas a 25 °C (43, 44, 45). D- resultados positivos de amostras de plantas mantidas a 20 °C (389, 390 e 397). E- marcador.

Para *S. macrospora*, observaram-se taxas de transmissão total (Figura 5), da semente para planta, em todos os potenciais de inóculo, sendo estes crescentes do menor para o maior potencial, ou seja, os maiores percentuais foram alcançados em P3 e P4, para ambos os isolados, temperaturas e cultivares. No potencial de inóculo mais elevado, P4, ocorreram as porcentagens máximas, para CMLAPS375 e CMLAPS10, de 76,4% e 85,8%, respectivamente, sendo ambos para C1 (RB9308YG), nas duas temperaturas de cultivo. Para esta cultivar, foram observadas altas taxas de transmissão total em todos os tratamentos, confirmando a suscetibilidade deste genótipo. Levando em consideração a menor taxa de transmissão total deste patógeno, 15%, que ocorreu com o isolado CMLAPS10, no potencial P1 e cultivar C2 (RB9108), na temperatura de 20 °C, observa-se que, mesmo em condições menos favoráveis para o patógeno, esta interação deve ser considerada de grande significado do ponto de vista epidemiológico. Por sua vez, os valores de taxas de transmissão total para P2 e P3 foram em torno de 50%, para ambos os isolados, temperaturas e cultivares.

As taxas de transmissão totais obtidas foram diretamente proporcionais e progressivas aos potenciais de inóculo, ou seja, quanto maior o tempo permitido na permanência da semente em contato com *S. macrospora*, maior foi a infecção dos tecidos das sementes e, conseqüentemente, maior a transmissão do patógeno para as plantas a partir da semente. O mesmo foi observado por Botelho (2011), em trabalho com *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja, em que houve um aumento tanto da taxa de infecção quanto da taxa de transmissão, quando o potencial de inóculo, obtido pelo tempo de inoculação, aumentou de 0 para 72 horas de contato das sementes com o patógeno, em duas cultivares avaliadas no estudo. Barocas (2008) também verificou esta proporcionalidade em decorrência dos aumentos dos potenciais de inóculo em sementes de algodão inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Entretanto, em

outro estudo com sementes de milho, mas associadas ao fungo *Acremonium strictum*, Teixeira e Machado (2003) observaram que a taxa de infecção, avaliada na parte aérea de plantas com 28 dias de idade, foi maior com o aumento do tempo de exposição das sementes (de 0 a 120 horas), mas a taxa de transmissão foi estatisticamente igual nos tempos de 24, 72 e 120 horas, diferindo apenas no tempo zero hora.

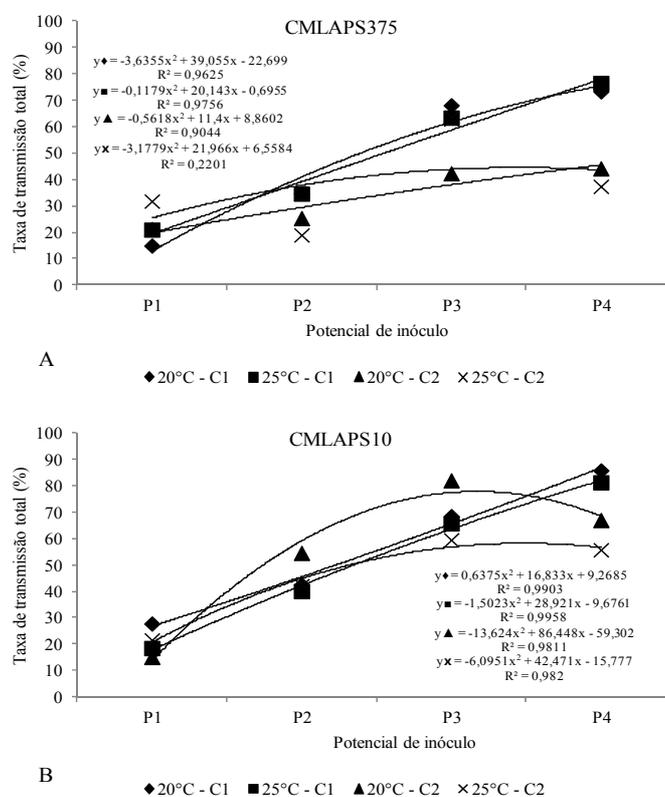


Figura 5. Taxa de transmissão total de *Stenocarpella macrospora*, observando-se os resultados de sementes/plântulas com morte em pré-emergência, plantas sintomáticas e assintomáticas. A - isolado CMLAPS375 e B - isolado CMLAPS10, nos potenciais de inóculo P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h), nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108), mantidas nas temperaturas de 20 °C e 25 °C.

S. macrospora, a partir do momento que entra em contato e inicia o processo de infecção de sementes de milho, pode, como uma das consequências, provocar altas taxas de transmissão, conforme observado neste estudo, o que pode conduzir à morte da semente/plântula ou gerar plantas sintomáticas ou assintomáticas, tornando, assim, esta associação indesejável. Isto reforça a importância do uso de sementes íntegras e livres desse tipo de infecção, dando suporte para que programas de certificação, pelos quais se estabelecem padrões sanitários para esse tipo de patógeno, sejam implementados no país.

CONCLUSÕES

A transmissão total de *S. macrospora* a partir de sementes de milho para plantas pode atingir taxas elevadas, máximo de 85,8%, variando em função de fatores como potencial de inóculo, temperaturas e outros que condicionam esse tipo de interação.

A transmissão de *S. macrospora* pelas sementes de milho pode ocorrer de maneira assintomática, atingindo, em determinadas circunstâncias, a taxa de 6,9%.

As mortes em pré-emergência, taxas de transmissão de plantas sintomáticas e assintomáticas e de transmissão total são diretamente proporcionais aos potenciais de inóculo de *S. macrospora* em sementes de milho.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A. O.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 035-040, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.

BARROCAS, E. N. Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas. 110p. Lavras, Minas Gerais, 2008 (Tese de Doutorado em Fitopatologia- UFLA).

BOTELHO, L. S. Relações de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de soja: detecção e transmissibilidade de patógeno. 187p. Lavras, Minas Gerais, 2011 (Tese de Doutorado em Fitopatologia- UFLA).

CASA, R.T. *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* associados à semente de milho. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, MG. 1997. 71p.

CASA, R.T., ZAMBOLIM, L.; REIS, E.M. Transmissão e controle de *Diplodia* em sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.436-441, 1998.

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, set./out. 2006.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L.; MOREIRA, E. N. Efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 137-142, 2007.

COSTA, M.L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R.M; POZZA, E.A; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27,n.5,p.1023-1030, set/out. 2003.

CUTLER, H. G.; CRUMLEY, F. G.; COX, R. H.; COLE, R. J.; DORNER, J. W.; LATTERELL, F. M.; ROSSI, A. E. Diplodiol : a new toxin from *Diplodia macrospora*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 1, p 135-138, Jan. 1980.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

MACHADO, J.C. **Patologia de Sementes- fundamentos e aplicações**. Brasília, MEC/ESAL/FAEPE. 106 p. 1988.

MACHADO, J. C.; CARVALHO, J. C. B.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: International seed testing congress-seed symposium, 26., 2001, Angers. **Proceedings...** Angers: ISTA, p. 62. 2001.

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

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan. 1995.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. v. 1. London. The MacMillan Press, 1979.

PINTO, N. F. J de A. **Podridão branca da espiga do milho**. Boletim Técnico Comunicado Técnico, Sete lagoas, n.141, p. 1-6, dez. 2006.

REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80p.

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

TANAKA, M.A.S. & MACHADO, J.C. **Patologia de sementes**. Informe Agropecuário 11:40-46. 1985.

TEIXEIRA, H; MACHADO, J.C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.5, p.1045-1052, set/out 2003.

XIA, Z.; ACHAR, N. Random amplified polymorphic DNA and polymerase chain reaction markers for the differentiation and detection of *Stenocarpella maydis* in maize seeds. **Journal Phytopathology**, v. 149, n. 1, p. 35-44, 2001.

ARTIGO 3

**EFEITOS DE *Stenocarpella maydis* E *Stenocarpella macrospora* EM
SEMENTES DE MILHO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

*EFFECTS OF Stenocarpella maydis AND Stenocarpella macrospora IN MAIZE
SEEDS UNDER CONTROLLED CONDITIONS*

Preparado em acordo com Bioscience Journal (versão preliminar)

**Carolina da Silva SIQUEIRA¹; Ellen Noly BARROCAS²; José da Cruz
MACHADO³; Ursula Abreu da SILVA⁴; Iara Eleutéria DIAS⁵**

1. Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, kerolpet@gmail.com; 2. Pós-doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, Bolsista CAPES; 3. Professor Doutor Titular do Departamento de Fitopatologia - UFLA, Bolsista CNPq, machado@dfp.ufla.br; 4. Mestre em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil; 5. Doutoranda em Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, Bolsista CAPES.

RESUMO

As doenças causadas por *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em milho, têm, como um dos danos mais importantes, o efeito negativo sobre a germinação de sementes, podendo provocar a morte do embrião ou comprometer o vigor das plantas emergidas. A associação dos referidos patógenos com sementes de milho tem sido considerada como um dos principais meios de disseminação e introdução desses organismos em novas áreas de cultivo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos causados por *S. maydis* e *S. macrospora* sobre a qualidade das sementes de milho e no desenvolvimento de plantas provenientes destas. Para avaliar tais efeitos, sementes de milho de duas cultivares (C1-RB9308YG e C2-RB9108) foram inoculadas pelo método de condicionamento osmótico, pelo qual as sementes foram expostas diretamente aos patógenos por diferentes períodos de tempo, que correspondem aos potenciais de inóculo: P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h). Sementes inoculadas foram avaliadas em laboratório pelos testes de germinação e de frio, teste de sanidade e de condutividade elétrica. Pelo teste de crescimento em substrato, foram consideradas as variáveis: Índice de Velocidade de Emergência (IVE), estande inicial e final, peso da matéria fresca e seca e altura de plantas. O cultivo foi realizado em câmara de crescimento vegetal, sob duas temperaturas, 20 °C e 25 °C e avaliadas durante e ao final de 28 dias. Foi observado que, quanto maior o tempo de exposição das sementes aos fungos, maiores foram os efeitos negativos destes organismos nas plantas provenientes destas sementes. Nas plantas oriundas de sementes inoculadas por 96 horas verificaram-se valores mais baixos de vigor (IVE), estandes, pesos e alturas. A cultivar C1 e a temperatura de 25 °C ofereceram as condições mais favoráveis para o desenvolvimento dos patógenos e seus consequentes efeitos. Quanto às sementes inoculadas, observou-se um decréscimo da sua qualidade fisiológica, proporcional ao aumento dos potenciais de inóculo, tanto no teste de germinação padrão como no teste de frio e de condutividade elétrica. Em condições semelhantes de colonização das sementes, os efeitos causados por *S. maydis* foram mais severos do que os danos provocados por *S. macrospora*.

PALAVRAS-CHAVE: Patologia de sementes. Qualidade fisiológica de sementes. Podridão do colmo e da espiga. Fungo.

ABSTRACT

The diseases caused by *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* in maize have, as one of the most important damage, reduction of seed germination and addition to the cause of death of the embryo which represent risk for emerged plants. The association of those pathogens with maize seeds has been regarded as a major means of dissemination and introduction of those organisms into new areas of maize cultivation. The objective in this study was to evaluate the effects caused by *S. maydis* and *S. macrospora* on the quality of maize seed and developing emerged plants. To evaluate such effects, seeds of two cultivars of maize (C1-RB9308YG and C2-RB9108) were inoculated using the osmotic conditioning method, by which the seeds were directly exposed to pathogens for different periods of time, which correspond to inoculum potentials, P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) and P4 (96h). Inoculated seeds were evaluated in the laboratory for both germination and cold tests, health test and electrical conductivity. For the growth in the soil substrate test, the following variables were considered: Emergency Speed Index (ESI), initial and final stands, fresh and dry weight and plant height. The cultivation were performed in growth chambers under two temperatures, 20 °C and 25 °C and evaluation done during 28 days. It was observed that the longer the duration of exposure of seeds to fungi, the higher were the repression effects of those organisms in plants from those seeds. In plants from seeds inoculated for 96 hours there were lower levels of vigor (IVE), stands, weights and heights. The cultivar C1 at 25 °C provided the most favorable conditions for the development of the pathogens and their consequent effects. In the seeds inoculated, there was a decrease of the physiological quality, proportional to the increase of inoculum potentials, as demonstrated by the standard germination, cold and electrical conductivity tests. Under similar conditions for colonization of the seeds, the effects caused by *S. maydis* were more severe than the damage caused by *S. macrospora*.

KEYWORDS: Seed pathology. Seed quality. Ear and stalk rot. Fungus.

INTRODUÇÃO

Culturas de grande importância econômica, como o milho, atingem altas produções por meio da otimização dos fatores de produção, como fertilidade do solo, disponibilidade hídrica, controle da erosão, época de semeadura, cultivar, população de plantas, rotação de culturas e manejo de pragas e doenças, dentre outros (REIS et al., 2004).

As doenças causadas pelos fungos, *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton, podem matar o embrião das sementes de milho e comprometer a germinação e o vigor das plantas emergidas. Além disso, podem ocasionar podridões no colmo e nas espigas e manchas foliares. A podridão do colmo interfere no desenvolvimento normal da planta, afetando suas funções, ocasionando quebra da base do colmo, acamamento e, conseqüentemente, morte prematura da planta. A podridão das espigas pode causar redução na produtividade e na qualidade dos grãos colhidos. Sabe-se também que estes fungos são produtores de toxinas, o que afeta o valor econômico e nutricional do produto (CASA et al., 2006; PINTO, 2005; TRENTO et al., 2002).

A utilização de sementes de milho infectadas pode causar a introdução de *S. maydis* e *S. macrospora* em novas áreas de cultivo constituindo importantes fontes de inóculo primário, além de ser um dos principais veículos de disseminação destes patógenos, mesmo distante de seu local de produção (CASA et al., 2006; REIS et al., 2004). Devido aos impactos que podem causar tais patógenos quando estão em associação com sementes, é importante salientar que *S. maydis* foi enquadrado como uma das pragas não quarentenárias regulamentadas (PNQRs) no Brasil, sendo proposto, provisoriamente, o nível de tolerância de 2%, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para todas as classes de sementes certificadas (Portaria nº 47, de 19 de

fevereiro de 2009). Já o fungo *S. macrospora* ainda não foi enquadrado neste programa de certificação.

Em razão da grande importância da associação desses patógenos com sementes, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos causados pelas espécies *S. maydis* e *S. macrospora*, no desempenho de sementes e na fase inicial de cultivo de milho, partindo de diferentes potenciais de inóculo dos patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS) do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas (LPPA) do Departamento de Engenharia, ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Todos os testes e avaliações seguiram metodologias padronizadas, sendo os experimentos com *S. maydis* e *S. macrospora* realizados separadamente.

