

VARIABILIDADE, DANOS E DETECÇÃO DE
Stenocarpella maydis e *Stenocarpella macrospora* **EM**
SEMENTES DE MILHO

MARCOS AUGUSTO DE FREITAS

2006

MARCOS AUGUSTO DE FREITAS

VARIABILIDADE, DANOS E DETECÇÃO DE
Stenocarpella maydis e *Stenocarpella macrospora* **EM**
SEMENTES DE MILHO

**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
Prof. Dr. José da Cruz Machado
UFLA

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Freitas, Marcos Augusto de
Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella
macrospora* em sementes de milho / Marcos Augusto de Freitas. -- Lavras :
UFLA, 2006.
164p. : il.

Orientador: José da Cruz Machado
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Efeito de *S. macrospora* e *S. maydis*. 2. Podridão do colmo. 3. Espiga de
milho. 4. Região ITS. 5. Gene da β -tubulina. 6. Espectrometria de massa. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1594

MARCOS AUGUSTO DE FREITAS

**VARIABILIDADE, DANOS E DETECÇÃO DE
Stenocarpella maydis e *Stenocarpella macrospora* EM
SEMENTES DE MILHO**

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 24 de fevereiro de 2006.

Profª. Dra. Maria da Graça G. Carvalho (Universidade Federal de Lavras)

Dr. Alan Carvalho Andrade (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

Prof. Dr. Mário Lúcio V. Resende (Universidade Federal de Lavras)

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza (Universidade Federal de Lavras)

Prof. Dr. José da Cruz Machado
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A meu querido filho, Daniel, por ser razão de minha motivação e perseverança.

Dedico

A meus pais, Zilda e Leonel e Meus queridos tios, Neuza e Luiz, pelo incentivo e pelo amor incondicional e por serem exemplos de caráter, honestez, ética e honestidade...Que felizmente consegui assimilar.

A meus irmãos Marcelo, Marcílio, Marcília e Márcio, pelo apoio.

A minha avó Delminda (D. Dudu), pelo carinho e dedicação...

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela oportunidade e pela bolsa de estudos.

Ao Professor José da Cruz Machado, pela oportunidade e pela orientação.

Ao Pesquisador Dr. Alan Carvalho Andrade (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), pela amizade, pelos ensinamentos e por me motivar a seguir sempre em frente.

Aos pesquisadores Dr. Luiz Carlos Bhering Nasser, Dr. Adalberto Correa Café Filho (UnB) e João Luiz Gilioli (Genética Tropical), pela amizade e por terem participado na construção de minha vida profissional.

Ao Pesquisador Dr. Antônio Carlos Gomes (Embrapa Cerrados), pela amizade e ensinamentos em Estatística.

Aos professores da UFLA: Daniel Ferreira, Édila, Renato, João Almir, Laene, Ricardo Magela, Edson Pozza, Ludwig, Luiz Edson e Mário Lúcio.

Aos pesquisadores Dra. Sarah Chalfon, Dr. Ivan Resende (Monsanto), Marcelo Dressler (Embrapa Milho e Sorgo) e Cláudio Manoel (Cotton Tecnologia de Sementes Ltda) por cooperarem no desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Íris Santiago Costa, Coordenação de Desenvolvimento Institucional – CAPES, pelo apoio em alguns momentos de minha vida.

Aos funcionários Ângela (LPS), Cláudio (EPAMIG), Sidney, Carzinho, Rodrigo, Ruth, D. Elza, D. Dalva, Gabriela, Vânia Natal (BC) e Eveline (DAE), pela amizade e presteza na execução deste trabalho.

Aos estagiários do LPS, Walquíria, Adelávio, Adriano, Juliana, Ana Paula, Carla, Johnny, Rodrigo e Galeno, pela ajuda durante os apertos na execução deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Fábio Rossi, Frederico, Cristiano, Patrícia Baston, Patrícia, Ricardo, Anderson, Flávio, Edin, Zuleide, Fernando, Ênia e Djânia.

Aos amigos Marcelo Viola, Leo Braw, Rodrigo (Piu) e Reinaldo Freitas (Mestre), Ronaldo, Ana Angélica A. Barbosa, João (do Xerox), Nilza (Nilzets), Ellen Noly, Florisvalda Santos, Gilma Rios e Gislaine (Gi), por participarem de alguns bons/maus momentos de minha vida.

Aos colegas da EMBRAPA/Recurso Genéticos e Biotecnologia, Dra. Maura, George, Felipe, Kelly, Éder e Natália.

E a todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1 Características morfológicas e taxonômicas de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Stenocarpella macrospora</i>	5
2.2 Histórico e relações patogênicas de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Stenocarpella macrospora</i> em milho	6
2.3 Importância econômica das doenças causadas pelo complexo <i>Stenocarpella</i> em milho	8
2.4 Aspectos epidemiológicos	9
2.5 Uso de marcadores morfológicos e moleculares na análise da variabilidade de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Stenocarpella macrospora</i>	10
2.6 Detecção de fitopatógenos em sementes de milho	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 2.....	28
AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Stenocarpella macrospora</i> E DE <i>Stenocarpella maydis</i> INOCULADOS EM SEMENTES DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.)	28
1 RESUMO.....	29
2 ABSTRACT	30
3 INTRODUÇÃO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Origem dos isolados utilizados	33
4.2 Determinação do perfil sanitário e fisiológico das amostras de sementes utilizadas	34
4.3 Inoculação das sementes	34
4.4 Avaliações da qualidade das sementes após a inoculação	36
4.5 Análise dos dados	38

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Ocorrência e efeito dos isolados de <i>Stenocarpella macrospora</i> em sementes de milho inoculadas via restrição hídrica.....	39
5.2 Efeito de <i>Stenocarpella macrospora</i> em sementes de dois híbridos de milho pelo teste de ‘emergência em solo/areia’	44
5.3 Ocorrência e efeito dos isolados de <i>Stenocarpella maydis</i> em sementes de milho inoculadas via restrição hídrica	51
5.4 Efeito de <i>Stenocarpella maydis</i> em sementes de dois híbridos de milho avaliados pelo método de ‘emergência em solo/areia’	56
6 CONCLUSÕES	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
CAPÍTULO 3.....	67
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Stenocarpella macrospora</i> (Earle) Sutton e <i>Stenocarpella maydis</i> (Berk) Sutton)	
.....	67
1 RESUMO.....	68
2 ABSTRACT	69
3 INTRODUÇÃO.....	70
4 MATERIAL E MÉTODOS	74
4.1 Caracterização morfológica de <i>Stenocarpella macrospora</i> e <i>Stenocarpella Maydis</i>	75
4.2 Multiplicação dos isolados de <i>Stenocarpella macrospora</i> e <i>Stenocarpella maydis</i>	76
4.3 Extração do DNA genômico	77
4.4 Amplificação do DNA genômico	78
4.5 Reação de seqüenciamento das regiões amplificadas	79
4.6 Análise das seqüências.....	80
4.7 Análise estatística dos dados.....	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1 Caracterização cultural e morfológica de <i>Stenocarpella macrospora</i> e <i>Stenocarpella maydis</i>	82
5.2 Caracterização Molecular de <i>Stenocarpella macrospora</i> e <i>Stenocarpella maydis</i>	98
5.2.1 Amplificação da região ITS e β -tubulina.....	98
5.2.2 Qualidade do seqüenciamento	98

5.2.3	Análise das seqüências obtidas com <i>primers</i> ITS.....	98	
5.2.4	Análise das seqüências obtidas com <i>primers</i> β -tubulina	105	
5.2.5	Considerações sobre a caracterização molecular	106	
6	CONCLUSÕES	111	
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112	
CAPÍTULO 4.....117			
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO DE <i>Stenocarpella</i> <i>macrospora</i> (Earle) Sutton e <i>Stenocarpella maydis</i> (Berk.) Sutton EM SEMENTES DE MILHO, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA			117
1	RESUMO.....	118	
2	ABSTRACT	119	
3	INTRODUÇÃO	120	
4	MATERIAL E MÉTODOS	123	
4.1	Análise em HPLC	123	
4.2	Análise por espectrômetria de massa.....	124	
4.3	Análise dos espectros de massa	126	
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127	
5.1	Análise dos resultados obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	127	
5.2	Resultados do teste de sanidade de sementes	132	
5.3	Análise dos resultados obtidos por espectrometria de massa	135	
6	CONCLUSÕES	154	
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155	
ANEXOS			158