Origem e multiplicação dos isolados de *Stenocarpella* spp. e perfil das sementes utilizadas

Foram selecionados dois isolados de cada espécie de *Stenocarpella*, sendo os isolados de *S. maydis*, CML698 e MY2, obtidos da Coleção Micológica de Lavras da UFLA e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária em Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG), respectivamente. Os isolados de *S. macrospora*, CMLAPS375 e CMLAPS10, foram obtidos da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA. Todos os isolados foram inicialmente cultivados em meio de cultura BDA (20 g de ágar,

20 g de dextrose e 200 g de batata/litro) em placas de Petri e mantidos em câmara do tipo BOD à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As sementes de milho utilizadas foram obtidas da Empresa Riber Sementes (Patos de Minas, MG), sendo a cultivar RB9308YG caracterizada como suscetível (C1) e a RB9108, como moderadamente resistente (C2) às espécies citadas de *Stenocarpella*. As sementes tiveram seus perfis sanitários e fisiológicos avaliados de acordo com Brasil (2009a, 2009b).

Inoculação das sementes

Para a obtenção de sementes de milho com diferentes potenciais de inóculo de ambos os fungos, foi utilizada a metodologia de condicionamento osmótico descrita na literatura para esta finalidade (MACHADO et al., 2001). O procedimento constou de desinfestação inicial das sementes por meio de hipoclorito de sódio 1%, por 1 minuto, seguida de lavagem rápida em água autoclavada e seca em ambiente de laboratório. Colônias dos fungos com 5 dias de idade foram obtidas em meio de cultura BDA, em placas de Petri, acrescido do soluto manitol, com potencial hídrico ajustado a -1,4 MPa (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). Sobre as colônias fúngicas foram distribuídas as sementes em camadas simples e as placas mantidas em câmaras do tipo BOD, com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Depois dos períodos de incubação, 24, 48, 72 e 96 horas, que corresponderam aos potenciais de inóculo P1, P2, P3 e P4, as sementes foram retiradas das placas e secas, para as avaliações pelos testes selecionados neste estudo. Para avaliação do efeito do restritor hídrico, sementes de ambas as cultivares foram depositadas em placas de Petri contendo apenas o meio BDA somado ao manitol, pelos mesmos tempos já citados. Todas as sementes foram secas, em temperatura ambiente, por 48 horas.

Avaliação dos efeitos de *S. maydis* e *S. macrospora* na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho inoculadas

Teste de germinação em rolo de papel. O teste de germinação foi conduzido com 200 sementes (quatro repetições de 50 sementes) distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com água destilada 2,5 vezes o peso do papel seco e colocadas em germinador regulado à temperatura de 25 ± 2 °C. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a semeadura, conforme os critérios estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009a). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Teste de frio (TF). Seguindo metodologia de Miguel et al. (2001), cada tratamento foi distribuído em quatro repetições de 50 sementes, sobre duas folhas de papel germitest e cobertas com uma fina camada de terra, (aproximadamente 1 cm) proveniente de área cultivada com milho; a seguir, o conjunto foi coberto com uma terceira folha e enrolado. As folhas de papel germitest foram previamente umedecidas com quantidade de água equivalente a três vezes o seu peso seco. Os rolos foram colocados em caixas plásticas vedadas e mantidos, durante cinco dias, a 10 °C. Decorrido o período, os rolos foram transferidos para germinador, a 25 ± 2 °C, por três dias e, em seguida, efetuaram-se as contagens de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

Teste de sanidade. As sementes de milho inoculadas foram distribuídas sobre substrato de papel embebido em meio OA (20 g de ágar e 30 g de farinha de aveia/L), meio favorecedor da formação de picnídios de ambas as espécies

(SILVA; JULIATTI, 2005), em placas de Petri com 15 cm de diâmetro, sendo, 8 repetições de 25 sementes por placa. Em seguida, as sementes foram colocadas em freezer, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas e posteriormente incubadas, por 7-15 dias, em câmara de crescimento, à temperatura de $20\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Ao final desse período, as sementes foram examinadas individualmente ao microscópio estereoscópico, verificando-se a incidência dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*.

Teste de condutividade elétrica (CE). Cada repetição, composta de 50 sementes, 200 sementes/tratamento, foi pesada em balança de precisão (0,0001 g), depositada em copo plástico (capacidade de 200 ml) contendo 75 ml de água deionizada e acondicionada em câmara do tipo BOD, à temperatura de $25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após esse período, efetuou-se a leitura da condutividade elétrica da solução de cada tratamento, utilizando-se condutivímetro DIGIMED, modelo DM-21, previamente calibrado com solução de KCl. O resultado obtido foi dividido pelo peso de cada tratamento e o resultado final foi expresso em $\mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, conforme descrito por Krzyzanowski et al. (1999).

Delineamento experimental. Para os testes de germinação, de frio, de sanidade e condutividade elétrica, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial triplo $2 \times 2 \times 4$ (2 isolados, 2 cultivares e 4 potenciais de inóculo). As espécies de *Stenocarpella* foram analisadas separadamente.

Testes de emergência em substrato sob condições controladas

Avaliação do Índice de Velocidade de Emergência (IVE). Cem sementes de cada cultivar de milho (C1 e C2) e para cada isolado das espécies de *Stenocarpella*

foram distribuídas, individualmente, em copos plásticos de 200 ml, contendo substrato comercial (Multiplanta trop sc 25kg), dispostos em número de 25 por bandeja, cada bandeja correspondendo a uma repetição. O experimento foi conduzido em duas câmaras com temperaturas ajustadas em 20 ± 2 °C e 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK T10 40W 6500K FL40T10-6 60Hz)/12 horas escuro. Foram realizadas contagens diárias da emergência das plantas a partir da primeira emergência de plântulas até a estabilização do estande, por três dias consecutivos. Foi considerada a emissão das folhas primárias, como critério adotado, para planta de milho emergida. As plantas permaneceram em câmara de crescimento até 28 dias após a semeadura (d.a.s.). O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962).

Avaliação de estande inicial e estande final. Ambos os estandes foram registrados aos 5 e aos 28 dias após a semeadura, sendo o valor absoluto transformado em porcentagem.

Avaliação da altura de plantas. Foi medida a parte aérea de 10 plantas por repetição de cada tratamento aos 28 d.a.s.

Avaliação de matéria fresca e matéria seca. Plantas emergidas aos 28 dias foram cortadas na região do colo e todas as plantas de uma mesma repetição foram pesadas e seguidamente levadas à estufa de circulação de ar, regulada previamente a 70 °C, onde permaneceram por 7 dias e, depois, pesadas novamente. Os resultados foram expressos em g/planta.

Delineamento experimental. O delineamento experimental dos testes IVE, estande inicial e final, altura, peso da matéria fresca e seca, de plantas foi em

blocos ao acaso (DBC), em esquema fatorial triplo 2 x 2 x 4 (2 temperaturas, 2 cultivares e 4 potenciais de inóculo), com quatro repetições por tratamento. Cada isolado de *S. maydis* e *S. macrospora* foi avaliado separadamente.

Análises estatísticas dos dados

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar[®] versão 5.3 (FERREIRA, 2011). As análises de variância para IVE, estande inicial e final, altura, peso de matéria fresca e seca, foram realizadas individualmente para cada isolado de *S. maydis* e *S. macrospora*, além do controle (não inoculado), no esquema fatorial triplo. Para teste de germinação, teste de frio, teste de sanidade e condutividade elétrica, as análises de variância foram realizadas também no esquema fatorial triplo, citado no delineamento. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ou teste t de Student ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes utilizadas neste trabalho não eram portadoras de *S. maydis* e *S. macrospora*, conforme análises sanitárias dos lotes correspondentes, tendo sido observadas incidências médias de 26,5% de *Fusarium verticillioides* e de 12% de *Penicillium* sp., nas duas cultivares utilizadas. Os percentuais para plântulas normais nos testes de germinação foram de 98%, para a C1 (RB9308YG) e 96%, para a C2 (RB9108).

As análises de variância para ambas as espécies, para teste de germinação, teste frio, teste de sanidade e condutividade elétrica das sementes inoculadas, revelaram uma interação tripla não significativa ($p \leq 0,05$). Para IVE, estande inicial e final, altura e peso da matéria fresca e seca para plantas, quando

as sementes foram inoculadas com os dois isolados de *S. maydis* e *S. macrospora*, as análises de variância revelaram interação tripla não significativa ($p \leq 0,05$).

Nos tratamentos controle não foi observada a presença das espécies de *Stenocarpella* em nenhum dos testes realizados neste trabalho. Também não ocorreram interferências/efeitos relevantes do restritor hídrico manitol no desempenho das sementes.

Efeitos de *S. maydis* e *S. macrospora* na qualidade fisiológica de sementes de milho

A presença de *S. maydis* e *S. macrospora* nas sementes de milho, em diferentes potenciais de inóculo, provocou efeitos negativos na germinação com variações entre os isolados e as cultivares utilizados.

Os efeitos de ambas as espécies na germinação em laboratório foram significativos tanto em condições favoráveis como em temperaturas mais baixas (teste de frio), havendo uma proporcionalidade na redução da germinação em relação aos potenciais de inóculo encontrados nas sementes de milho (Figuras 1 e 2).

Entre as duas espécies estudadas de *Stenocarpella*, de acordo com as mortes de sementes/plântulas ocorridas no teste de germinação, observou-se que o efeito de *S. maydis* foi mais drástico do que de *S. macrospora*. *S. maydis* é encontrada com maior frequência em associação com sementes e grãos de milho, em análises de rotina em laboratórios pelo Brasil, sendo esta espécie uma das causas de mortes de sementes/plântulas e constituindo um dos componentes importantes de “grãos ardidos”, cujo dano principal é a produção de toxinas, prejudiciais ao consumo animal. Pelos resultados obtidos, fica clara também a importância de *S. macrospora* em associação com sementes de milho, sendo esta

espécie responsável por reduções do potencial germinativo e do vigor das sementes, com efeitos crescentes e proporcionais aos valores de potencial de inóculo inicial nas sementes (CASA et al., 2006). De acordo com dados encontrados na literatura, tanto *S. maydis* quanto *S. macrospora* podem causar redução da germinação e do vigor das mesmas (CASA et al., 2006; PINTO, 2005).

Em relação aos resultados de plântulas normais observadas nos ensaios, observou-se que houve variação entre os isolados e as cultivares analisados para *S. maydis*. No isolado CML698 verificou-se uma ação mais agressiva, resultando em um número maior de mortes para C1, cultivar considerada suscetível aos patógenos, conforme visto nos resultados obtidos. Os valores mais elevados de plântulas normais, nos testes de germinação e de frio, para a cultivar C1 inoculada com o isolado CML698, foram de 48% e 59,5%, respectivamente, ambos no potencial de inóculo P1, ocorrendo apenas de 1% a 4% nos potenciais de inóculo mais elevados, como foi o caso de P4. Em relação ao isolado MY2, os valores máximos para a cultivar C1 foram de 61% a 67%, no potencial de inóculo P1 e mínimos de 0,5% a 2%, para C1, no potencial mais elevado P4. Para *S. macrospora*, os isolados não variaram muito entre si, tendo sido verificados para o isolado CMLAPS375, percentuais de 95% e 93,5% de plântulas normais, no teste de germinação e de frio, respectivamente, com a cultivar C1 no potencial P1, e de 26 % a 29,5%, com a mesma cultivar, no P4. Em relação ao isolado CMLAPS10, foram observados de 89% a 97%, para C1, no potencial P1 e 25,5%, para C1, no P4. Entretanto, apesar de esses resultados, pelos testes de germinação e de frio terem sido similares, segundo Garcia et al. (2008), o teste frio é mais eficiente para a detecção de diferenças de vigor em sementes de milho porque, muitas vezes, ocorre uma superestimação apenas com o teste de germinação. Além disso, foi possível constatar que houve um desenvolvimento mais rápido dos fungos nas temperaturas mais favoráveis

proporcionadas pelo teste de germinação, tanto para a semente como para os patógenos, do que nas temperaturas baixas do teste de frio.

Em todos os ensaios dos testes de germinação e de frio, a partir de P2 já se verificou um relativo comprometimento do vigor das sementes inoculadas, havendo, nos potenciais P3 e P4, um maior percentual de mortes de sementes/plântulas. O mesmo ocorreu em outros patossistemas já estudados, como *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja (BOTELHO, 2011) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão (BARROCAS, 2008), nos quais ocorreram reduções significativas na qualidade fisiológica das sementes, com o aumento do potencial de inóculo dos respectivos patógenos. Em outro estudo, também com *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão, verificou-se, por meio da germinação, a influência negativa dos potenciais de inóculo, tendo, nos tempos de exposição de 36, 72 e 108 horas, sido observadas germinações de 61%, 56% e 46%, respectivamente (CELANO, 2004). Também, com a presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro, a porcentagem de germinação foi inversamente proporcional à colonização do patógeno (COSTA et al., 2003).

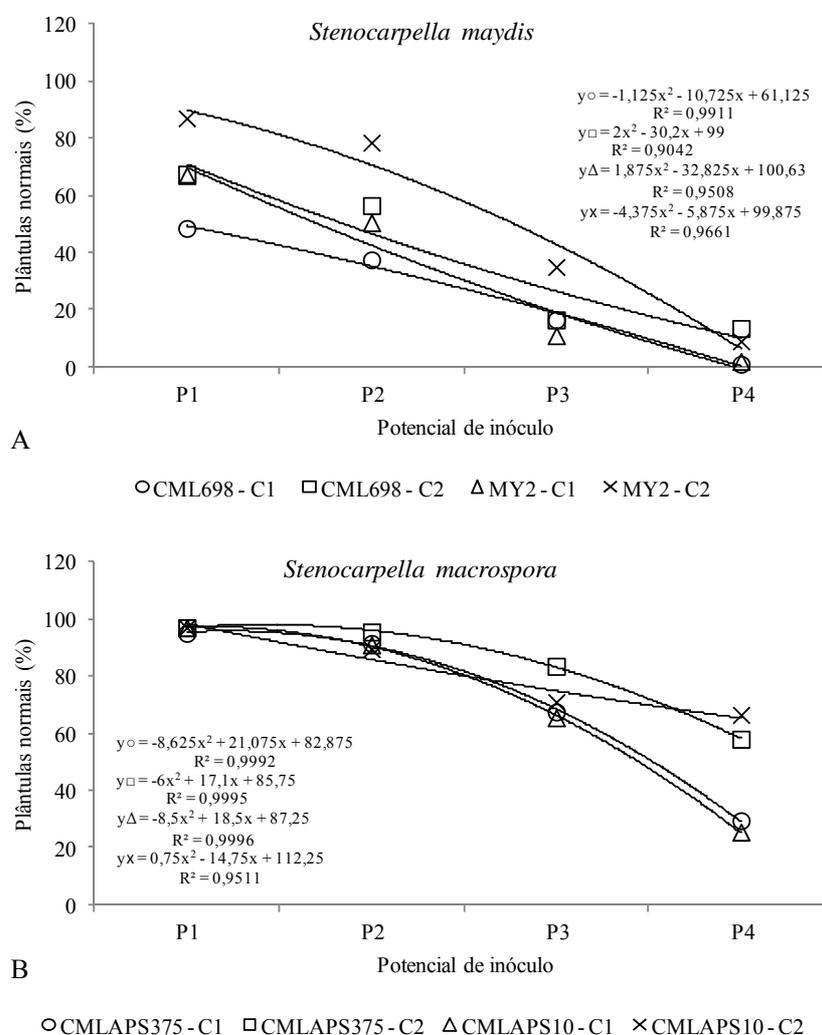


Figura 1. Valores percentuais de germinação de sementes de milho inoculadas com isolados de *Stenocarpella maydis* - CML698 e MY2 (A) e de *Stenocarpella macrospora* - CMLAPS375 e CMLAPS10 (B), em diferentes potenciais de inóculo, P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h), P4 (96h), nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108).