RESUMO

FREITAS, Marcos Augusto de. **Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho.** 2006. 165p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A podridão do colmo e a podridão espigas do milho (*Zea mays* L.) causadas pelos fungos *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *Diplodia macrospora* Earle in Bull.] e *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. Zeae* (Schw.) Lev.] são de ocorrência ampla, abrangendo toda a região de plantio dessa cultura, principalmente nas regiões quentes e úmidas. Esses fitopatógenos afetam a germinação das sementes, causam colapso prematuramente das plantas infectadas na fase reprodutiva e paralisam o processo normal de enchimento de grãos, com conseqüente queda da produtividade. A presença desses fungos nos grãos de milho reduz a qualidade nutricional das rações, além de poduzirem micotoxinas. Normalmente são necessários quatorze dias para detecção desses fungos, nos testes de sanidade com incubação direta da semente de milho. Neste sentido, os objetivos desta pesquisa foram: avaliar, em maiores detalhes, as relações do complexo *Stenocarpella* em associação com as sementes de milho; caracterizar por meio de técnicas moleculares os fungos *S. macrospora* e *S. maydis* e verificar a possibilidade do uso de marcadores moleculares e proteômicos como parte de testes diagnósticos destes fungos em sementes. Observou-se o efeito de cinco isolados de *S. macrospora* sobre os híbridos de milho DKB-212 e DKB-333-B e o efeito dos cinco isolados de *S. maydis* sobre os híbridos de milho DKB-214 e DKB-333-B, inoculados em sementes. Observou-se que todos os isolados de *S. macrospora* aumentaram o índice de severidade de doença (ISD) e afetaram a

germinação, a emergência de plântulas, o índice de velocidade de emergência (IVE), a sobrevivência de plântulas e o peso de matéria seca da parte aérea (PMSA) e de raiz (PMSR). Todos os isolados de *S. maydis*, exceto um (May-43), proporcionaram o aumento do ISD das sementes dos híbridos DKB-214 e DKB-333-B inoculados, e afetaram negativamente a germinação, a sobrevivência de plântulas, o PMSA e o PMSR do híbrido DKB-333-B. Para as sementes do híbrido DKB-214, apenas dois isolados (May-57 e May-74) afetaram negativamente essas variáveis. A caracterização morfológica dos isolados de *S. macrospora* e de *S. maydis* foi determinada através do crescimento miceliano, o número de picnídios/cm² em meio BDA, OA, EMA, CZA (meio Czapek), em dois regimes de temperatura, a 20°C e a 25°C. A caracterização molecular dos isolados de *S. macrospora* e de *S. maydis* foi realizada por meio do seqüenciamento dos produtos de PCR obtidos com oligonucleotídeos desenhados para a região ITS do rDNA e para o gene da β -tubulina. Ambos os métodos foram eficientes na diferenciação dos isolados de *S. macrospora* e de *S. maydis*. Entretanto, não foi possível distinguir, com consistência, a origem geográfica dos isolados, a partir das análises de caracterização morfológica e molecular dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*. Os produtos da digestão trípica do extrato de proteína total obtidos de culturas puras de *Drechslera maydis*, *S. maydis*, *S. macrospora*, *F. verticillioides* e de sementes de milho inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*, pela técnica de restrição hídrica (RH) por 72 horas foram analisadas por RP-HPLC. A análise em espectrômetro de massa Q-TOF foi realizada com os produtos da digestão trípica do extrato protéico total de sementes de milho não inoculadas, das sementes inoculadas com *S. maydis* e com *S. macrospora*, pela técnica de restrição hídrica e o extrato miceliano de culturas puras de *S. maydis*, *S. macrospora* e *F. verticillioides*. Os dados obtidos por RP-HPLC revelaram diferenças nos perfis cromatográficos de culturas puras de ambos fungos, no

tempo de retenção de 25 minutos. Entretanto, diferenças marcantes nos perfis cromatográficos obtidos de sementes inoculadas com os dois fitopatógenos, não foram identificadas por essa técnica. A análise discriminante realizada com base nos espectros MS, dos intervalos de 20 a 30 minutos e 50 a 60 minutos, obtidos das diferentes amostras estudadas revelaram que os fungos *S. maydis* e *S. macrospora* podem ser detectados diferencialmente em sementes de milho e também possibilitaram a distinção das diferentes espécies fúngicas analisadas. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho, indicam que existe grande potencial de utilização da espectrometria de massa no desenvolvimento de novos métodos de detecção de fitopatógenos em sementes.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

ABSTRACT

FREITAS, Marcos Augusto de. *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* Sutton variability, damage and detection in corn seed. 2006. 165p. Thesis (Doctor in Agronomy. Phytopathology)-Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The white ear rot disease of maize (*Zea mays* L.) caused by *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle in Bull.] and *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. Zeae* (Schw.) Lev.], is widely distributed in the hot and wet tropical regions occurring in areas where the crop is cultivated. Those pathogens are responsible by damages to seeds killing infected plants in flowering stage and causing significant losses in yield and affecting quality of grains. *Stenocarpella* species are also important microorganisms responsible for the production of mycotoxins. “*Diplodiosis*” is associated with the feeding of grain colonized by *Stenocarpella* species in poultry, lambs, and ruminants. The seed health testing, which includes incubation of seed, for detection of *S. maydis* and *S. macrospora*, normally requires fourteen days for getting the result, which is considered an excessive period of time. The objective this research was: to evaluate in details the relationship of *Stenocarpella* complex in maize seeds, to characterize *S. macrospora* and *S. maydis* and to verify the possibility of use proteomics markers to detect these fungi. In addition, the opportunity was taken to compare the effects of five isolates of *S. macrospora* in maize seeds, breeding lines DKB-212 and DKB-333-B, as well as the effects of five isolates of *S. maydis* in maize seeds, lines DKB-214 and DKB-333-B. All isolates of *S. macrospora* were able to increase the rate of disease severity and to affect seed germination, seedling

emergence rate (vigor), plant population, seedling survival, weight of dry matter of the aerial part and of the roots. All isolates of *S. maydis*, except one (May-43), were able to increase the rate of disease severity of the hybrids DKB-214 and DKB-333-B, and to affect the seed germination, seedling emergence rate (vigor), plant population and seedling survival, weight of dry matter of the aerial part and of the roots of the breeding line DKB-333-B. For the line DKB-214, only two isolates affected negatively those variables. The mycelial growth was measured in Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA), oat-agar (OA), corn extract, and Czapek medium in two temperatures, 20 °C and 25 °C. Evaluation was also made for number of pycnidia/cm² and morphological characteristics of the conidia and pycnidia. The molecular characterization of *S. macrospora* and the *S. maydis* isolates was performed by PCR products obtained with primers for rDNA ITS region and for the β -tubulin gene. Both methods were efficient for differentiation of *S. macrospora* and *S. maydis* isolates. The results showed that no correlation was found between isolates of *S. macrospora* and *S. maydis* and their geographical origins as detected by morphological and molecular traits. Trypsin digestion products of total protein fractions obtained from pure cultures of *S. maydis*, *S. macrospora*, *F. verticillioides*, *Drechslera maydis* and maize seeds inoculated with *S. maydis* and *S. macrospora* with incubation for 72 hours, was analysed by RP-HPLC. For analysis by Q-TOF mass spectrometry (MS) a tryptic digestion products of total protein fraction obtained from control maize seeds and seeds inoculated with *S. maydis* and with *S. macrospora* and from mycelial extract of pure cultures of *S. maydis*, *S. macrospora* and *F. verticillioides*. The chromatography profiles from RP-HPLC of *S. maydis* and *S. macrospora* showed differences in 25 minutes of retention time. However, no differences could be detected between the RP-HPLC chromatograms of non inoculated and inoculated maize seeds with *S. macrospora* and *S. maydis*. Results of MS profiling at CapLC fractions collected

at intervals of 20-30 and 50-60 minutes, showed that *S. maydis* and *S. macrospora* can be differentially detected in maize seeds and this methodology is also able to differentiate the fungal species used in this study. Data obtained in this study indicate a great potential for mass spectrometry use in the development of new methods for seed-pathogen detection.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CAPÍTULO 1

VARIABILIDADE, DANOS E DETECÇÃO DE *Stenocarpella maydis* E *Stenocarpella macrospora* EM SEMENTES DE MILHO

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as principais espécies vegetais utilizadas na alimentação humana e animal, destaca-se o milho (*Zea mays* L.). São cultivados cerca de 140 milhões de hectares, distribuídos em 158 países, que contribuem anualmente com uma produção de, aproximadamente, 600 milhões de toneladas (Fancelli & Dourado-Neto, 2001, USDA, 2006). O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor, responsável por 9,90% da produção mundial e apresenta produtividade média de 3.050 kg/ha, sendo esta muito baixa em relação aos 8.160 kg/ha, obtidos pelos EUA (IBGE, 2006; USDA, 2006).