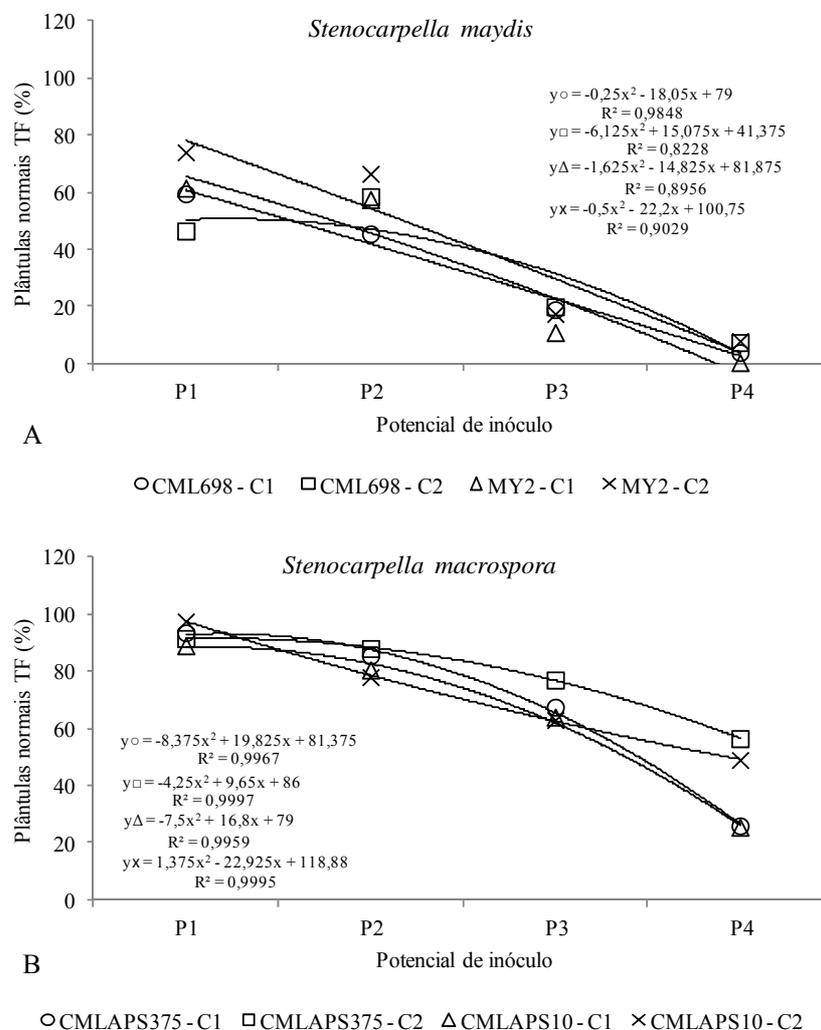


Figura 2. Valores percentuais de plântulas normais obtidos pelo teste de frio para sementes das cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108) inoculadas com isolados de *Stenocarpella maydis* - CML698 e MY2 (A) e de *Stenocarpella macrospora* - CMLAPS375 e CMLAPS10 (B) nos potenciais de inóculo, P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h), P4 (96h).

Pelos testes de sanidade, a incidência das espécies de *Stenocarpella* aumentou proporcionalmente de acordo com o aumento dos potenciais de inóculo dos patógenos nas sementes (Figura 3). Essa correlação ficou evidente nos resultados para *S. maydis*, entre os valores mínimos de incidência obtidos e os seus respectivos potenciais de inóculo, tanto para o isolado CML698 como para o MY2. Para o CML698 ocorreram as médias de incidências mínimas de 57,5%, para P1; 60% para P2; 71,5%, para P3 e 73,5%, para P4; e para MY2, de 55,5%, 68,5%, 57,5% e 79%, para P1, P2, P3 e P4, respectivamente. As incidências foram altas, indicando o poder de infecção e colonização deste patógeno. Por sua vez, para *S. macrospora*, as incidências foram relativamente mais baixas do que as de *S. maydis*, tanto para o isolado CMLAPS375 como para CMLAPS10. No isolado CMLAPS375, observaram-se médias mínimas de 29,5%, para P1; 39,5%, para P2; 48,5%, para P3 e 52,5%, para P4, tendo, neste último potencial ocorrido o máximo de 77,5% de incidência do patógeno nas sementes. Já para CMLAPS10, em P1 foram observados 25% de incidência; em P2, 27%; em P3, 43% e em P4, 51,5%, chegando ao máximo de 77,5%. Contudo, a diferenciação nas incidências observadas entre as espécies de *Stenocarpella* reflete o fato de *S. maydis* ser o patógeno com maior capacidade para infectar as sementes de milho e isto ser constantemente verificado em testes de sanidade rotineiros realizados de amostras de regiões produtoras (REIS et al., 2004).

A pouca diferença observada nos testes de sanidade para as cultivares estudadas demonstra que, apesar de os híbridos comerciais de milho serem classificados quanto à sua resistência às podridões do colmo e da espiga (DENTI et al., 2002), e em algumas situações em relação à incidência de grãos ardidos, não existe uma descrição clara da reação dos materiais genéticos especificamente para cada patógeno (CASA et al., 2006).

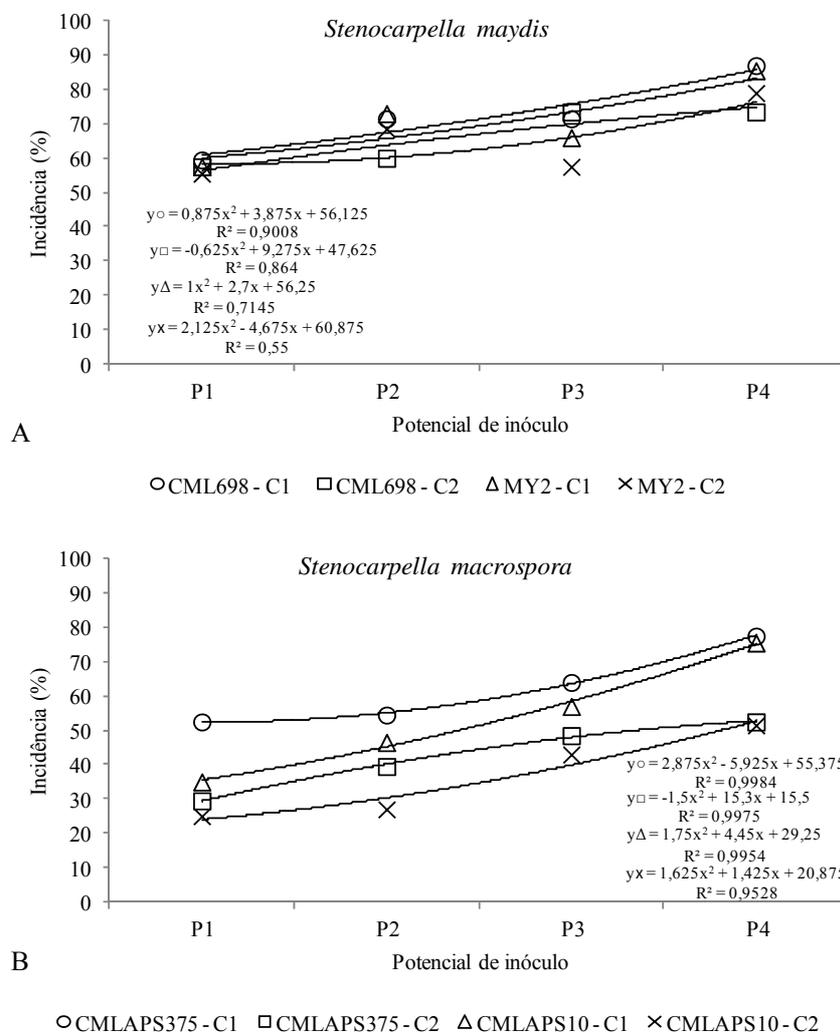


Figura 3. Incidência de dois isolados de *Stenocarpella maydis* - CML698 e MY2 (A) e de *Stenocarpella macrospora* - CMLAPS375 e CMLAPS10 (B), em sementes de milho inoculadas com quatro potenciais de inóculo (P1-24h, P2-48h, P3-72h, P4-96h), utilizando as cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108).

Com base na incidência das espécies em estudo, revelada pelo teste de sanidade, percebe-se que, a partir do contato sementes-fungos, pelo período de 24 horas (P1), fica caracterizado um nível de ocorrência dos patógenos de, em média, 50%.

Os resultados observados nos testes de condutividade elétrica, técnica também indicadora da qualidade fisiológica e integridade física de sementes, demonstraram o comprometimento das estruturas das sementes ao serem expostas a *S. maydis* e *S. macrospora* (Figura 4). Com o aumento dos potenciais de inóculo nas sementes, ocorreram a perda da integridade do sistema de membranas celulares e a redução das atividades respiratórias e biossintéticas, sendo estes alguns dos eventos iniciais do processo de deterioração.

Os altos índices observados em P4, para as duas espécies, refletem o efeito negativo no sistema de membranas das sementes, o que, provavelmente, permitiu uma maior lixiviação de eletrólitos, apesar de isso ser detectado, também, a partir dos primeiros potenciais de inóculo, mas em menor intensidade. Além disso, o decréscimo na germinação e no vigor é diretamente proporcional ao aumento da liberação de solutos, indicando que a avaliação da condutividade pelo método de massa foi eficiente para a determinação, também, do vigor (DIAS; MARCOS FILHO, 1996).

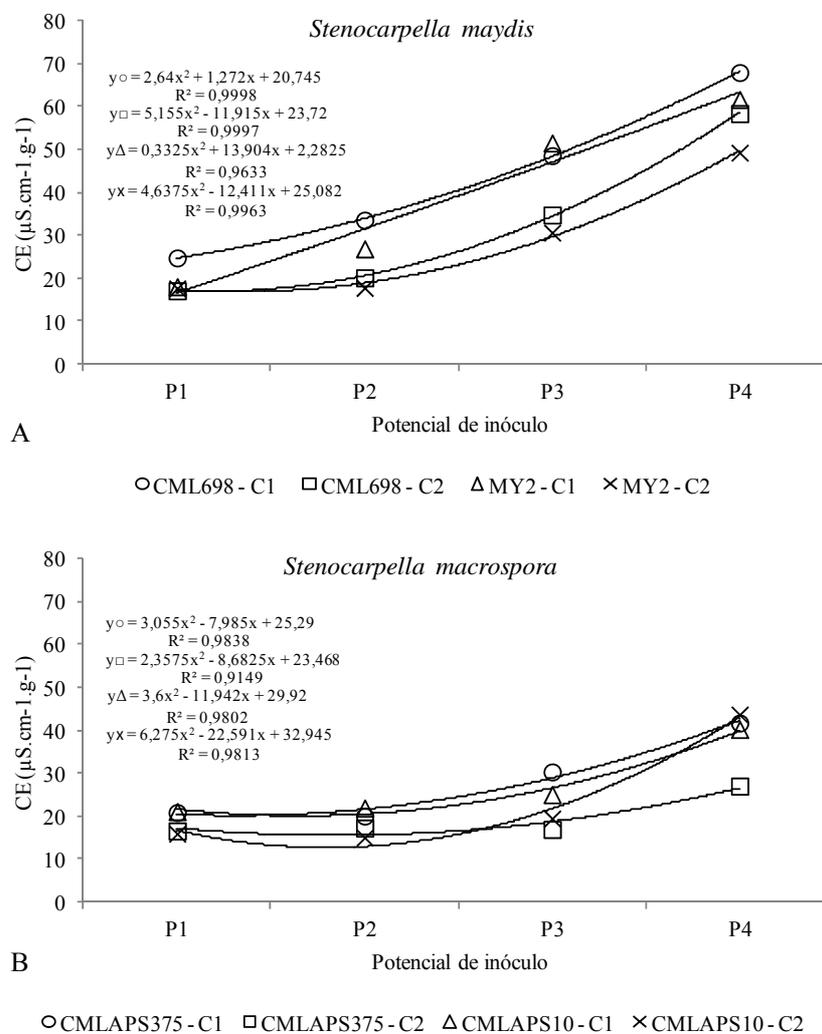


Figura 4. Valores médios de condutividade elétrica de soluções provenientes de sementes de milho das cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108), inoculadas com dois isolados de *Stenocarpella maydis* - CML698 e MY2 (A) e de *Stenocarpella macrospora* - CMLAPS375 e CMLAPS10 (B), em diferentes potenciais de inóculo (P1-24h, P2-48h, P3-72h, P4-96h).

Para ambas as espécies de *Stenocarpella* houve variação entre os isolados e as cultivares estudadas pelos testes de condutividade elétrica. Nas sementes inoculadas com o isolado de *S. maydis* CML698 e com o isolado de *S. macrospora* CMLAPS375, foi observado um processo mais avançado de deterioração. Vale ressaltar também o comportamento diferenciado da cultivar C2, que comprovou ser mais resistente do que a cultivar C1, em relação aos dois isolados utilizados no teste.

Efeitos de *S. maydis* e *S. macrospora* no desempenho inicial das plantas oriundas de sementes inoculadas

De acordo com informações obtidas na literatura, a interferência dos patógenos associados às sementes pode promover, dentre outros efeitos, quedas no poder germinativo, debilitação e redução da população de plantas, além de desenvolvimento de epidemias capazes de acometer todas as partes das plantas, em vários estágios (MACHADO, 2000; MENTEN, 1997).

Na avaliação do índice de velocidade de emergência, estande inicial e final, altura e peso de matéria fresca e seca, verificou-se correlação direta dos resultados obtidos com os potenciais de inóculo nas sementes, para ambas as espécies de *Stenocarpella*, em que os menores danos para as plantas foram observados nos potenciais mais baixos, P1 e P2, o contrário ocorrendo nos potenciais mais altos, P3 e P4. Contudo, entre isolados, cultivares e temperaturas, foram observadas algumas diferenças.

O índice de velocidade de emergência decresceu à medida que se aumentou o potencial de inóculo em cada tratamento com os isolados de *S. maydis* e *S. macrospora* (Figura 5). Os maiores índices para os isolados de *S. maydis* foram de 2,26, para C1, com o isolado CML698 no menor potencial (P1), cultivada na temperatura de 25 °C e de 3,58, para MY2, nos mesmos

parâmetros citados para CML698. A maior redução do IVE observada, para os tratamentos com CML698 e MY2, foi de 0 e 0,04, respectivamente, quando as sementes de C1 se encontravam infectadas com o potencial de inóculo mais elevado (P4) e cultivadas a 20 °C. Foi observado resultado semelhante para *S. macrospora*, nos mesmos potenciais de inóculo, cultivares e temperaturas citados para os maiores e menores índices de IVE alcançados pelos experimentos com os isolados de *S. maydis*. Então, para a cultivar C1, com potencial P1, cultivadas na temperatura de 25 °C, o índice obtido para o isolado CMLAPS375 foi de 4,88 e, para CMLAPS10, de 5,29. Já a diminuição do IVE chegou a 0,82, para a cultivar C1 com CMLAPS375 e de 0,26, para a mesma cultivar com CMLAPS10, ambos no potencial P4 e plantas cultivadas a 20 °C. Estes resultados se correlacionam com os observados nos testes de germinação, de frio, de sanidade e de CE, nos quais se obtiveram menor porcentagem de germinação, maior nível de infecção e maior liberação de solutos das sementes, neste mesmo tratamento.

Portanto, sementes com baixo IVE quando levadas ao campo apresentam emergência mais lenta, possibilitando a ocorrência de outros agravantes. Além disso, estas sementes são consideradas menos vigorosas que aquelas que apresentam altos IVE (SUÑÉ et al., 2002).

Em relação aos dados de estande inicial e final, foi possível observar a diminuição dessa variável tanto para *S. maydis* como para *S. macrospora* (Figura 6). No estande inicial de plantas provenientes de sementes inoculadas com *S. maydis*, observou-se pouca diferença entre os resultados referentes aos isolados; no entanto, foram observadas diferenças entre os potenciais de inóculo para cada isolado. Em sementes inoculadas com CML698 e MY2, no menor potencial (P1) na cultivar C1, mantidas em temperatura de 20 °C, houve a maior emergência, de 40% a 50% de plantas, tendo, no maior potencial (P4), ocorrido os menores níveis de emergências, de 0 a 1%. Para *S. macrospora*, o maior estande inicial

das plantas, verificado com os isolados CMLAPS375 e CMLAPS10, foi de 79%-89% de emergência, no menor potencial de inóculo (P1) para a cultivar C1, desenvolvida a 25 °C, e os menores percentuais, 4%-16%, ocorrendo para o potencial P4 na mesma cultivar C1, na temperatura de 20 °C.

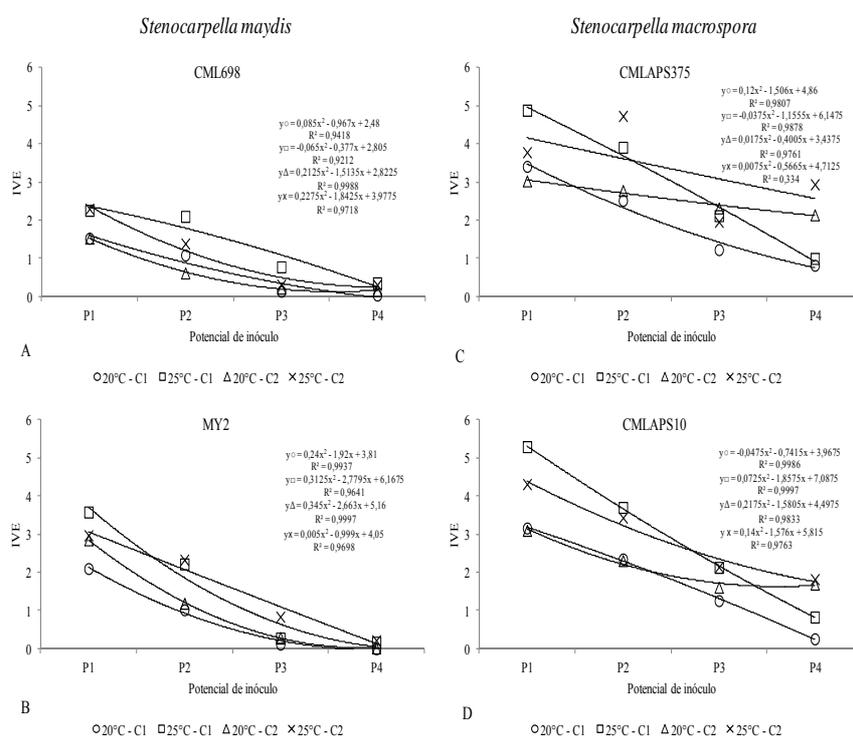


Figura 5. Índice de velocidade de emergência de plantas de milho provenientes de sementes inoculadas com isolados de *Stenocarpella maydis* (A-CML698 e B-MY2) e *Stenocarpella macrospora* (C-CMLAPS375 e D-CMLAPS10), nos diferentes potenciais de inóculo: P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h) e nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108) mantidas a 20 °C e 25 °C.

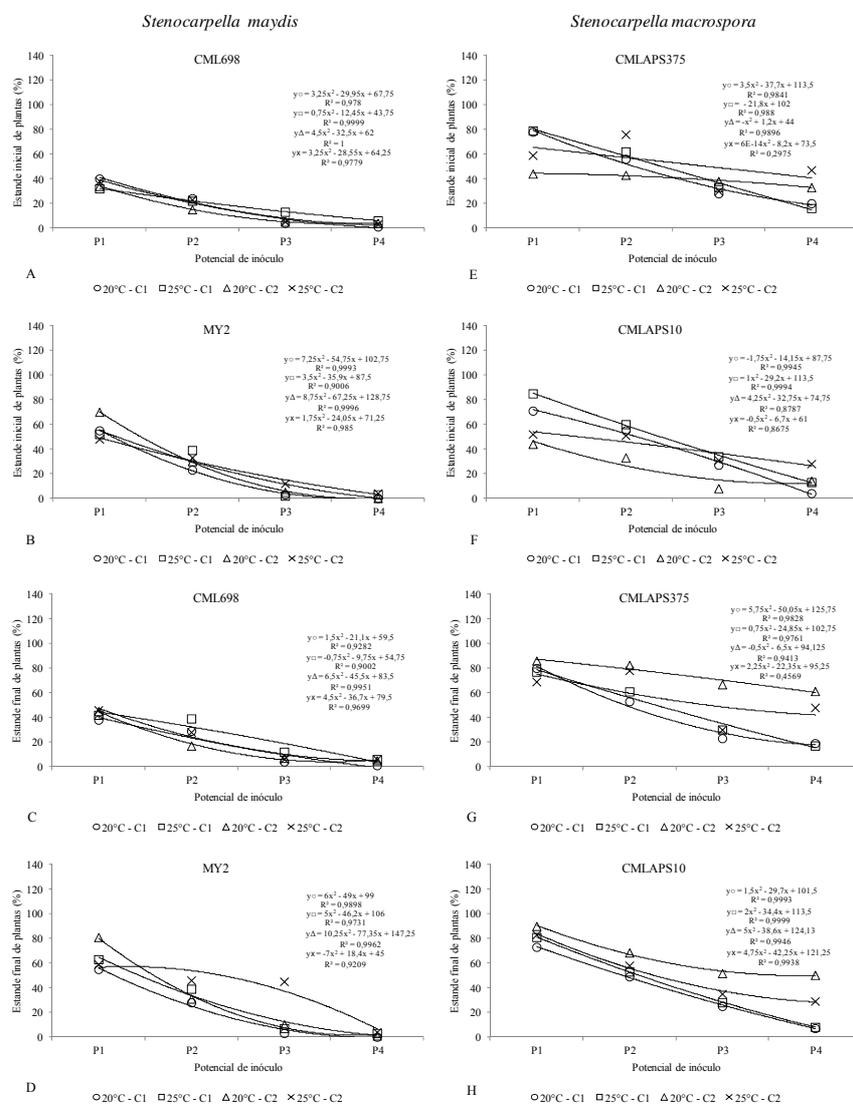


Figura 6. Estande inicial (A, B, E e F) e final (C, D, G e H) de plantas de milho oriundas de sementes inoculadas com isolados de *Stenocarpella maydis* (A e C-CML698 e B e D-MY2) e *Stenocarpella macrospora* (E e G-CMLAPS375 e F e H-CMLAPS10), com quatro potenciais de inóculo (P1-24h, P2-48h, P3-72h, P4-96h), nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108) mantidas a 20 °C e 25 °C.

Na Figura 6, observou-se que o estande final das plantas seguiu um padrão parecido, quanto aos efeitos causados pelos diferentes potenciais de inóculo, também, verificados no estande inicial. Nos resultados obtidos pelos isolados de *S. maydis*, pode-se observar diferença entre CML698 e MY2, no maior estande de plantas emergidas aos 28 dias, no potencial P1, tendo, para o primeiro, sido verificados 46% e, para o segundo, 81% de emergência da cultivar C2, quando essas foram mantidas em temperatura de 20 °C. No entanto, os menores valores de estande final foram semelhantes, variando de 0 a 1%, para ambos os isolados, no potencial P4, cultivar C1, cultivada a 20 °C. Os maiores valores de estande final dos testes com *S. macrospora* foram os mesmos para a cultivar C2 mantida a 20 °C, sementes inoculadas com os isolados CMLAPS375 e CMLAPS10 no potencial P1, sendo de 83% e 86% de emergência, respectivamente. Entretanto, os menores estandes finais, para ambos os isolados, ocorreram para a cultivar C1 no potencial P4, com os resultados de 7% para CMLAPS375 e de 17% para CMLAPS10, de plantas emergidas nas temperaturas de cultivo de 20 °C e 25 °C.

Em estudos conduzidos com outros patossistemas, observaram-se diminuições do IVE e do estande inicial e final de plantas. Nas três variáveis ocorreram resultados inversamente proporcionais aos potenciais de inóculo impostos pelos diferentes tempos de contato das sementes com os patógenos (ARAÚJO et al., 2006; BARROCAS, 2008; BOTELHO, 2011; MACHADO et al., 2001; MORAES; MENTEN, 2006; SARTORI et al., 2004; SOUSA, 2006).

A variável altura de plantas, avaliada para *S. maydis* e *S. macrospora*, foi influenciada pelos potenciais de inóculo (Figura 7), independente dos isolados estudados, do genótipo das cultivares e das temperaturas utilizadas, tendo, as maiores médias de alturas alcançadas sido de 64 cm para os potenciais de inóculo iniciais e de 15 cm nos potenciais mais altos. E poucos casos, nos potenciais P4, foram observados ocasionalmente uma única planta com altura de

50 cm, mostrando que esta semente manteve o seu vigor. Contudo, notou-se que a planta emergida tinha estrutura fraca e, provavelmente, viria a desenvolver as doenças dos patossistemas em estudo. Além disso, a falta de uniformidade das plantas, que foi observada nos tratamentos desde os primeiros potenciais, caso ocorra no campo, acarreta problemas com os manejos necessários para a manutenção da cultura, como aplicação de insumos e irrigação, principalmente nos dias atuais, em que a busca por grandes produções acarreta um adensamento das plantas cada vez maior.

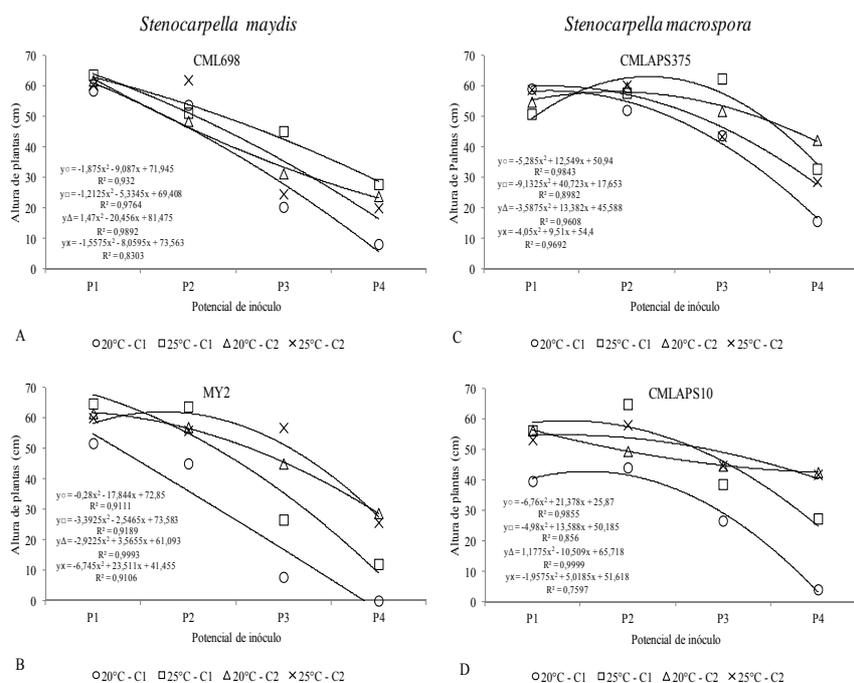


Figura 7. Altura de plantas de milho oriundas de sementes inoculadas com isolados de *Stenocarpella maydis* (A-CML698 e B-MY2) e *Stenocarpella macrospora* (C-CMLAPS375 e D-CMLAPS10), com quatro potenciais de inóculo (P1-24h, P2-48h, P3-72h, P4-96h), nas cultivares C1 (RB9308YG) e C2 (RB9108) mantidas a 20 °C e 25 °C.

Quando avaliado o efeito dos potenciais de inóculo na matéria fresca e seca das plantas oriundas das sementes inoculadas, os resultados seguiram a mesma tendência das demais variáveis consideradas (Figura 8). Nos tratamentos com os menores potenciais para ambas as espécies de *Stenocarpella* observaram-se plantas da cultivar C2 com, no máximo, 16 g de matéria seca, quando inoculadas com isolados de *S. maydis* e com 7,25 g quando com isolados de *S. macrospora*, não havendo grandes diferenças entre os isolados da mesma espécie avaliada. Os menores resultados verificados foram para a cultivar C1 com o potencial P4, registrando, assim, plantas com 0,16 g de matéria seca em média. Vale ressaltar que a produção de biomassa, das plantas submetidas aos tratamentos com diferentes níveis de infecção, foi depreciada, fazendo com que estas respondessem negativamente a partir do menor potencial de inóculo ao maior, tendo C2 demonstrado uma resposta melhor no seu desenvolvimento, suprimindo ligeiramente as consequências das infecções.