O estado de Minas Gerais destaca-se como o segundo maior produtor brasileiro e é responsável por 14,3% da produção nacional. Na safra 2003/04 apresentou uma produtividade média de 3.281 kg/ha, considerada baixa em relação à média de outros estados (IBGE, 2006).

Apesar do elevado potencial produtivo, o milho apresenta acentuada sensibilidade a estresses de natureza abiótica, tais como fertilidade do solo e condições climáticas. Além práticas das culturais, época de semeadura, população de plantas e ocorrência de pragas e doenças são outros fatores determinantes na produtividade dessa cultura. Dessa forma, o cultivo do milho, necessita ser rigorosamente planejado e criteriosamente manejado, a fim de manifestar todo seu potencial produtivo (Jugenheimer, 1976; Ullstrup, 1977; Andrade, 1995).

A cultura do milho é afetada por um grande número de agentes fitopatogênicos em praticamente todos os locais onde se cultiva esse cereal. No Brasil, dentre os principais agentes causais da podridão do colmo e espigas do milho destacam-se: *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton, *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton, *Fusarium graminearum* (Schwabe), *F. moniliforme* J.

Sheld, *F. subglutinans* (Wollenweb & Reinking) P.E. Nelson, T.A. Toussoun and Marasas e *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W.Wils. (Luz, 1995; Reis & Casa, 1996 e 2000; Casa et al., 2000). A ocorrência desses patógenos causa a morte prematura da planta de milho, no final do ciclo da cultura, o que resulta na paralisação do processo normal de enchimento de grãos e conseqüente redução no peso de espigas. Além disso, redução na produção e na qualidade dos grãos, são outras conseqüências da ocorrência desses patógenos, devido ao contato das espigas com o solo, provocado pelo acamamento das plantas (Ullstrup, 1977; Reis & Casa, 2001). Micotoxinas produzidas por *S. macrospora* e *S. maydis* (Latterell & Rossi, 1983; Munkvold & Desjardins, 1997; Reid & Sinha, 1998; Danielsen & Jensen, 1998; Odrizola et al., 2005) também afetam a qualidade das rações produzidas com esse produto.

As informações sobre as estimativas de perdas na cultura do milho, devido a esses fitopatógenos, no Brasil, são escassas. Nazareno (1989) relatou perdas de 26,4% no rendimento de grãos, ocasionadas por fungos causadores de podridões do colmo de milho, no estado do Paraná. Freitas et al.(2003) constatou redução de até 55,07% em lavouras comerciais de milho, no sul do estado de Minas Gerais, ocasionadas pela podridão do colmo e espigas, causadas por *S. macrospora* e *S. maydis*. A ocorrência e a severidade das podridões do colmo e espigas são maiores em lavouras conduzidas em plantio direto, sob intensa precipitação pluvial (Latterell & Rossi, 1983, Flett & Wehner, 1991; Flatt et al., 1998; Reis & Casa, 2000).

As sementes, o insumo mais importante para a implantação de uma lavoura, possuem grande capacidade de manter viáveis as estruturas de muitos fitopatógenos, por longos períodos. Desta forma, a adoção rotineira de análises de sanidade e a definição de padrões de tolerância para os patógenos veiculados por sementes, são de fundamental importância para os programas de produção

de sementes certificadas (Neergaard, 1979a; Machado, 1994; Cockerell, 1997; Pinto, 1998).

A definição do índice de tolerância para *S. macrospora* e *S. maydis* em sementes de milho tem sido questionada, por não se ter conhecimento da viabilidade desses fungos na fase de armazenamento e não existir, na literatura, dados concisos sobre a transmissão desses fitopatógenos pelas sementes, embora a sua associação com as sementes de milho tenha sido amplamente relatada (Neergard, 1979b; Machado, 1988; Rheeder et al., 1990; Luz, 1995). Além disso, a inexistência de testes rápidos para a detecção de *S. macrospora* e *S. maydis* e a falta de estudos relacionados à distribuição geográfica e variabilidade genética desses patógenos, nas áreas produtoras de milho, justificam a prioridade de pesquisas com essas duas espécies de fungos fitopatogênicos.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar por meio de técnicas moleculares os fungos *S. macrospora* e *S. maydis*; avaliar em maiores detalhes as relações do complexo *Stenocarpella*, em associação com as sementes de milho e; verificar o potencial de utilização de marcadores moleculares e proteômicos, em testes de detecção destes fungos associados à sementes de milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características morfológicas e taxonômicas de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*

Os agentes causadores da podridão do colmo e espigas de milho, *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. Zeae* (Schw.) Lev.] e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle in Bull.], são fungos que pertencem ao phylum Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Dothideales, à família Botryosphaeriaceae e ao gênero Botryosphaeria (Denman et al., 2000; Burgess et al., 2001 e 2003; Van Niekerk et al., 2004), embora a fase sexuada ainda não tenha sido relatada para nenhuma das espécies de *Stenocarpella*.

S. macrospora e *S. maydis* apresentam picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados, com coloração marrom-escuro a preta, paredes grossas, diâmetro de 150 a 300 µm e um ostíolo protuberante papilado. Os conidióforos são usualmente ausentes. Apresentam células conidiogências enteroblásticas, fialídicas, cilíndricas, variando de 10 a 20 x 2 a 3 µm, formadas nas células internas da parede do picnídio. Os conídios são pardo-oliva a pardos, cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, medindo 15 a 34 x 5 a 8 µm, bicelulados, comumente com 1 septo (Sutton & Waterston, 1966; Sutton, 1980).

A distinção morfológica das duas espécies se baseia no tamanho dos conídios, sendo que, os conídios de *S. macrospora* (44-82 x 7,5-11,5 µm, com 1 a 3 septos) são de 2 a 3 vezes maiores que os conídios de *S. maydis* (Sutton & Waterston, 1966; Sutton, 1980).

2.2 Histórico e relações patogênicas de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em milho

O fungo *S. maydis* foi descrito pela primeira vez, em 1884, como *Diplodia maydis*, nos Estados Unidos (Saccardo, 1944). Desde então, foi relatado em todas as regiões produtoras de milho (Sutton & Waterston, 1966; Farr *et al.*, 1989).

Nos Estados Unidos, especialmente no estado da Flórida, Eddins (1930) analisou 618 amostras de plantas de milho e constatou a presença de *S. maydis*, *S. macrospora* e *Diplodia frumenti* em 80,3%, 16,5% e 3,2% das amostras, respectivamente. Em 1959, no estado de Illinois, Hooker & White (1976) relataram a ocorrência de *S. maydis* em 86,3% dos campos avaliados. Entretanto, em 1975, esse fitopatógeno foi encontrado em apenas 5,0% das lavouras.

Historicamente, nos Estados Unidos, a podridão do colmo e espigas do milho causada por *S. maydis* foi uma importante doença até 1960, tornou-se rara nos anos seguintes, até o início de 1970, (Wilcoxson, 1962; Hooker & White, 1976). Esses autores atribuíram esse declínio à especificidade desse fungo ao hospedeiro, à introdução de cultivares híbridas tolerantes e ao sistema norte americano produção de sementes.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de podridão em sementes, causada pelo fungo *S. macrospora*, foi realizado por Johann (1935), no estado de São Paulo. Apesar da existência de trabalhos relacionados a *S. maydis* e *S. macrospora* na literatura nacional, a prova de patogenicidade e a mensuração das estruturas reprodutivas, somente foi realizada em 1997, por Casa, ao estudar o efeito da associação desses dois fitopatógenos às sementes de milho.

Machado *et al.* (2001) foram os primeiros a demonstrar a infectividade de *S. maydis* em sementes de milho, utilizando a técnica do condicionamento osmótico ou restrição hídrica. Em outro trabalho, Carvalho *et al.* (2004) também

verificaram a patogenicidade deste fungo em sementes de milho, inoculadas artificialmente.

As podridões do colmo e espigas de milho, causadas pelo complexo *Stenocarpella*, são consideradas as doenças mais importantes dessa cultura. A ocorrência é variada e dependente das precipitações pluviométricas e da temperatura. Além disso, ocorre em todas as regiões de cultivo, devido à eficiente transmissão desse patógeno pelas sementes e por ocorrer nas regiões produtoras de sementes.

Estudos detalhados sobre a transmissão, da semente para a plântula, são fundamentais para o estabelecimento de padrões de tolerância para sementes de milho e as informações na literatura são escassas. Sabe-se, entretanto, que *S. macrospora* e *S. maydis* podem ser veiculados pela semente, além de serem transmitidos à plântula (McGee, 1988; Casa, 1977, Carvalho, 2001).