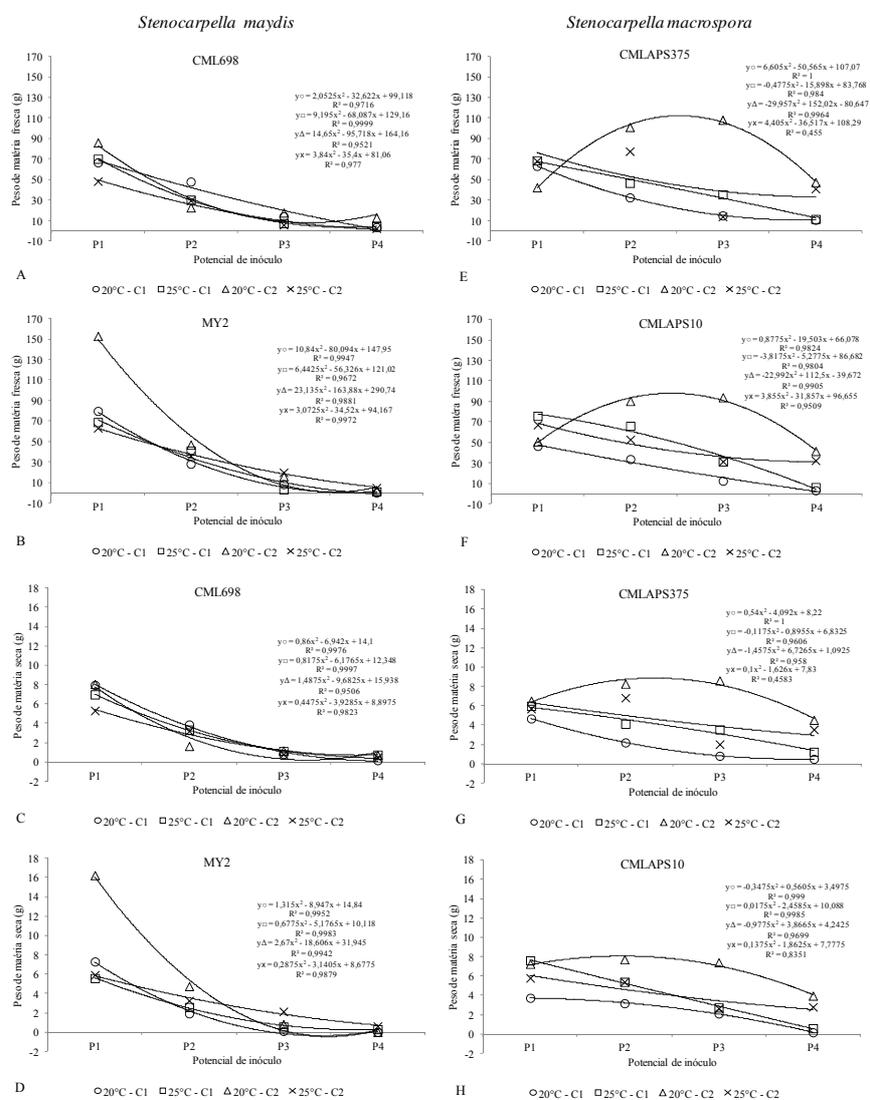


Figura 8. Matéria fresca (A, B, E e F) e seca (C, D, G e H) de plantas oriundas de sementes inoculadas, em diferentes tempos de contato (P1-24h, P2-48h, P3-72h, P4-96h) dos isolados de *Stenocarpella maydis* (A e C-CML698 e B e D-MY2) e *Stenocarpella macrospora* (E e G-CMLAPS375 e F e H-CMLAPS10), em duas cultivares (C1-RB9308YG; C2-RB9108) e mantidas em duas temperaturas (20 °C e 25 °C).

Nos resultados observados de *S. maydis* e *S. macrospora*, foi possível avaliar os efeitos danosos significativos desses patógenos sobre as sementes de milho. E estes efeitos respondem diretamente ao seu potencial de inóculo, ou nível de infecção, desencadeando danos irreparáveis para as sementes portadoras, como verificado nos tratamentos com os potenciais P3 e P4. Além disso, os isolados, os genótipos e as temperaturas podem influenciar todas as variáveis estudadas.

Segundo Araújo et al. (2006), é importante salientar que o nível de inóculo não deve ser utilizado como fator isolado para determinar a qualidade sanitária da semente, devendo-se levar em consideração fatores relacionados ao ambiente, principalmente temperatura e umidade, e fatores intrínsecos à biologia do hospedeiro e do patógeno. Logo, neste trabalho os resultados foram positivos, no que se refere ao poder de infecção dos patógenos, na cultivar C1 mantida à temperatura de 25 °C, o que pode estar associado ao fato de o fungo ter esta temperatura como ideal para seu desenvolvimento e esta cultivar ser caracterizada como suscetível ao patógeno.

CONCLUSÕES

A presença de *S. maydis* e *S. macrospora* em sementes de milho em diferentes potenciais de inóculo influenciou de forma negativa e progressiva a germinação das sementes infectadas, tanto em condições favoráveis para este processo como em condições de temperatura mais baixa, além de provocar o início da degradação das membranas celulares.

A incidência dos patógenos nas sementes aumentou gradualmente com a progressão da infecção decorrente dos tempos de contato das sementes com os fungos.

Em substrato, as duas espécies de *Stenocarpella* causaram danos variáveis ao desenvolvimento inicial das plantas de milho, iniciando pela morte em pré-emergência das sementes/plântulas, seguida de reduções do vigor, estandes, pesos e alturas das plantas emergidas.

A cultivar C1 (RB9308YG) e a temperatura de 25 °C ofereceram as condições mais favoráveis para o desenvolvimento dos patógenos em estudo e seus consequentes efeitos.

Em condições semelhantes de colonização das sementes, os efeitos causados por *S. maydis* foram mais severos do que os danos provocados por *S. macrospora*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A. O.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p. 035-040, 2006.

BARROCAS, E. N. Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas. 110p. Lavras, Minas Gerais, 2008 (Tese de Doutorado em Fitopatologia- UFLA).

BOTELHO, L. S. Relações de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de soja: detecção e transmissibilidade de patógeno. 187p. Lavras, Minas Gerais, 2011 (Tese de Doutorado em Fitopatologia- UFLA).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.

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, set./out. 2006.

CELANO, F. A. de O. Desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento, após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica. 83p. Lavras, 2004 (Dissertação de Mestrado em Fitopatologia- UFLA).

COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R.M; POZZA, E.A; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27,n.5,p.1023-1030, set/out. 2003.

DENTI, E., REIS, E. M. & FORCELINI, C. A. Reação de genótipos de milho às podridões da base do colmo. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.286-288. 2002.

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Sci. agric.** Piracicaba. vol.53, n.1. Jan./Apr, 1996.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GARCIA, S. M.; NEUMANN, V. S.; SILVA, J. I.; ZAMBIASE, C. A. ; MORAES, D. M. Teste de frio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de milho. In: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-graduação, 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPel, Nov. 2008. CD-ROM.

KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANCA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

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

MACHADO, J. C.; CARVALHO, J. C. B.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. **Proceedings...** Angers: ISTA, p. 62. 2001.

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

MENTEN, J. O. M. Situação dos padrões de sanidade de sementes. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.86-89, 1997.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan. 1995.

MIGUEL, M. H.; CARVALHO, M. V.; BECKERT, O. P.; MARCOS FILHO, J. Teste de frio para avaliação do potencial fisiológico de sementes de algodão. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.741-746, out./dez. 2001.

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

PINTO, N. F. J. A. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2005. 14 p. (Circular técnica, 66).

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

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

SILVA, A. R.; JULIATTI, F. C. Esporulação de *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* em diferentes meios de cultura. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 21, n.3, p.127-131, 2005.

SOUSA, M. V. Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SUÑÉ, A. D.; FRANKE, L. B.; SAMPAIO, T. G. Efeitos do condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de *Adesmia latifolia*. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 24, n.1, p.18-23, 2002.

TRENTO, S. M.; IRGANG, H.; REIS, E. M. Efeito de rotação de culturas, de monocultura e de densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 609-613, jul. 2002.

ARTIGO 4

**ESTUDO DA COLONIZAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO POR
ESPÉCIES DE *Stenocarpella* TRANSFORMADAS COM PROTEÍNAS
FLUORESCENTES E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA**

STUDY OF THE COLONIZATION OF MAIZE SEEDS BY SPECIES
Stenocarpella TRANSFORMED WITH FLUORESCENT PROTEINS AND
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Preparado em acordo com Journal of Seed Science (versão preliminar)

Carolina da Silva Siqueira^{1*}, José da Cruz Machado¹, Carla Lima Corrêa¹

1. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Caixa Postal 3037,
37200-000, Lavras, MG, Brasil. *Autor para correspondência <kerolpet@gmail.com>

RESUMO

Doenças causadas por associações de patógenos com sementes provocam perdas importantes nos cultivos de milho. *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, espécies causadoras de manchas foliares, podridões em plantas e grãos ardidos de milho, podem ser transportadas e dispersas para áreas produtoras através das sementes. Além disso, a estrutura da semente de milho é, muitas vezes, comprometida pela colonização por parte destes patógenos fazendo com que a germinação seja prejudicada. O objetivo neste estudo foi correlacionar diferentes potenciais de inóculo com o efeito causado pela presença desses patógenos nos tecidos de sementes de milho. Para isso, os isolados foram transformados com GFP e DsRed, por meio da introdução desses genes marcadores nos seus núcleos, empregando a técnica de transformação de protoplastos. Sementes foram inoculadas pelo método de condicionamento osmótico com isolados transformados e não transformados das duas espécies, com diferentes tempos de exposição das sementes a estes isolados, caracterizando, assim, os potenciais de inóculo, P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) e P4 (96h). As sementes inoculadas com isolados transformados foram analisadas em estereomicroscópio com fluorescência e as com isolados não transformados foram submetidas a análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV). A transformação de *S. macrospora* foi realizada pela primeira vez com sucesso. As sementes inoculadas, com isolados transformados expressando GFP e DsRed, de ambas as espécies, elucidaram por meio das intensidades das fluorescências emitidas, a capacidade desses organismos de causarem infecção e colonização em diferentes potenciais de inóculo, tendo os potenciais P3 e P4 sido os que provocaram as maiores intensidades de fluorescência pelas colonizações dos patógenos. Por meio da MEV, as análises realizadas em sementes de milho infectadas foram eficazes para a observação dos danos causados nos tecidos das sementes infectadas pelos patógenos, em todos os potenciais de inóculo. Nos potenciais P3 e P4, visualizou-se um abrangente e abundante crescimento micelial nas estruturas colonizadas das sementes.

Termos para indexação: Patologia de sementes. Transformação genética. GFP. DsRed. Fungo.

ABSTRACT

Diseases caused by association of pathogens and seeds are major causes of large losses in maize crops. *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* species causing leaf spots and stem and ear rots, can be transported and disseminated between cultivating areas through seeds. Furthermore, the structure of maize seed is often colonized by those pathogens which affects germination and vigor. The objective in this study was to correlate different inoculum potentials with the effect caused by the presence of these pathogens in the tissues of maize seeds. For that, the isolates were transformed with GFP and DsRed through introduction of these marker genes in their nuclei, employing the technique of protoplast transformation. Seeds were inoculated by osmotic conditioning method with transformed and not transformed isolates of the two species, with different periods of exposition of seeds to those isolates, characterizing the inoculum potentials, P1 (24h), P2 (48h), P3 (72h) and P4 (96h). Seeds inoculated with transformed isolates were analyzed with a stereomicroscope of fluorescence and not transformed isolates were examined by SEM. The transformation of *S. macrospora* was performed successfully for first time. The seeds inoculated with isolates expressing GFP and DsRed in both species elucidated by means of the intensities of the emitted fluorescence, the ability of those organisms to cause infection and colonization in different inoculum potentials. The potentials P3 and P4 caused the highest levels of emitted fluorescence for the colonization by both pathogens. By means of SEM, the analyzes proved to be satisfactory for observation of damage in the tissues of infected seeds by the pathogens at all inoculum potentials. At potential P3 and P4 a comprehensive and abundant mycelial growth in the colonized seed structures were well visualized.

Index terms: Seed pathology. Genetic transformation. GFP. DsRed. Fungus.

INTRODUÇÃO

Sementes de milho podem abrigar diferentes patógenos e os fungos do “complexo *Stenocarpella*” podem ser responsáveis por algumas dessas interações e serem constantemente, através destas, disseminados em áreas produtoras e/ou introduzidos em novas áreas onde o milho ainda não foi cultivado. Além disso, sementes portadoras, também conhecidas como “grãos ardidos”, são indesejáveis na comercialização, pois é descontado do preço de venda um percentual referente à incidência das mesmas (Ribeiro et al., 2005). Acrescido a isto, existe, ainda, uma consequência relevante por parte da associação de sementes de milho com *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton, que é a produção de toxinas nocivas à saúde animal (Cutler et al., 1980; Pinto, 2005).

A estrutura da semente de milho é, muitas vezes, comprometida pelas injúrias causadas pela colonização por parte destes patógenos, e o armazenamento da semente infectada garante a sobrevivência do patógeno até o momento da sementeira, quando recebe os estímulos do ambiente para iniciar o processo de germinação. Os fungos *S. maydis* e *S. macrospora* sobrevivem, principalmente, na forma de micélio no endosperma e no embrião das sementes de milho. Sendo assim, quando a semente é hidratada, ao entrar em contato com a água do solo, o micélio do fungo reassume sua atividade vital e passa a crescer do interior à superfície da semente. Ao crescer sobre a semente, o fungo acaba alcançando as raízes e o coleóptilo das plantas. Pela colonização do coleóptilo, atinge a superfície do solo e, conseqüentemente, causa a morte da semente ou compromete seriamente a planta emergida (Casa et al., 2006).

Portanto, torna-se importante o estudo da dinâmica deste patógeno em infectar os tecidos das sementes bem como a sua exata localização nesta interação. Estudos utilizando a expressão de proteínas fluorescentes, como o

green fluorescent protein (GFP) e o *red fluorescent protein* (DsRed), têm sido realizados para esclarecer os processos de infecção e colonização dos agentes patogênicos em tecidos de espécies hospedeiras, com vantagens pela observação *in vivo* (Tsien, 1998; Lorang et al., 2001). Além disso, estudos em microscopia eletrônica de varredura (MEV) podem auxiliar no entendimento dessas relações de patogenicidade.

O objetivo neste trabalho foi a obtenção de isolados, das duas espécies de *Stenocarpella*, transformados com genes marcadores que expressam as proteínas fluorescentes GFP e DsRed, além de correlacionar a presença dos seus diferentes potenciais de inóculo com a infecção e a colonização dos tecidos das sementes utilizando microscopia de fluorescência, o mesmo sendo realizado com isolados não transformados utilizando microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Patologia de Sementes (LAPS), Virologia Vegetal e Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Origem de isolados das espécies de *Stenocarpella* e perfil de sementes

Os isolados utilizados de *S. maydis* foram obtidos da coleção micológica de Lavras da UFLA e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo), em Sete Lagoas, MG, sendo CML698 e MY2, respectivamente. Da coleção micológica do LAPS da UFLA foram utilizados dois isolados de *S. macrospora*, o CMLAPS375 e o CMLAPS10. As sementes de milho utilizadas neste estudo foram da cultivar RB9308YG, suscetível às espécies de *Stenocarpella*, e tiveram sua qualidade sanitária e fisiológica inicial

determinada de acordo com testes indicados nas Regras para Análises de Sementes (2009a) e no Manual de Análise Sanitária de Sementes (*International Seed Testing Association* – ISTA, 1976; Brasil, 2009b). Estas sementes foram cedidas pela Empresa Riber Sementes, de Patos de Minas, MG.

Transformação dos isolados das espécies de *Stenocarpella*

Os plasmídeos utilizados para as transformações foram cedidos pelo Dr. Theo van der Lee (Plant Research International, The Netherlands) e estes têm como vetor de expressão para o GFP, o pSC001 e, para o DsRed, o pSC002, ambos contendo o gene promotor *pToxA*, proveniente do fungo *Aspergillus nidulans*, contendo um gene de resistência (*hpr*) ao antibiótico higromicina-B (Maier et al., 1998). Células de *Escherichia coli* foram utilizadas para a multiplicação desses plasmídeos seguindo a metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001). Para a transformação dos isolados selecionados foram utilizados protocolos anteriormente desenvolvidos por Maier et al. (2005) e Silva et al. (2009) para *Fusarium graminearum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, com modificações.