Os resultados dos testes de detecção em grãos e sementes de milho, revelam maior frequência na incidência de *S. maydis* (Oliveira & Mello, 1986; Reis et al., 1995). Contudo, é possível que esteja havendo confusão na identificação das duas espécies, onde *S. macrospora* está presente e é detectada como *S. maydis*. O método de detecção disponível, para ambas espécies, baseia-se na comparação da cor, entre as colônias de *S. macrospora* e as de *S. maydis* desenvolvidas sobre papel de filtro, dispostas em caixas gerbox (Mario & Reis, 2001). A diferenciação desses dois fitopatógenos, com base em características fenotípicas, conforme descrito por esses autores, pode resultar em erros de identificação dos patógenos, em testes de rotina, devido à variabilidade fenotípica dos isolados. Além disso, o tempo de 15 dias para se obter o resultado deste teste de sanidade é muito longo.

Além das dificuldades mencionadas, a disponibilidade de informações a respeito da variabilidade genética desses fitopatógenos é praticamente

inexistente no Brasil, o que pode representar um grande empecilho para os programas de melhoramento de milho, no país.

2.3 Importância econômica das doenças causadas pelo complexo *Stenocarpella* em milho

A podridão do colmo, causada tanto por *S. macrospora* quanto por *S. maydis*, interfere no desenvolvimento normal da planta, fragiliza a base do colmo, ocasionando acamamento e morte prematura das plantas (Chambers, 1988; Reis & Casa, 1996; White, 1999). Isto compromete o enchimento dos grãos e a produtividade. O acamamento de plantas, além de dificultar a colheita mecânica, permite o contato direto da espiga com o solo, o que favorece a contaminação por fungos de armazenamento e compromete a qualidade dos grãos. No Brasil, segundo Reis & Casa (1996, 1999), a ocorrência desses fungos em lavouras de milho é mais freqüente na região Sul.

Nazareno (1989), ao avaliar perdas ocasionadas por podridão do colmo em milho, verificou redução de até 26,4 % na produtividade, dependendo do ano, local e cultivar híbrida utilizada.

No estado do Tocantis, Morello et al. (1994), na safra 1993/94, observaram que 15,9% das espigas de 42 cultivares híbridas de milho de ciclo normal, apresentavam sintomas de podridão. Dentre essas, 75,5% estavam infectadas por *Fusarium* sp. e 19,1% por *Stenocarpella* sp..

Nas safras 1997/98 e 1998/99, Denti (2000), estudando os efeitos da monocultura e da rotação de culturas na incidência e nos danos causados por podridão do colmo, verificou que *S. maydis* foi, em ordem de incidência, o segundo fungo isolado. Na safra 2001/02, no sul do estado de Minas Gerais, foi constatada por Freitas et al. (2003), redução de até 55,07% em lavouras

comerciais de milho, ocasionadas, principalmente, por podridão do colmo e espigas causada por *S. macrospora* e *S. maydis*.

Esses fitopatógenos, além de afetarem o valor nutricional dos grãos, podem produzir micotoxinas que alteram a qualidade final da ração e o valor econômico dos grãos. Na África do Sul, foi relatada a intoxicação de aves, ovelhas e ruminantes, alimentados por grãos colonizados por *S. maydis*, designada de diplodiose, causada por uma micotoxina ainda não identificada (Kellerman et al, 1985 e 1991; Rabie et al., 1987). Outro metabólito tóxico, também foi isolado de *S. Macrospora*, denominado de diplodiol. Esse composto contribuiu para a mortalidade de pintinhos de granja, no México, nos Estados Unidos e na América do Sul (Cutler et al., 1980a; 1980b; Odrizola et al., 2005).

Outro aspecto econômico a ser considerado é que as sementes infectadas constituem importante fonte de inóculo primário desses fitopatógenos, podendo resultar em redução significativa do estande, devido à morte das sementes ou das plântulas (Casa, 2000; Carvalho, 2001).

2.4 Aspectos epidemiológicos

Os fungos *S. macrospora* e *S. maydis* são considerados microrganismos necrotróficos e apresentam uma fase parasítica na planta e outra como saprófita nos restos culturais. Desta forma, podem facilmente ser encontrados em sementes, fora do período de cultivo, na forma de micélio (McGee, 1988; Casa 1997). Após a colheita, picnídios e conidiosporos, presentes nos colmos, palha da espiga, sabugo e grãos remanescentes, podem ser facilmente encontrados nas lavouras de milho (Smith & White, 1988; Reis & Casa, 1996).

Estudos sobre doenças de milho e sua relação com as sementes, realizados por McGee (1988), mostraram que *S. maydis* veiculado por sementes

pode ser transmitido à plântula. Esse autor concluiu que as sementes infectadas constituem importante fonte de inóculo primário.

Outra importante fonte de inóculo primário são os resíduos culturais de milho infectados, remanescentes na superfície após a colheita, tanto para as podridões do colmo quanto para as manchas foliares de diplodia (Smith & White, 1988; Shurtleff, 1992; Reis & Casa, 1996, Casa et al., 2004). Ao avaliar a influência de sistemas de cultivo nas podridões do colmo causadas por diplodia, na África do Sul, Flett et al. (1998) verificaram que a incidência de podridão de espigas e a quantidade de resíduo na superfície, apresentaram relação linear positiva.

O sistema de plantio direto favorece a sobrevivência de fungos necrotróficos, devido ao maior tempo de decomposição dos restos culturais remanescentes na superfície do solo (Costamilan et al., 1999; Casa, 2000). O fungo *S. maydis* sobrevive saprofiticamente nos restos culturais de milho por até 29 meses, colonizando os tecidos celulares e formando picnídios subepidérmicos (Sutton & Waterston, 1966; Casa, 2000). Dessa forma, os propágulos encontram-se posicionados de maneira ideal para a esporulação, liberação, dispersão e infecção das plantas de milho em lavouras subseqüentes. Isso justifica a maior incidência dessa doença em sistema de monocultura do milho (Flett & Wehner, 1991; Flett & McLaren, 1998; Casa, 2000; Casa et al., 2000).

2.5 Uso de marcadores morfológicos e moleculares na análise da variabilidade de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*

A identificação e a distinção morfológica, em exame microscópico, de *S. macrospora* e *S. maydis*, após a formação das estruturas reprodutivas, são relativamente simples (Sutton & Waterston, 1966; Sutton, 1980; Marasas & Van Der Westhizen, 1979). Após a incubação de grãos de milho infectados, em meio

BSA + antibiótico, durante 20 dias, as colônias de *S. maydis* apresentam cor salmão-escuro, com o reverso de cor bege e pardo-claro, podendo tornar-se escuro. Já as colônias de *S. macrospora* permanecem com a coloração superficial branca e o reverso da colônia de cor bege (Marasas & Van Der Westhizen, 1979). Deve-se salientar que a produção de picnídios por *S. maydis* é mais rápida e em maior quantidade, em relação à *S. macrospora* (Johann, 1935; Morant et al., 1993)

Outro método de distinção destas duas espécies foi desenvolvido por Mário & Reis (2001). A diagnose é realizada por comparação da cor das colônias dos fungos, desenvolvidas sobre o papel de filtro, 15 dias após a incubação das sementes, dispostas em caixas gerbox, contendo 3 camadas de papel umedecido com água esterilizada. As colônias de *S. maydis* são brancas, pardo-escuras a escuras, com formação de picnídios e as colônias de *S. macrospora* permanecem com a coloração branca e bege.

Em testes de sanidade de sementes, a presença de outros microrganismos associados às sementes incubadas pode apresentar maior potencial de competição nessas condições, o que prejudica a identificação e a detecção de *S. maydis* e *S. macrospora*, resultando em níveis de detecção subestimados.

Nesse contexto, as técnicas moleculares vêm se tornando ferramentas importantes para o estudo das diferenças genéticas entre os microrganismos, assim como na detecção e identificação destes no solo, nas diferentes partes da plantas e até mesmo em sementes. A utilização dessas técnicas tem grande potencial de aplicação, principalmente nos casos em que há grande semelhança entre os microrganismos, o que resulta em difícil diagnose por meio dos métodos tradicionais e também que a realização dos testes de sanidade demandam longos períodos de incubação.

O uso do método RFLP (sigla para o inglês *restriction fragment length polymorfism*) ou das técnicas mais recentes baseadas em PCR (sigla para o inglês

polimerase chain reaction) transformou radicalmente as metodologias utilizadas na análise genética de fungos (Mullis & Falloona, 1987). A técnica de RFLP foi utilizada por McDonald & Martinez (1990) para avaliar a variabilidade genética de *Mycopharella graminicola* em campos de trigo e na caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* (Edel et al., 1995). Todavia, poucas bandas polimórficas são produzidas, sendo esta técnica mais recomendada para o estudo de populações (Burges et al., 2001).

O uso da técnica RAPD (sigla para o inglês *random amplified polymorphic dna*), para a detecção molecular de patógenos, inicialmente descrita por Williams et al. (1990) passou por várias modificações e adaptações, nos últimos anos. Ultimamente, tem sido utilizados *primers* curtos, 10 pb, em RAPD-PCR e baixa temperatura, para a produção de modelos de bandas polimórficas entre indivíduos (Rafalski & Tingey, 1993; Burgess et al., 2001).

A técnica de RAPD foi utilizada na diferenciação de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* patogênicas ao algodão (Assigbetse et al., 1994), na análise genética entre espécies de *Tilletia*, um basidiomiceto, agente causador do carvão do trigo (Shi et al., 1996) e no estudo da diversidade genética e origem geográfica de populações de *Setosphaeria turcia* Leonard (Anamorph: *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard et Suggs) (Borchardt et al., 1998) e em populações de *Pyrenophora teres* Drechs. (Anamorph: *Drechslera teres* (Sacc) Shoem.) em cevada (Jonsson et al., 2000). Xia & Achar (2001), também utilizaram RAPD na diferenciação de isolados e na detecção de *S. maydis* em sementes de milho.

Nos últimos anos, os avanços nas técnicas de seqüenciamento em larga escala proporcionaram redução nos custos e muitos trabalhos têm adotado a produção de seqüências para as análises filogenéticas de patógenos de plantas e animais (Edel et al., 1995, Berbee, 2001;).

O DNA ribossomal (rDNA) é uma região do DNA nuclear codificante de ribossomos e suas seqüências têm sido muito utilizadas em estudos filogenéticos de fungos. Os ribossomos são organelas responsáveis pela síntese de proteínas nas células, e consistem de duas subunidades, uma pequena e outra grande. Um único gene codifica a subunidade pequena “*the small subunit*” (SSU), a subunidade grande – “*the large subunit*” (LSU) e a região 5.8s. O gene é interrompido pelas regiões espaçadoras internas do rDNA – *Internal Transcribed Spacer* (ITS), as quais são muito variáveis (Gardes & Bruns, 1993).

Existem algumas características que fazem da região ITS uma região alvo, conveniente para a identificação molecular de fungos: (a) em fungos, a região ITS está compreendida entre 600 a 800 pb e pode ser facilmente amplificada com *primer* universal, complementar à seqüência dos genes do rDNA (White et al., 1990); (b) as múltiplas cópias naturalmente existentes do rDNA facilitam sua amplificação a partir de pequena quantidade de DNA, presente em amostras diluídas ou degradadas (Gardes et al., 1991; Baura et al., 1992; Lee & Taylor, 1992; Gardes & Bruns, 1993; Martin & Rygielwicz, 2005) e; (c) estudos demonstram que a região ITS é, frequentemente, altamente variável entre espécies de fungos morfológicamente diferentes (Gardes et al., 1991; Baura et al., 1992; Lee & Taylor, 1992; Gardes & Bruns, 1993; Martin & Rygielwicz, 2005).

Uma desvantagem em potencial é a utilização da região ITS, na identificação de fungos simbiotes, uma vez que os *primers* disponíveis são de amplo espectro, e podem amplificar a região ITS de fungos, plantas, protistas e animais (White et al., 1990). Em algumas situações, em que o DNA do fungo está em baixa concentração, relativamente ao DNA da planta hospedeira, pode acontecer a amplificação preferencial do material genético vegetal (Gardes & Bruns, 1993; Martin & Rygielwicz, 2005).

Embora a região ITS seja o principal alvo, outros genes também são amplamente estudados, em particular o gene da β -tubulina (Glass & Donaldson, 1995; Schütze et al., 1999; Keeling, 2003; Roux et al., 2003; Scott et al., 2004; Zucaro et al., 2004).

O polipeptídeo estrutural da β -tubulina, associado à α -tubulina, é o constituinte mais abundante dos microtúbulos, estrutura intracelular que exerce um grande número de funções nos eucariotos, atuando na mobilidade de flagelos, agregação de cromossomos e movimentos dos cromossomos durante a mitose e meiose (Desai & Mitchison, 1997). O gene que codifica a β -tubulina é altamente conservado, mas, os *íntrons* dentro do gene são variáveis e podem ser utilizados em estudos filogenéticos (Glass & Donaldson, 1995; Keeling, 2003; Scott et al., 2004).

2.6 Detecção de fitopatógenos em sementes de milho

A detecção de fitopatógenos transmitidos por sementes pode ser justificada, basicamente, por três importantes razões: (a) porque o processo de certificação de sementes define a boa qualidade do lote de sementes; (b) para orientar a recomendação precisa do produto correto para o tratamento de sementes, quando necessário; (c) no processo de quarentena vegetal, para prevenir introdução e a disseminação de fitopatógenos para novas regiões (Neergaard, 1965; Maddox, 1998).

Os testes de sanidade de sementes têm como primeiro propósito identificar o patógeno de interesse, mas também devem ser simples, rápidos, econômicos, apresentar repetibilidade dentro e entre as amostras, e ser sensível o suficiente para detectar traços do patógeno (Neergaard, 1979a; Taylor et al., 2001b; Blakemore & Reeves, 2002). Os atuais testes de sanidade de sementes

são baseados nos métodos descritos pela *International Seed Testing Association* (ISTA). Alguns destes testes são morosos, pouco sensíveis e trabalhosos (Taylor et al., 2001b; Blakemore & Reeves, 2002; McGee, 2002).

A detecção por meio de técnicas moleculares apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de possibilitar a identificação de mais de um fitopatógeno em um único teste, como no caso do método de PCR-múltiplo, utilizando sondas fluorescentes ou *primers* específicos. Esses métodos, além dessas vantagens, são passíveis de automação (Taylor et al., 2001b; Blakemore & Reeves, 2002; McGee, 2002).

O emprego de técnicas moleculares também tem a finalidade de auxiliar na detecção de fungos que apresentam difícil distinção por meio de marcadores morfológicos, fungos de difícil esporulação ou aqueles que produzem micélio estéril. Além disso, possibilitam a identificação daqueles que possam ser suprimidos por fungos de crescimento mais rápido durante a incubação, nos testes convencionais (Taylor et al., 2001b, Iacomini-Vasilescu et al., 2002; Jaccoud Filho et al., 2002)

A cromatografia é um conjunto de técnicas, em química analítica para separação de misturas, que envolve a passagem de uma amostra, normalmente a mistura que contém a substância que se deseja separar, em uma fase móvel de solvente, por meio de uma fase estacionária. A fase estacionária atrasa a passagem dos componentes da amostra. Quando os componentes passam através do sistema, a diferentes razões de velocidade, então, são separados no tempo, semelhante a corredores de uma maratona. Teoricamente, cada componente apresenta como característica um tempo de passagem através dos sistema, designado de “tempo de retenção” (Fallon et al., 1996).

As técnicas de cromatografia podem ser aplicadas na separação de oligonucleotídeos, fragmentos de restrição de DNA (Usher, 1979), peptídeos (Gerber et al., 1979) e metabólitos em geral. Na área médica, é empregada na

identificação de micobactérias (Guthertz et al., 1993), na indústria alimentícia, na detecção de fungos em alimentos (Laich et al., 2002; Martins et al. 2003, Moraes et al., 2003; Labuda et al., 2005), na prospecção de terpenóides presentes em plantas (Liu et al., 1999) e no auxílio de análises de peptídeos e proteomas (Ferguson & Smith, 2003, Mendes et al., 2004).

Outra técnica que pode ser empregada na detecção de fitopatógenos é a espectrometria de massa, na qual, com o auxílio de um espectrômetro de massa, promove-se a separação de íons pela razão da massa pela carga (m/z). A espectrometria de massa pode ser dividida em dois grupos de aplicação: (a) identificação de compostos pela massa de um ou mais elementos dentro de um composto e; (b) determinação da composição isotópica de um ou mais elementos em um composto (De Hoffmann et al., 1996; Finehout & Lee, 2004). Em linhas gerais, as operações básicas de um espectrômetro de massa são: (a) criar íons em uma fase gasosa, (b) separar os íons no tempo ou no espaço, pela razão entre a massa e a carga (m/z), e (c) determinar a quantidade relativa de íons presentes em cada razão de massa pela carga (De Hoffmann et al., 1996; Finehout & Lee, 2004). Os principais componentes de um espectrômetro de massa são uma fonte de íons, um analisador, um detector e um terminal de computador (De Hoffmann et al., 1996; Finehout & Lee, 2004).