Primeiramente, foram obtidos os protoplastos dos isolados utilizados neste estudo, iniciando-se com o cultivo dos fungos em meio de cultura BDA (20 g de ágar, 20 g de dextrose e 200 g de batata/litro), por cinco dias, à temperatura de 25 ± 2 °C e sob regime luminoso de 12 horas de luz/12 horas de escuro. Em seguida, foram retirados discos de micélio das colônias e transferidos para Erlenmeyers (100 ml) contendo 50 ml de meio líquido de batata-dextrose. Estes foram dispostos em agitador mecânico horizontal a 125 rpm e 25 °C. Depois da produção de massas miceliais, procederam-se a filtração e a secagem, com o auxílio de bomba a vácuo. Posteriormente, para cada 3 ml do estabilizador osmótico KCl (0,7 M), foram adicionados 100 µg de

micélio seco e a enzima *lyzing enzymes* (Sigma- L1412- 10 g), na proporção de 10 mg/ml de estabilizador osmótico. Os protoplastos de *S. maydis* e *S. macrospora* foram gerados após 3 horas em agitador, a 75 rpm e 28 °C.

Os protoplastos resultantes foram filtrados em uma camada de gaze previamente esterilizada e, posteriormente, centrifugados, por 5 minutos, a 2.000 rpm e à temperatura de 4 °C. Em seguida, foram ressuspensos uma vez em KCl (0,7 M) gelado (4 °C) e novamente em tampão de armazenamento, contendo quatro partes de STC (0,8 M sorbitol, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂) e uma parte de SPTC (0,8 M sorbitol, 40% PEG4000, 50 mM Tris HCl pH 8,0 e 50 mM CaCl₂). As suspensões contendo os protoplastos, na concentração final de aproximadamente 10⁷ protoplastos/ml, receberam 10 µl de DNA plasmidial (0,35-1,66 µg/µl) e foram mantidas em gelo, por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de SPTC, deixando-as em temperatura ambiente por mais 20 minutos. Depois desse período, essas suspensões foram vertidas separadamente em Erlenmeyers contendo 200 ml de meio de regeneração [0,1% extrato de levedura (Sigma-Y4250- 250 g), 0,1% do casienhydrolysate (Sigma-C8845- 500 mg), 34,2% de sacarose (Sigma-84100- 1 kg) e 1,0% de ágar granulado (Difco-1016141000- 1 kg)]. Em seguida, esses meios contendo os possíveis isolados transformados foram vertidos em placas de Petri (9 mm) e incubados por 72 horas, a 25±2 °C. Decorrido esse tempo, a cada placa, foram adicionados 10 ml de ágar-água contendo o antibiótico higromicina-B, na concentração de 100 µg/ml, sendo elas mantidas em câmara do tipo BOD, a 25±2 °C e fotoperíodo de 12 horas, por até quinze dias.

Após a transformação, os isolados expressando GFP e DsRed, foram transferidos para o meio BDA acrescido do antibiótico higromicina-B, na concentração de 100 µg/ml e para o meio OA (20 g de ágar e 30 g de farinha de aveia /litro) acrescido de higromicina-B, na mesma concentração. Todos os isolados foram analisados morfológicamente e quanto às suas características

culturais, tais como coloração e crescimento das colônias e, para a observação da estabilidade dos mesmos, repicagens sucessivas foram realizadas em meio BDA contendo higromicina-B (100 µg/ml). Tanto para os bioensaios como para os testes de estabilidade, observações foram realizadas utilizando-se estereomicroscópio de fluorescência (Leica-M165FC) e microscópio de epifluorescência (Zeiss Axio Observer Z.1) equipados com os filtros GFP, excitação filtro 470 a 490 nm e DsRed, excitação filtro 510 a 560 nm. As imagens obtidas das avaliações foram editadas utilizando-se os softwares Axio Vision Release V.4,7 e o Microsoft Office Picture Manager.

Inoculação de sementes

Sementes de milho foram previamente desinfestadas, com hipoclorito de sódio 1%, por um minuto e, em seguida, lavadas três vezes em água destilada e colocadas para secar por 48 horas. Posteriormente, as sementes foram distribuídas sobre quatro isolados transformados de cada espécie de *Stenocarpella*, ou seja, os de *S. maydis*: MCL698-GFP e MY2-GFP, MCL698-DsRed e MY2-DsRed, e de *S. macrospora*: CMLAPS375-GFP e CMLAPS10-GFP, CMLAPS375-DsRed e CMLAPS10-DsRed, desenvolvidos por cinco dias, em placas contendo meio de cultura BDA modificado com soluto manitol com potencial hídrico ajustado para -1,4 MPa, conforme descrito por Machado et al. (2001) e calculado pelo software SPPM (Michel e Radcliffe, 1995), acondicionadas, a 25±2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Para a inoculação das sementes com os isolados transformados, além do soluto manitol, o meio BDA foi acrescido de higromicina-B na concentração de 100 µg/ml. Durante 24, 48, 72 e 96 horas, as placas contendo as sementes foram mantidas nas mesmas condições, ou seja, com temperatura e fotoperíodo controlados em câmara de crescimento, para a obtenção de sementes com os diferentes potenciais de

inóculo: P1, P2, P3, P4, respectivamente. As sementes foram secas à temperatura ambiente por 48 horas.

O mesmo método utilizado para a inoculação de sementes com os isolados transformados foi empregado para a inoculação de sementes com dois dos isolados selvagens das duas espécies de *Stenocarpella* (CML698 e CMLAPS375, ambos sem transformação), para utilização como controle e para estudo com ajuda de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Preparo para microscopia eletrônica de varredura (MEV) de sementes de milho inoculadas com espécies de *Stenocarpella*

As sementes de milho inoculadas artificialmente, com os isolados não transformados de *S. maydis* e *S. macrospora*, foram separadas aleatoriamente para observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Estas sementes foram seccionadas transversalmente, longitudinalmente e medialmente, para posterior fixação em solução Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M - pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M), pelo período de 48 horas, à temperatura de 4 °C. Após este período de fixação primária do material, os fragmentos das sementes de cada tratamento foram imersos em glicerol 30%, por 30 minutos. Posteriormente, estes foram cortados em fragmentos menores utilizando bisturis, em nitrogênio líquido e, posteriormente, imersos em água destilada. Após este processo, as amostras foram submetidas a uma solução fixadora de tetróxido de ósmio 1%, em água, por 3 horas, lavadas em água destilada por 3 vezes e, posteriormente, desidratados em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100% por três vezes). Então, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030, para substituição da acetona por CO₂ e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em

suportes de alumínio, *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050, para serem observados em MEV LEO EVO 40 XVP. As imagens foram geradas, registradas e gravadas digitalmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transformação genética de *S. maydis* e *S. macrospora* com a expressão das proteínas fluorescentes GFP e DsRed foi realizada eficazmente, obtendo-se, ao final, transformantes estáveis, comprovados através da resistência ao antibiótico higromicina-B e da visualização das proteínas fluorescentes, verde e vermelha. A espécie *S. maydis* já tinha sido transformada anteriormente em outro estudo, mas devido à instabilidade dos seus isolados no armazenamento, ela foi transformada novamente; para *S. macrospora*, foi seu primeiro relato de transformação.

Primeiramente, obtiveram-se protoplastos estáveis e em quantidade suficiente para a transformação, observando-se, como descrito por Peberdy et al. (1976), que vários são os fatores influenciadores na obtenção dos mesmos, como, por exemplo, a preparação enzimática, o estabilizador osmótico, a idade micelial e o microrganismo a ser utilizado. Mesmo para *S. macrospora*, que era a primeira tentativa de produção de protoplastos, as quantidades foram favoráveis, variando entre $30-45 \times 10^5$ protoplastos/ml e, para *S. maydis*, de $40-45 \times 10^5$ protoplastos/ml. Para muitos fungos este é um ponto crítico porque, sem a obtenção de protoplastos íntegros, o sucesso da transformação fica comprometido (Seh e Kenerley, 1988; Marchi et al., 2005; 2006).

Com o procedimento de transformação, foram obtidos, para *S. maydis*, 21 isolados transformados contendo o gene que expressa GFP e 20 contendo o gene para DsRed, ou seja, aproximadamente 3-4 transformantes de *S. maydis* por

μg de DNA plasmidial. Para *S. macrospora*, foram obtidos 18 isolados com o GFP e 15 com o DsRed, resultando de 2-3 transformantes por μg de DNA plasmidial. Quanto às características morfológicas, quando comparados isolados transformados e não transformados, estes revelaram poucas diferenças, como na coloração das colônias, sendo observada, nas colônias mais velhas (com 8-15 dias) destes transformados, uma coloração mais escura que a normal e, às vezes, tonalizações esverdeadas. Quanto ao crescimento micelial em meio BDA acrescido de higromicina-B, observou-se que os transformados foram mais lentos, levando de 2-3 dias a mais para ocupar uma placa de Petri que um isolado não transformado. Em meio OA acrescido de higromicina-B, vários isolados transformados, tanto de *S. maydis* quanto de *S. macrospora*, cresceram normalmente, mas deixaram de manter a fluorescência. Contudo, Chalfie et al. (1994) afirmam que o GFP não interfere nas funções normais das células e, portanto, pode ser utilizado para análise dos processos celulares (Cormack, 1998; Tsien, 1998). Observando-se a estabilidade do crescimento micelial, quando os fungos transformados de ambas as espécies foram repicados, sucessivamente, por cinco vezes, em meio BDA contendo higromicina-B (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), verificou-se um crescimento normal e eles mantiveram sua respectiva fluorescência. Cerca de 20% perderam essa capacidade, o que pode estar relacionado com a dificuldade dos núcleos celulares de manter e passar a informação.

Para os isolados transformados expressando GFP e DsRed, de *S. maydis* e *S. macrospora*, a fluorescência verde e a vermelha (Figuras 1 e 2), foram observadas no citoplasma das hifas e nos conídios; já os picnídios mantiveram a sua cor natural, mesmo que os seus conídios fossem positivos. No entanto, houve variação na intensidade da fluorescência, seja esta verde ou vermelha. Nos isolados transformados expressando DsRed ocorreram os níveis mais baixos de intensidade da fluorescência.

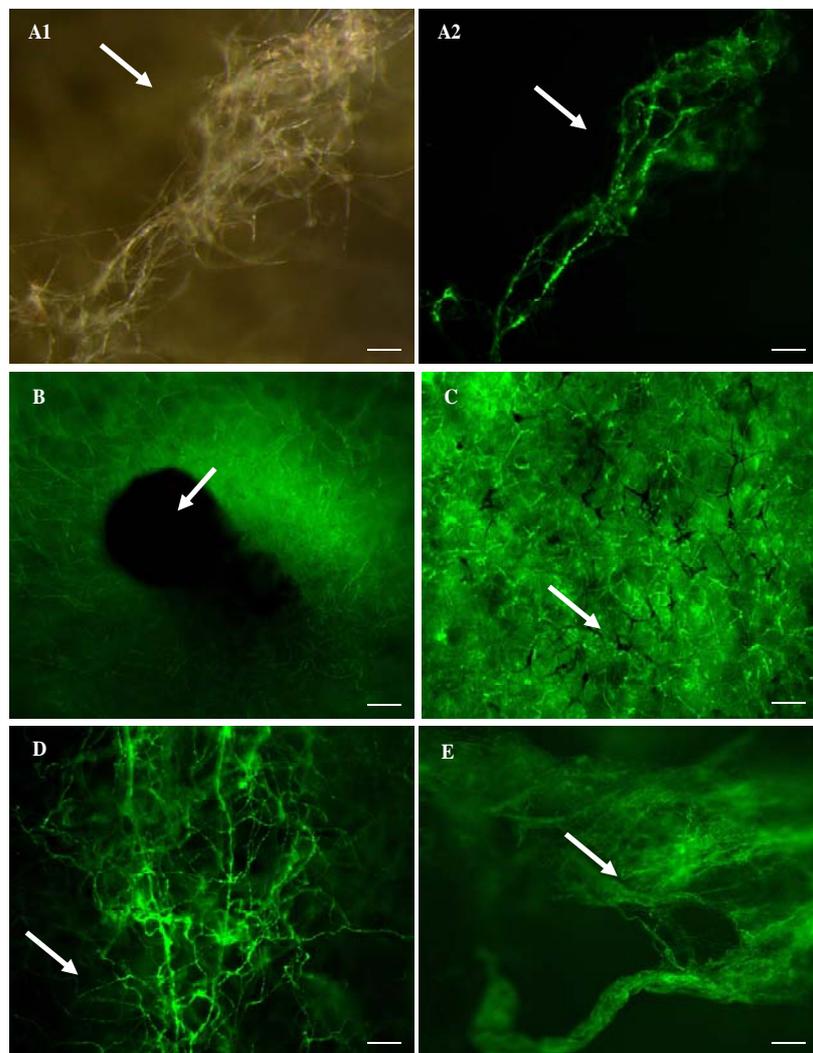


Figura 1. Esteriomicrografias de fluorescência dos fungos transformados com a proteína verde fluorescente, GFP. Para *Stenocarpella maydis*, A1 (luz branca), A2 e C - hifas do isolado CML698-GFP e B - picnídio de MY2-GFP. Para *Stenocarpella macrospora*, D - hifas do isolado CMLAPS10-GFP, E - hifas do CMLAPS375-GFP. Barra=100 μ m.

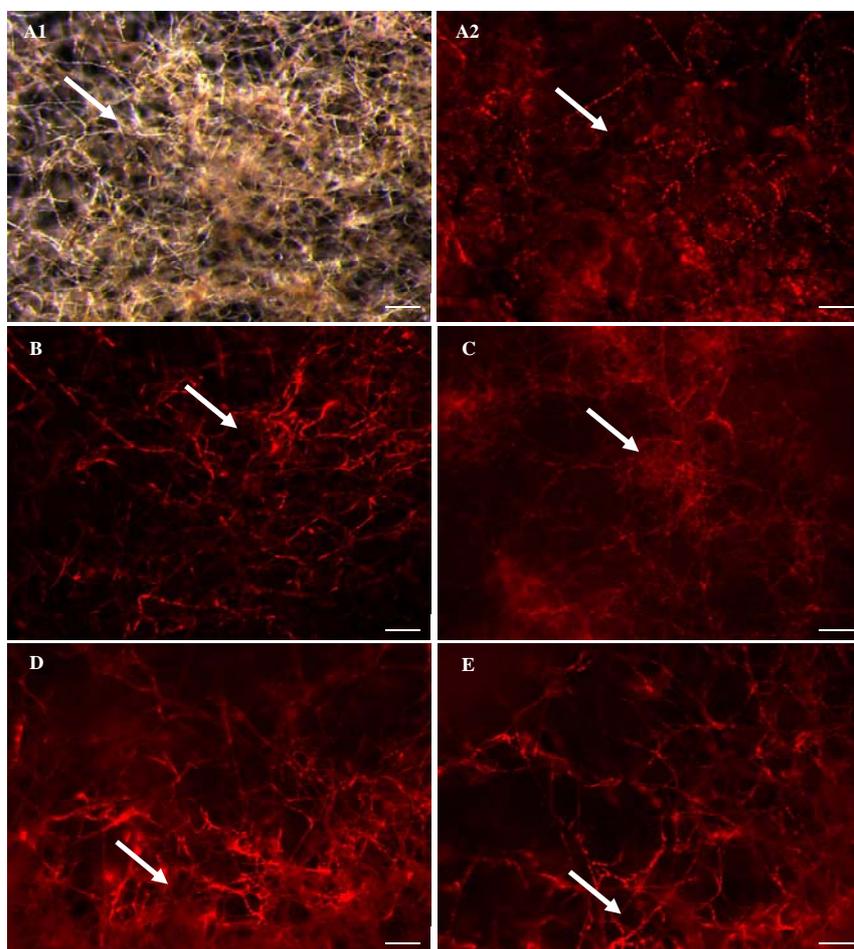


Figura 2. Esteriomicrografias de fluorescência dos fungos transformados com a proteína vermelha fluorescente, DsRed. A1 (luz branca), A2 e B - hifas do isolado de *Stenocarpella maydis* CML698-DsRed. C, D, E - hifas dos isolados de *Stenocarpella macrospora*, sendo, C - CMLAPS375-DsRed e D e E - CMLAPS10-DsRed. Barra=100 μ m.