O uso da espectrometria de massa tem ampla aplicação, podendo ser empregada na área médica para a detecção de câncer (Liotta et al., 2004), na análise de proteomas, na expressão protéica (Hoog & Mann, 2004; Ferguson and Smith, 2003), na caracterização de proteínas (Finehout & Lee, 2004; Meetani & Voorhees, 2005), na detecção de fungos e bactérias (Szponar & Larsson, 2001; Headley et al., 2002) e na detecção e diferenciação de espécies de fungos causadores de doenças em humanos (Hollemeier et al., 2005).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, F.H. Analysis of growth and yield of maize, sunflower and soybean grown at Balcarce, Argentina. **Field Crops Research**, v.41, p.1-12, 1995.
- ASSIGBETSE, K.B. et al. Diferrentiation o *Fusrium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorfic DNA (RAPD) analisys. **Phytopatology**, v.84, p.622-626, 1994.
- BAURA, G.; SZARO, T.M.; BRUNS, T.D. *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative o *Suillus grevillei*: molecular evidence. **Mycologia**, v.84, p.592-597, 1992.
- BERBEE, M.L. The phylogeny of plant and animal pathogens in the ascomycota. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p.165-187, 2001.
- BLAKEMORE, E.J.A.; REEVES, J.C. Perspectives of the use of modern techniques in seed health testing. In: MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J. & JACCOUD-FILHO, D.S. **Seed-borne fungi: A contribution to routine seed health analysis**. Switzerland: International Seed Testing Association – ISTA, 2002. p.19-22.
- BORCHARDT, D.S.; WELZ, H.G.; GEIGER, H.H. Molecular marker analysis of European *Setosphaeria turcica* populations. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.611-617, 1998.
- BURGES, T.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.W. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeriopsis sapinea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.354-362, 2001.
- BURGESS, T., WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.D. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.91-94, 2003.
- CARVALHO, E.M. **Tratamento de sementes de milho com fungicidas em relação ao tamanho de sementes e controle de *Stenocarpella maydis***. 2001.

52p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

CARVALHO, E.M. et al. Relação do tamanho de sementes de milho e doses de fungicida no controle de *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.389-393, 2004.

CARVALHO, J.B.C. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG.

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

CASA, R.T. **Sobrevivência de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em restos culturais de milho**. 2000. 130p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.

CASA, R.T. et al. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: SANDINI, I.A.; FANCELLI, A.L. **Milho: Estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. 209p.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Dispersão Vertical e Horizontal de Conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.141-147, 2004.

CHAMBERS, K.R. Effect of time of inoculation on *Diplodia* stalk and ear rot of maize in South Africa. **Plant Disease**, v.72, p.529-531, 1988.

COCKERELL, V. New and priority seedborne diseases in western Europe. In: HUTCHINS, J.E.; REEVES, J.C. (eds) Seed health testing: Progress towards the 21st century. Cambridge, UK. **Anais**. National Institute of Agricultural Botany. 1997. p.1-10.

COSTAMILAN, L.M.; LHAMBY, J.C.B.; BONATO, E.R. Sobrevivência de fungos necrotróficos em restos de cultura de soja, em sistema de plantio direto. **Fitopatologia brasileira**, v.24, p.175-177, 1999.

CUTLER, H.G. et al. Chaetoglobosin K: A new plant inhibitor na toxin from *Diplodia macrospora*. **J. Agric. Food Chem.**, v.28, p.139-142, 1980b.

CUTLER, H.G. et al. Diplodiol: A new toxin from *Diplodia macrospora*. **J. Agric. Food Chem.**, v.28, p.135-138, 1980a.

DANIELSEN, S.; JENSEN, D.F. Relationships between seed germination, fumonisin content, and *Fusarium verticillioides* infection in selected maize samples from different regions of Costa Rica. **Plant Pathology**, v.47, p.690-614, 1998.

DE HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and applications**. Masson ed.: Paris, 1996. 340p.

DENMAN, S. et al. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. In: Molecules, morphology and classification: Towards monophyletic genera in the Ascomycetes. **Studies in Mycology**, v.45, p.129-140, 2000.

DENTI, E.A. **Incidência de fungos, efeito das práticas culturais, reação de genótipos e quantificação de danos associados com as podridões da base do colmo do milho**. 2000. 130p. Dissertação (Mestrado Genética) - Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, RS.

DESAI, A.; MITCHISON, T. J. Microtubule polymerization dynamics. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v.13, p.83-117, 1997.

EDDINS, A.H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. *Phytopathology* 20: 439-448. 1930. **Endocrine-Related Câncer**, v.11, p.585-587, 2004.

EDEL, V. et al. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusrium oxysporum* strains. **Phytopathology**, v.85, n.5, p.579-585, 1995.

FALLON, A.; BOOTH, R.F.G.; BELL, L.D. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Applications of HPLC in biochemistry**. London: Elsevier, 1996. 338p.

FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. Milho: Fisiologia da produção e produtividade. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. (eds). **Milho: Tecnologia e Produtividade**. Piracicaba, 2001. p. 25-47.

FARR, D.F. et al. **Fungi on plants and plants products in the United States.** APSPRESS, 1989. 1252p.

FERGUSON, P.L.; SMITH, R.D. Proteome analysis by mass spectrometry. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v.32, p.399–424, 2003.

FINEHOUT, E.J.; LEE, K.H. An introduction to mass spectrometry applications in biological research. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v.32, n.2, p.93-100, 2004.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Incidence of *Stenocarpella maydis* ear rot of corn under crop rotation systems. **Plant Disease**, v.85, p.92-94, 2001.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W.; WEHNER, F.C. Incidence of ear rot pathogens under alternating corn tillage practices. **Plant Disease**, v.82, p.781-784, 1998.

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

FREITAS, M.A.; CAMPOS, H.D.; MACHADO, J.C. Redução na produção de milho devido a podridão do colmo, causada por *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. In: **XII Congresso Congresso de Pós-Graduando da UFLA/Fitopatologia**. Lavras, MG. 2003. 6p.

GARDES, M. et al. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.180-190, 1991.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, p.113-118, 1993.

GERBER, G.E. et al. Partial primary structure of bacteriorhodopsin: Sequencing methods for membrane proteins. **Proc. Nat. Acad. Sci. Biochemistry**, v.76, n.1, p.227-231, 1979.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.1323-1333, 1995.

GUTHERTZ, L.S. et al. Curvilinear-Gradient High-Performance Liquid Chromatography for Identification of Mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n7, p.1876-1881, 1993.

HEADLEY, J. V. et al. Mass spectrometric determination of ergosterol in a prairie natural wetland. **Journal of Chromatography**, v.958, p.149-156, 2002.

HOLLEMEYER, K. et al. Proteolytic peptide patterns as indicators for fungal infections and nonfungal affections of human nails measured by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.338, p.326-331, 2005.

HOOG, C. L.; MANN, M. Proteomics. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v.5, p.267-293, 2004.

HUDSPETH, M.E. et al. Rapid purification of yeast mitochondrial DNA in high yield. **Biochim. Biophys. Acta**, v.610, p.221-228, 1980.

IACOMI-VASILESCU, B. et al. Development of a PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous seeds. **Seed Sci. & Technol.**, v.30, p.87-95, 2002.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística: Economia. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso 20 fev. 2006.

JACCOUD FILHO, D.S. et al. Diagnose molecular de fungos em sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.10, p.287-331, 2002.

JOHANN, H. *Diplodia macropora* on corn in Brasil. **Plant Disease Reporter**, v.19, n.9-10, 1935. MORANT, M.A.; WARREN, H.L. & VON QUALEN, S.K. A synthetic medium for mass production of pycnidiospores of *Stenocarpella* species. **Plant Disease**, v.77, p.424-426, 1993.

JONSSON, R.; SÄLL, T.; BRYNGELSSON, T. Genetic diversity for Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. **Can. J. Plant Pathol.**, v.22, p.258-264, 2000.

JUGENHEIMER, R.W. **Corn improvement seed production and use**. New York: John Wiley & Sons, 1976. 670p.

KEELING, P. J. Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. **Fungal Genetics and Biology**, v.38, p.298–309, 2003.

KELLERMAN, T.S. et al. induction of diplodiosis, a neuromycotoxicosis in domestic ruminants with cultures of indigenous and exotic isolates of *Diplodia Maydis*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.52, p.35-42. 1985.

KELLERMAN, T.S. et al. Perinatal mortality a lambs of ewes exposed to cultures of *Diplodia maydis* (= *Stenocarpella maydis*) during gestation. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v.58. p.297-308, 1991.

LABUDA, R., PARICH, A., VEKIRU, E. Incidence of fumonisins, moliniformin and Fusarium species in poultry feed mixtures from Slovakia. **Ann. Agric. Environ. Méd.**, v.12, n.1, p.81-86, 2005.

LAICH, F.; FIERRO, F.; MARTI, J. F. Production of Penicillin by Fungi Growing on Food Products: Identification of a Complete Penicillin Gene Cluster in *Penicillium griseofulvum* and a Truncated Cluster in *Penicillium verrucosum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.3, p.1211–1219. 2002.

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

LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, p.636-653, 1992.

LIOTTA, L.A. et al. High-resolution serum proteomic patterns for ovarian cancer detection. **Endocrine-Related Câncer**, v.11, p.585–587, 2004.

LIU, J. et al. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: desoxyhemigossypol-6- O-methyltransferase from cotton plants. An enzyme capable of methylating the defense terpenoids of cotton. **Plant Physiology**, v.121, n.11, p.1017–1024, 1999.

LUZ, W.C. **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa/CNPT, 1995. 28p. (Circular Técnica nº: 05).

LUZ, W.C. **Tratamento de sementes de milho com fungicidas**. Passo Fundo: Embrapa/CNPT, 1996. 24p. (Circular Técnica nº: 07).

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v..2, p.229-261, 1994.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: Fundamentos e aplicações.** Brasília. MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 107p.

MACHADO, J.C. et al. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technique. 26th International Seed Testing Congress/seed Symposium. Angers, France, 2001. p.62.

MACHADO, J.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Rev. Bras. Sementes**, v.23, n.2. p.88-94, 2001.

MADDOX, D.A. Implications of new technologies for seed health testing and the worldwide movement of seed. **Seed Science Research**, v.8, p.277-284, 1998.

MARASAS, W.F.O. ; VAN DER WESTHUIZEN, G. C. A. *Diplodia macrospora*: the cause of a leaf blight and cob rot in maize (*Zea mays* L.) in South Africa. **Phytophylactia**, v.11, p.61-64, 1979.

MÁRIO, L.J.; 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.

MARTIN, K.J.; RYGIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, v.28, n.5, p.1-11, 2005.

MARTINS, M.L.; MARTINS, M.M.; BERNARDO, F. Flora fúngica e pesquisa de micotoxinas em alimentos para animais de companhia. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v.98, n.548. p.179-183, 2003.

McDONALD, B.A.; MARTINEZ, J.P. DNA restriction fragment length polymorfisms among *Mycosphaerella graminicola* (Anamoph *Septoria tritici*) isolates collected a single wheat field. **Phytopathology**, v.80, n.12, p.1368-1373, 1990.

McGEE, D.C. **Maize disease: a reference source for seed technologist.** St. Paul: The American Phytopathological Society. 1988. 150p.

McGEE, D.C. Principles, advantages and limitations of seed health testing methods. In: MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOU-FILHO, D.S. **Seed-Borne Fungi: A contribution to routine seed health analysis.**

Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), 2002. p. 2-8.

MEETANI, M.A.; VOORHEES, K.J. MALDI mass spectrometry analysis of high molecular weight proteins from whole bacterial cells: pre-treatment of samples with surfactants. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v.16, p.1422-1426, 2005.

MENDES, M.A. et al. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. **Toxicon**, v.44, p.67-74, 2004.

MORAES, R.J.Q. et al. Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.4, p. 483-489. 2003.

MORANT, M.A.; WARREN, H.L. & VON QUALEN, S.K. A synthetic medium for mass production of pycnidiospores of *Stenocarpella* species. **Plant Disease**, v.77, p.424-426, 1993.

MORELLO, C.L. et al. Fungos associados à podridões em espigas de milho, ciclo normal, no estado do Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.272, 1994.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific analysis of DNA *in vitro* with a polymerase-catalysed reaction. **Methods in Immunology**, v.255, p.335-350, 1987.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v.81, p.556-565, 1997.

NAZARENO, N.R.X. Avaliação de perdas por podridões do colmo em milho (*Zea mays* L.) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, p.82-84, 1989.

NEERGAARD, P. Historical development and current practices in seed health testing. **Proc. Int. Seed Ass.** 30(1): 99-118. 1965.

NEERGARD, P. **Seed Pathology**. London: Macmillan Press, 1979a. v.1, 839p.

NEERGARD, P. **Seed Pathology**. London: Macmillan Press, 1979b. v.2, 1187p.

ODRIZOLA, E. et al. *Diplodia maydis*: a cause of death of cattle in Argentina. **N.Z. Vet. Journal**, v.53, n.2, p.160-161, 2005.

PINTO, N.F.J.A. Patologia de sementes de milho. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 1998. 44p. (Circular Técnica nº: 29).

RABIE, C.J.; DuPREEZ, J.J.; HAYES, J.P. Toxicity of *Diplodia maydis* to broilers, ducklings and laying chicken hens. **Poultry Science**, v.66, p.1123-1128, 1987.

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends Genet.**, v.9, p.275-279, 1993.

REID, L.M.; SINHA, R.C. Maize maturity and the development of giberella ear rot symptoms and deoxynivalenol after inoculation. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.147-154, 1998.

REIS, A.C. et al. Erradicação de fungos patogênicos associados à semente de milho e proteção de fungos do solo pelo tratamento com fungicida. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.585-591, 1995.

REIS, E. M.; CASA, R.T. Milho: Manejo integrado de doenças. In: FANCELLI, A.L. & DOURADO-NETO, D. (eds). **Milho: Tecnologia e Produtividade**. Piracicaba, 2001. p. 223-237.

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. Ciclos biológicos e epidemiologia: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Diplodia* e *Fusarium*. In: MOLIN, R. & VALENTIN, M.L. (eds.) Simpósio sobre micotoxinas em grãos. Fundação Cargill, Fundação ABC, 1999. p.21-39.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Controle de doenças fúngicas na cultura do milho em plantio direto. In: BORGES, G.; BORGES, L.D. **Seminário sobre tecnologia de produção e comercialização do milho**. Passo Fundo, RS. 2000. p.62-71.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. ; VAN WYK, P.S. Fungal associations in corn kernels and effects on germination. *Phytopathology* 80: 131-134. 1990.

ROBERTS, S.J., BROUGH, J.; CHAKRABARTY, S. Non-destructive seed testing for bacterial pathogens in germplasm material. **Seed Sci. & Technol.**, v.30, p.69-85, 2002.

ROUX, J. et al. Biological and Phylogenetic Analyses Suggest that Two *Cryphonectria* spp. Cause Cankers of *Eucalyptus* in África. **Plant Disease**, v.87, n11, p.1329-1332, 2003.

SACCARDO, P.A. **Sylloge fungorum**. Michigan: Edwards Brothers, 1944. V3, pt. 7, 860p.

SCHÜTZE, J. et al. Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porífera. **Proc. R. Soc. Lond. B.** , v.266, p.63-73, 1999.

SHI, Y.L. et al. Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. **Phytopathology**, v.86, n.3, p.311-318, 1996.

SMITH, D.R.; WHITE, D.G. Disease of corn. In: SPRAGUE, G.F.; DUDLEY, Y.G. (eds.) **Con and corn improvement**. Madison: Agronomy monograph. 1988. p.687.766.

SOCOTT, J. et al. Genotypic variation in *Penicillium chrysogenum* from indoor environments. **Mycologia**, v.96, n.5. p.1095–1105, 2004.

SUTTON, B.C. The Coelomycetes. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.

SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. **Diplodia maydis**. London: C.M.I, 1966. Não paginado. (C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 84).

SZPONAR, B.; LARSSON, L. Use of mass spectrometry for characterising microbial communities in bioaerosols. **Ann. Agric. Environ. Med.** , v.8, p.111-117, 2001.

TAYLOR, E. Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. **Journal of Plant Pathology**, v.83, n.2, p.75-81, 2001a.

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

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 20 fev. 2006.

USHER, D.A. Reversephase HPLC of DNA restriction fragments and ribooligonucleotides on uncoated Kel-F powder. **Nucleic Acids Research**, v.6, n.6, p.2289-2306. 1979.

Van NIEKERK, J.M. et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v.96, n.4, p.781–798, 2004.

WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. USA, Minnesota, St. Paul: The American Phytopathological Society. APS Press., 1999. 78p.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (eds). **PCR Protocols**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.

WILCOXSON, R.D. Stalk rot in relation to yield of corn. **Phytopathology**, v.52, p.416-418, 1962.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

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

ZUCCARO, A. et al. A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade. **Studies in Mycology**, v.50, p.283-297, 2004.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Stenocarpella macrospora* E DE *Stenocarpella maydis* INOCULADOS EM SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.)