Nas sementes inoculadas com os isolados transformados expressando GFP, foram observadas correlações diretas entre a intensidade da fluorescência das colonizações com os potenciais de inóculo (tempo de exposição da semente ao fungo transformado) (Figura 3). Nas sementes com potencial P4, verificou-se

abrangente colonização micelial e esta um tanto compactada ou bem aderida, o que foi possível observar e acompanhar através da forte fluorescência emitida pelos isolados transformados, nas sementes. Em estudo com *Aspergillus flavus* em grãos de milho, Du et al. (1999) também conseguiram correlacionar a intensidade de fluorescência visualizada com a presença e a colonização deste patógeno transformado e alertaram para a importância do uso dessa ferramenta no estudo da detecção deste fungo em grãos destinados à alimentação ou, mesmo no rastreamento de genótipos de milho resistente ao acúmulo de aflatoxina, substância tóxica produzida por este fungo muito estudada. Esse fato pode direcionar novos estudos com as espécies de *Stenocarpella* transformadas, correlacionando a colonização em sementes com a presença de toxinas nocivas, sendo estas a diplodiatoxina produzida por *S. maydis* (Pinto, 2005) e a diplodiol produzida por *S. macrospora* (Cutler et al., 1980) para as quais até o momento, não há informações mais aprofundadas na literatura.

Não foram observadas grandes diferenças nas sementes inoculadas com os isolados transformados de *S. maydis*, quando comparados com os de *S. macrospora*, mas foi possível perceber uma intensidade maior na fluorescência das sementes inoculadas por *S. maydis*. Isso pode estar relacionado à facilidade maior deste fungo em se associar com as sementes de milho ou, mesmo, com o seu melhor desenvolvimento neste tipo de substrato, enquanto *S. macrospora* é constantemente ligado à sintomatologia das folhas do milho (Casa et al., 2006).

As sementes inoculadas com os isolados de *S. maydis* e *S. macrospora* transformados que expressam o DsRed não diferiram das inoculadas com isolados expressando GFP (Figura 4). Nos maiores potenciais de inóculo, P3 e P4, observaram-se sementes com uma colonização mais intensa destes patógenos, sendo possível concluir que nestes potenciais ocorreram infecções mais profundas, quando observada a fluorescência vermelha emitida, principalmente quando estes são comparados às sementes não inoculadas.

Portanto, verificou-se a capacidade de *S. maydis* e *S. macrospora* de penetrar em partes mais profundas, como o embrião e o endosperma, das sementes de milho.

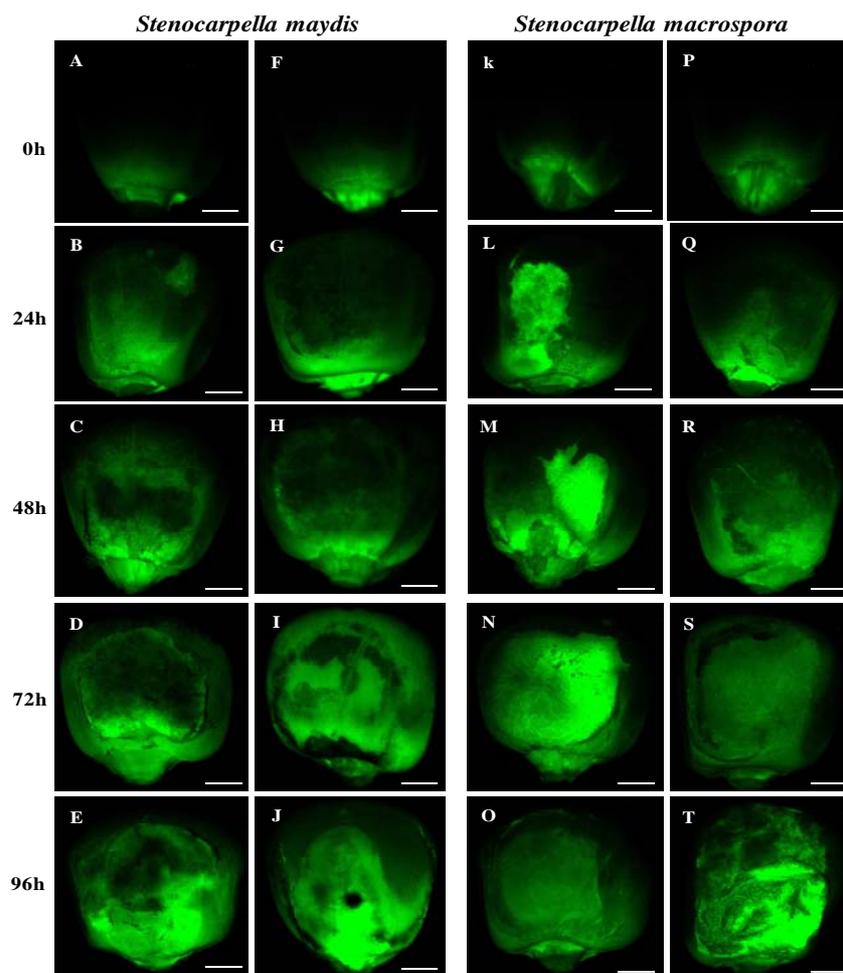


Figura 3. Esteriomicrografias de fluorescência de sementes de milho inoculadas com fungos transformados com GFP, em diferentes potenciais de inóculo P1(24h), P2(48h), P3(72h) e P4(96h). Para *Stenocarpella maydis*, B, C, D e E correspondem ao isolado CML698-GFP; G, H, I e J ao MY2-GFP. Para *Stenocarpella macrospora*, L, M, N e O correspondem ao isolado CMLAPS375-GFP; Q, R, S e T ao CMLAPS10-GFP. A, F, K e P são os controles, ou seja, sementes sem inoculação. Barra=100 μ m.

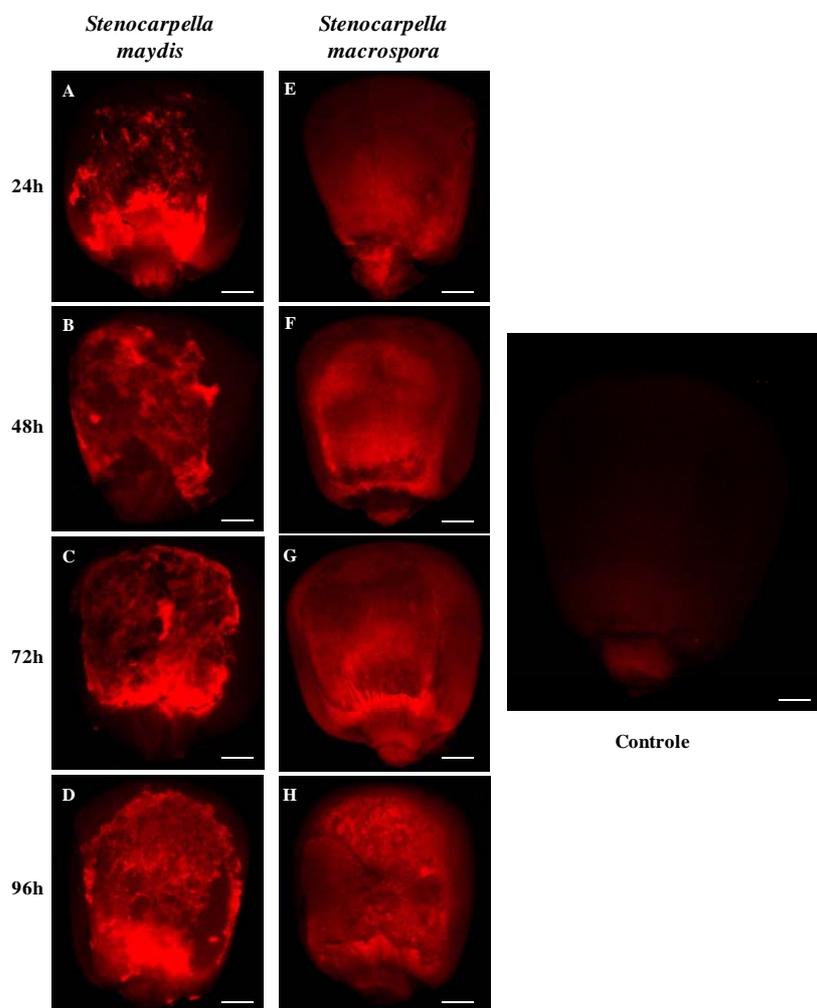


Figura 4. Esteriomicrografias de fluorescência de sementes de milho inoculadas com fungos transformados com DsRed, em diferentes potenciais de inóculo P1(24h), P2(48h), P3(72h) e P4(96h). Para *Stenocarpella maydis*, A, B, C e D correspondem ao isolado CML698-DsRed. Para *Stenocarpella macrospora*, E, F, G e H correspondem ao isolado CMLAPS375-DsRed. O controle é a semente sem inoculação. Barra=100 μ m.

Além das observações de os isolados de *S. maydis* e *S. macrospora* transformados, tanto expressando GFP como DsRed, serem capazes de

demonstrar processos de infecção e colonização, o estudo foi levado paralelamente para análises com microscopia eletrônica de varredura. Verificou-se, por esta ferramenta, também, uma excelente maneira para evidenciar detalhes dos processos envolvendo a colonização desses patógenos.

Por meio das análises em MEV, foi possível realizar avaliações das mudanças das características das quatro principais estruturas físicas da semente de milho: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (Paes, 2006). Estas alterações nas estruturas celulares foram diretamente proporcionais ao aumento do potencial de inóculo nas sementes inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*.

No pericarpo, onde se encontram a epiderme (primeira camada), seguida do mesocarpo, das células cruzadas, das células tubulares e da testa (última camada do pericarpo), em todos os potenciais de inóculo, foi observada a presença das espécies de *Stenocarpella* (Figura 5). No P1, as hifas dos isolados estavam mais superficiais, mas já causavam deformações na epiderme; em P2, as hifas já eram encontradas também atrás da testa, o que demonstra a rapidez com que as colonizações podem atravessar o pericarpo das sementes. Entretanto, nos potenciais mais altos, P3 e P4, observou-se a tomada de quase todo o pericarpo, com grande quantidade de hifas e estas se tornando mais compactas e bem aderidas às camadas, causando drástica redução do volume das células de proteção, injúrias e deformação das partes externas das sementes. A perda da integridade do pericarpo pode afetar a condutividade elétrica dos exsudatos liberados pelas sementes de milho. O mesmo também pode ser observado em sementes que passaram por um processo drástico de secagem (José et al., 2005). Não foram observadas grandes diferenças entre as colonizações de *S. maydis* e *S. macrospora*, mas, nesta última, verificaram-se hifas mais elevadas na cobertura das sementes, ou menos aderidas às sementes, e ligeiramente mais grossas.

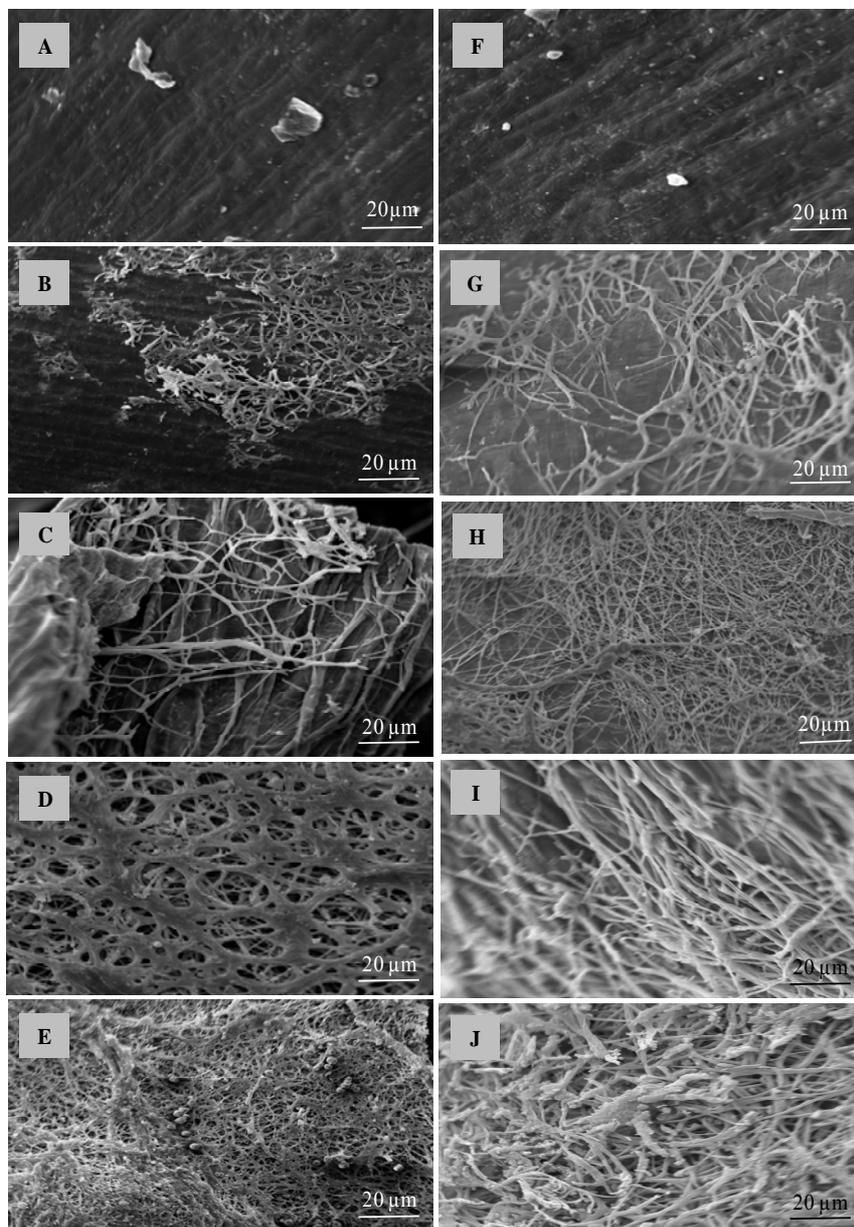


Figura 5. Eletromicrografias de varredura da epiderme de sementes de milho inoculadas com *Stenocarpella maydis* (B-E) e *Stenocarpella macrospora* (G-J). A e F- controle (semente sem inoculação); B e G- potencial de inóculo P1 (24h); C e H- P2 (48h); D e I- P3 (72h) e E e J- P4 (96h).

A associação destes patógenos ao interior das sementes de milho é de extrema importância porque o endosperma representa, aproximadamente, 83% do peso seco do grão (Figuras 6 e 7), consistindo principalmente de amido (88%), organizado na forma de *grânulos* e de proteínas de reserva (8%) do tipo prolaminas, chamadas *zeínas*, sendo que estas proteínas formam os *corpos proteicos* que compõem a matriz que envolve os grânulos de amido dentro das células no endosperma (Paes, 2006), ou seja, a maior parte da semente de milho. Além disso, as espécies de *Stenocarpella* podem se aproveitar do interior das sementes de milho, com base na distribuição dos grânulos de amido e da matriz de proteína, que tem o endosperma classificado como sendo de dois tipos: o farináceo e o vítreo. No primeiro, os grânulos de amido são arredondados e estão dispersos, não havendo matriz proteica circundando essas estruturas, o que resulta em espaços vagos durante o processo de secagem da semente, a partir dos espaços onde antes era ocupado pela água, durante o desenvolvimento da semente (Paes, 2006). Estes espaços podem ser inteiramente ocupados por massas de hifas, como foi observado em P3 e P4, para ambas as espécies, apenas esperando por condições favoráveis para se desenvolverem, além de serem responsáveis pelos danos às sementes. Por outro lado, no endosperma vítreo, a matriz proteica é densa, com corpos proteicos estruturados, que circundam os grânulos de amido de formato poligonal, não permitindo espaços entre estas estruturas. Nestas condições observaram-se hifas bem aderidas aos grânulos, deformando-os e se desenvolvendo entre os corpos proteicos. O mesmo foi observado por Botelho (2011), em cujo trabalho as estruturas internas das sementes de soja sofreram alterações em suas paredes celulares à medida que ocorreu aumento no nível de infecção de *S. sclerotiorum*.

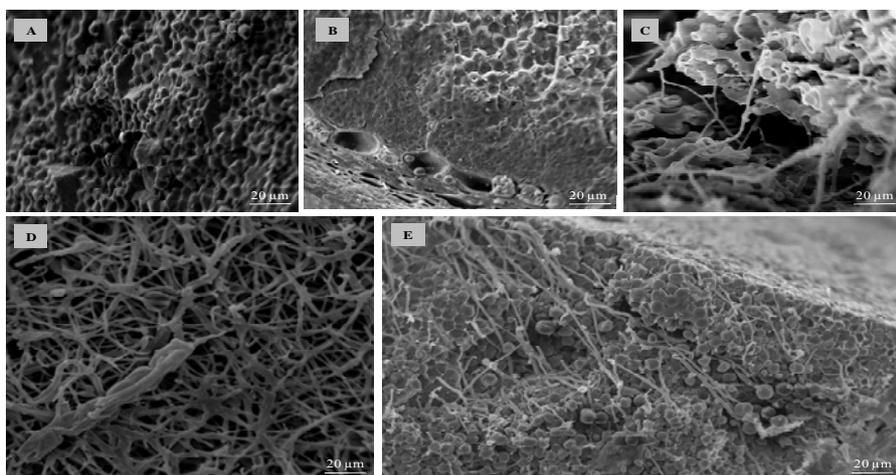


Figura 6. Eletromicrografias de varredura de partes internas de sementes de milho inoculadas com *Stenocarpella maydis* com os diferentes potenciais de inóculo: A- controle (semente sem fungo); B- P1(24h); C- P2 (48h); D- P3 (72h) e E- P4 (96h).

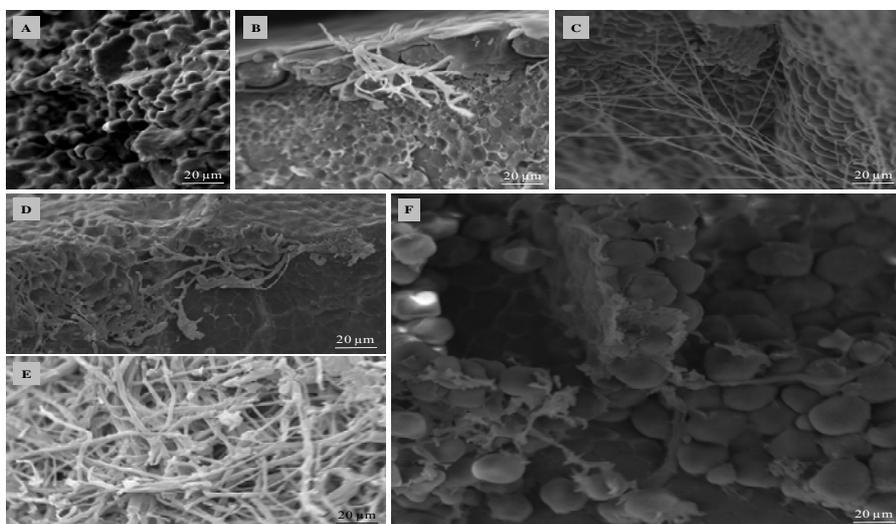


Figura 7. Eletromicrografias de varredura de partes internas de sementes de milho inoculadas com *Stenocarpella macrospora* com os diferentes potenciais de inóculo: A- controle (semente sem fungo); B e C- P1(24h); D- P2 (48h); E- P3 (72h) e F- P4 (96h).

S. maydis e *S. macrospora* foram capazes de iniciar o processo de infecção e se desenvolver nas sementes de milho a partir de qualquer potencial de inóculo, pelo que foi observado neste estudo, pois, em todos os potenciais, foram encontradas estruturas do fungo na forma dormente e que, provavelmente, com disponibilidade necessária de água, nutrientes, temperatura, etc., culminarão no desenvolvimento de doenças, levando, muitas vezes, à morte de sementes/plântulas, o que ocorre facilmente nos potenciais de inóculo mais altos.

CONCLUSÕES

O protocolo utilizado para a produção de protoplastos e incorporação de genes codificadores das proteínas GFP e DsRed em *S. maydis* é eficiente também para a transformação de *S. macrospora* e considerado satisfatório para estudos em patologia de sementes.

As sementes inoculadas com isolados das espécies de *Stenocarpella* transformados geneticamente elucidaram por meio das intensidades de fluorescência emitidas, os variados níveis de infecção e colonização encontrados em diferentes potenciais de inóculo.

As análises em MEV realizadas, nas sementes de milho inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*, foram eficazes para demonstrar os danos causados nos tecidos das sementes pela infecção e colonização das mesmas, sendo os danos mais agravantes observados nos potenciais de inóculo mais elevados.

REFERÊNCIAS

BOTELHO, L. S. Relações de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de soja: detecção e transmissibilidade de patógeno. 187p. Lavras, Minas Gerais, 2011 (Tese de Doutorado em Fitopatologia- UFLA).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. *Manual de Análise Sanitária de Sementes*. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.

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, set./out. 2006.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein a marker for gene expression. *Science*, New York, v. 263, n. 5148, p. 802-805, Feb. 1994.

CORMACK, B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, Oxford, v. 1, n. 4, p. 406-410, Aug. 1998.

CUTLER, H. G.; CRUMLEY, F. G.; COX, R. H.; COLE, R. J.; DORNER, J. W.; LATTERELL, F. M.; ROSSI, A. E. Diplodiol : a new toxin from *Diplodia macrospora*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, n. 1, p 135-138, Jan. 1980.

DU, W.; HUANG, Z.; FLAHERTY, J. E.; WELLS, K.; PAYNE, G. A. Green fluorescent protein as a reporter to monitor gene expression and food colonization by *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 3, p. 834-836, Mar. 1999.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for seed testing. *Seed Science & Technology*, Zurich, v. 4, n. 1, p. 1-180, 1976.

JOSÉ, S.C.B.R.; VON PINHO, E.V.R.; VON PINHO, R.G.; RAMALHO, M.A.P.; FILHO, J.L.S.. Características físicas do pericarpo de sementes de milho associadas com a tolerância à alta temperatura de secagem. *Revista Brasileira de Sementes*, vol. 27, nº 1, p.125-131, 2005.

LORANG, J. M.; TOURI, R. P.; MARTINEZ, J. P.; SAWYER, T. L.; REDMAN, R. S.; ROLLINS, J. A.; WOLPERT, T. J.; JOHNSON, K. B.; RODRIGUEZ, R. J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, May 2001.

- MACHADO, J. C.; CARVALHO, J. C. B.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. *Proceedings...* Angers: ISTA, 2001. p. 62.
- MAIER, F. J.; MALZ, S.; LOSH, A. P.; LACOUR, T.; SCHAFER, W. Development of a highly efficient gene targeting system for *Fusarium graminearum* using the disruption of a polyketide synthase gene as a visible marker. *FEMS Yeast Research*, Amsterdam, v. 5, n. 6/7, p. 653-662, Nov. 2005.
- MAOR, R.; PUYESKY, B. A.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycology Research*, New York, v. 102, n. 4, p. 491-496, Apr. 1998.
- MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; BROMMONSCHEKEL, S. H. Obtenção de protoplastos de *Botryosphaeria* sp. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 12, n. 4, p. 23-32, out./dez. 2006.
- MARCHI, C. E.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; QUEIROZ, M. V. de; MIZUBUTI, E. S. G. Isolation and regeneration of *Magnaporthe grisea* protoplasts. *Summa Phytopathologica*, Saint Paul, v. 32, n. 3, p. 232-238, June 2005.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal*, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan. 1995.
- PAES, M.C.D. *Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular técnica, 75).
- PEBERDY, J. F.; BUCKLEY, C. E.; DALTRY, D. C.; MOORE, P. M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, Cambridge, v. 67, n. 1, p. 23-26, 1976.
- PINTO, N. F. J. A. *Grãos ardidos em milho*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2005. 14 p. (Circular técnica, 66).
- 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*, Santa Maria, v35, n.5, p.1003-1009, set-out, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SEH, M. L.; KENERLEY, C. M. Protoplasts isolation and regeneration and nuclear staining of mycoparasitic *Gliocladium* species. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 121-130, Sept. 1988.

SILVA, A. P. de; BOLTON, M. D.; NELSON, B. D. Transformation of *Sclerotinia sclerotiorum* with the green fluorescent protein gene and fluorescence of hyphae in four inoculated hosts. *Plant Pathology*, Honolulu, v. 58, n. 3, p. 487-496, June 2009.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. *Annual Review Biochemistry*, Oxford, v. 67, n. 4, p. 509-544, Aug. 1998.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando-se que o cultivo do milho no Brasil ainda tem a sua produtividade média abaixo de outros países produtores, entre os fatores que contribuem para essa condição, estão as doenças causadas por *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, que podem ser transmitidas por sementes.

Neste estudo, o propósito foi avaliar o grau de associação de ambas as espécies de *Stenocarpella* com sementes de milho, sendo os alvos específicos verificar a transmissibilidade destes fungos por sementes de milho e dimensionar os efeitos que eles exercem a partir das sementes, tendo como referenciais, diferentes potenciais de inóculo, dois genótipos de milho, dois isolados de cada espécie e duas temperaturas de cultivo. Um alvo paralelo foi a transformação genética de isolados dos dois fungos, utilizando-se a expressão das proteínas fluorescentes, GFP e DsRed, com o objetivo de se conhecer, com mais evidência, o tipo de colonização de sementes pelos dois patógenos.

As aplicações dos resultados destes estudos são de grande relevância para os programas de controle de qualidade sanitária de sementes de milho no Brasil, tendo em vista que a espécie *S. maydis* tem sido categorizada como uma das pragas não quarentenárias regulamentadas e, nesta condição, é um dos organismos sujeitos à padronização pelos programas de certificação no país. O entendimento das relações entre os referidos patógenos e sementes de milho é, portanto, de grande significado para que maiores produtividades sejam alcançadas pelos produtores desta cultura e, por meio do uso de sementes sadias, períodos mais prolongados de sustentabilidade desses cultivos sejam assegurados.

Os resultados deste trabalho, contidos nos artigos 2 e 3, deixam claro que as duas espécies de *Stenocarpella* patogênicas ao milho são transmitidas de sementes para as plântulas/plantas de milho em níveis variados e preocupantes,

com variações em função dos potenciais de inóculo desses patógenos, genótipos do milho e desses organismos, temperatura do ambiente de cultivo inicial, que foram as variáveis selecionadas para conduzir este tipo de avaliação.

Para a cultivar considerada mais suscetível às espécies de *Stenocarpella* em foco, no potencial de inóculo mais elevado e na temperatura mais favorável para o desenvolvimento das doenças, as taxas de transmissão dos patógenos atingiram níveis de 93% para *S. maydis* e 84% para *S. macrospora*. Para algumas circunstâncias de cultivo adotadas neste estudo, infecções assintomáticas para ambos os patógenos foram observadas e isso constitui mais um motivo de grandes preocupações, principalmente em relação a esquemas de inspeções sanitárias em campos de produção e em atividades de controle de qualidade das sementes em pós-colheita.

Os ensaios conduzidos para avaliar os efeitos dos patógenos em questão, a partir de sua interação com as sementes de milho, alvo do artigo 4, evidenciaram que estes patógenos podem causar danos severos ao milho, não só na fase final de cultivos, conforme tem sido relatado em literatura, como também na fase inicial, ocasião em que são responsáveis por mortes de sementes/plântulas em pré-emergência, diminuição de estandes e redução do vigor das plantas emergidas. A exemplo do que se avaliou para o cálculo das taxas de transmissão desses patógenos, observou-se que os efeitos danosos desses organismos a partir de sua interação com as sementes podem variar de acordo com o potencial de inóculo dos mesmos, além da natureza do material de milho e da temperatura de cultivo inicial, mantendo-se favoráveis como fatores que também podem interferir neste tipo de relação biológica. Em geral, os efeitos nocivos ao milho foram progressivos com o aumento do potencial de inóculo nas sementes. De modo geral, *S. maydis* foi mais agressiva do que *S. macrospora*, durante o período de avaliação estabelecido neste estudo.

Finalmente é importante destacar o grande potencial da técnica de marcadores genéticos expressando proteínas fluorescentes, utilizada neste estudo, tendo o intuito de comparar os tipos e as intensidades de colonização das espécies de *Stenocarpella* em sementes de milho. Por meio de um protocolo adaptado para estes patossistemas, foi possível transformar, com sucesso, isolados de ambas as espécies e acompanhar a presença do inóculo desses fungos nos tecidos das sementes infectadas artificialmente. De posse desses isolados, os estudos podem ser continuados, com o objetivo de conhecer o modelo de colonização dos tecidos das sementes e das plantas emergentes, tornando-se, assim, possível entender e caracterizar com mais segurança o padrão de acesso do inóculo infectivo a partir das sementes.