1 RESUMO

Stenocarpella macrospora e *S. maydis* destacam-se dentre os principais agentes fitopatogênicos que incitam podridões de sementes, raízes, colmo e espigas, além de morte de plântulas e de plantas no estágio reprodutivo do milho (*Zea mays* L.). Estudos sobre a variabilidade populacional de *S. maydis* são encontrados com maior frequência, ao contrário do que ocorre com *S. macrospora*. Nesse sentido a inoculação de sementes proporciona, em geral, resultados mais rápidos, além de partir da condição pela qual a doença pode ter início no campo. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito dos isolados de *S. macrospora* Mc-44, Mc-59, Mc-66, Mc-72 e Mc-73 sobre os híbridos de milho DKB-212 e DKB-333-B e o efeito dos isolados de *S. maydis* May-43, May-46, May-48, May-57 e May-74 sobre os híbridos de milho DKB-214 e DKB-333-B inoculados em sementes. Observou-se que todos os isolados de *S. macrospora* aumentaram o índice de severidade de doença e afetaram a germinação, a emergência de plântulas, o índice de velocidade de emergência (IVE), a sobrevivência de plântulas e o peso de matéria seca da parte aérea (PMSA) e de raiz (PMSR). Todos os isolados de *S. Maydis*, exceto o May-43, proporcionaram o aumento do ISD das sementes dos híbridos DKB-214 e DKB-333-B inoculados, e afetaram negativamente a germinação, a sobrevivência de plântulas, o PMSA e o PMSR do híbrido DKB-333-B. E para as sementes do híbrido DKB-214, apenas os isolados May-57 e May-74 afetaram negativamente essas variáveis.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2 ABSTRACT

The fungi *Stenocarpella macrospora* and *S. maydis* are important pathogens causing seedling blight, ear, and stalk rots in maize (*Zea mays* L.) being seed transmitted in this host. Both fungi interfere directly on seed germination and vigor, determining low plant population and consequently reduction in the yield. Studies on pathogenic variability for both fungi have been little investigated mostly in reason of the inefficiency of the available inoculation methods. In this sense inoculation of seeds can provide quicker results in addition to the advantage to apply it in practice. The main objective in this work was to compare the effects of *S. macrospora*, isolates Mc-44, Mc-59, Mc-66, Mc-72 and Mc-73 in maize seeds, lines DKB-212 and 333 DKB-333-B, as well as the effects of *S. maydis*, isolates May-43, May-46, May-48, May-57 and May-74 in maize seeds, lines DKB-214 and 333 DKB-333-B. All isolates of *S. macrospora* were able to increase the rate of disease severity and to affect seed germination, seedling emergency rate (vigor), plant population, seedling survival, weight of dry matter of the aerial part and of the roots. All isolates of *S. maydis*, except the May-43, were able to increase the rate of disease severity of the hybrids DKB-214 and DKB-333-B, and affect the seed germination, seedling emergence rate (vigor), plant population and seedlings survival, weight of dry matter of the aerial part and of the roots line DKB-333-B. And for the line DKB-214, only the isolates May-57 and May-74 affected negatively those variable.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3 INTRODUÇÃO

Dentre os principais agentes fitopatogênicos que incitam podridões de sementes, raízes e colmo, morte de plântulas no estágio reprodutivo e apodrecimento de espigas de milho (*Zea mays* L.), destacam-se *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton e *S. maydis* (Berk.) Sutton (Eddins, 1930; Latterell & Rossi, 1983; Rheeder et al., 1990; Luz, 1995). Além disso, outro fator de relevante importância para a cultura do milho deve-se também, à interferência direta desses dois fungos no vigor das sementes e das plântulas, bem como no estande e, conseqüentemente, na produtividade da cultura (Shurtleff, 1992; Reis & Casa, 1996; Casa et al., 2000; Munkvold & O'Mara, 2002).

A incidência das podridões de colmo causadas por *Stenocarpella* sp. apresenta correlação linear positiva com a quantidade de resíduos de milho na superfície do solo (Flett & Wehner, 1991; Flett & McLaren, 1998). No Brasil, estudos realizados por Reis & Mário (2003) revelaram que a quantidade de conídios nos restos culturais, em cultivos sucessivos de milho para *S. Macrospora*, foi de $2,1 \times 10^5$ e $4,2 \times 10^5$ conídios/m² e para *S. maydis* foi de $1,0 \times 10^5$ e $3,4 \times 10^6$ conídios/m², no primeiro e segundo ano de cultivo, respectivamente. Na última década, as doenças de espiga têm preocupado os produtores, devido à exigência de matéria prima de qualidade pelas indústrias (Mário et al., 2003). Isso força os produtores a se aperfeiçoarem e a buscar novas tecnologias, como conseqüência ocorre estímulo e o desenvolvimento na pesquisa.

No Sul do estado de Minas Gerais, devido à falta de hábito de rotação de cultura, no cultivo do milho, prática essa recente entre os produtores da região, as podridões de colmo incitadas por *S. macrospora* e *S. maydis* têm aumentado

consideravelmente nos últimos anos e causado grandes prejuízos, tanto na produtividade, quanto na qualidade de grãos de milho produzido .

Ullstrup (1949) não observou diferenças na incidência de podridão de espigas, causada por cinco isolados originários de diferentes áreas produtoras de milho. Por outro lado, diferenças de patogenicidade em linhagens F₁ de milho e necessidade de diferentes temperaturas ótimas para o crescimento miceliano de isolados, provenientes de diversos estados dos EUA, foram observadas por Young et al. (1959). Ao estudar a virulência de 20 isolados de *Stenocarpella zea*, Kappelman et al. (1965) observaram diferenças significativas de severidade de podridão do colmo entre esses isolados. Da mesma forma, Maxwell & Thompson (1974), também reportaram diferenças significativas na severidade de podridão do colmo, entre combinações de linhagens de milho, testadas com isolados *Stenocarpella* sp. de baixa e de alta virulência. Todavia, ainda não foram encontrados, na literatura, relatos sobre a inoculação diferencial, bem como avaliação da resistência entre híbridos em relação a isolados de *S. macrospora* e de *S. maydis* inoculados diretamente nas sementes.

Portanto, este trabalho teve como objetivo comparar o comportamento de cinco isolados de *S. maydis* e cinco de *S. macrospora*, em associação com as sementes, em relação a dois híbridos comerciais de milho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido sob condições controladas nos meses de junho a outubro de 2004, nos laboratórios de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia e de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

4.1 Origem dos isolados utilizados

Foram utilizados isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* (Tabela 1), originários de diferentes regiões do Brasil. Parte desses isolados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ivan Resende (Monsanto do Brasil S.A.) e parte foram de coletas realizadas em campos de produção de milho.

TABELA 1: Identificação dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*, local de origem e estado. UFLA, LAVRAS, MG, 2005.

ISOLADOS	MUNICÍPIO	UF	FUNGO
Mc-44	Pelotas	RS	<i>S. macrospora</i>
Mc-59	Morro Agudo	SP	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-66	Formoso de Goiás	GO	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-72	Barra Mansa	RJ	<i>S. macrospora</i>
Mc-73	Ingá	MG	<i>S. macrospora</i>
May-43	Pelotas	RS	<i>S. maydis</i>
May-46	Castro	PR	<i>S. maydis</i> ¹
May-48	Chapadão do Sul	MT	<i>S. maydis</i> ¹
May-57	Morro Agudo	SP	<i>S. maydis</i> ¹
May-74	Ingá	MG	<i>S. maydis</i>

¹Isolados de *S. macrospora* (Mc) e *S. maydis*(May), cedidos pelo Dr. Ivan Resende (Monsanto do Brasil S.A.).

4.2 Determinação do perfil sanitário e fisiológico das amostras de sementes utilizadas

As sementes dos híbridos milho empregadas nesse ensaio o DKB-212, com tipo de grão dentado, de cor amarela, precoce e alta tolerância a grãos ardidos; o híbrido DKB-214 considerados resistente e DKB-333-B, suscetível a *S. maydis* (Tabela 2), produzidas no campo de sementes genéticas da unidade experimental de Uberlândia, MG, na safra 2003/04, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ivan Resende (Monsanto do Brasil S.A.). A qualidade fisiológica e sanitária dos lotes de sementes foi determinada de acordo com descrições nas Regras para Análise de Sementes do Brasil (1992) e a *International Seed Testing Association* (ISTA, 1976), exceto em relação ao número de sementes examinadas.

TABELA 2: Origem e descrição dos híbridos de milho utilizados no experimento. UFLA, Lavras, MG, 2006.

HÍBRIDO	TIPO DE GRÃOS	COR	CICLO	GRÃOS ARDIDOS
DKB-212	dentado	amarelo	precoce	alta tolerância
DKB-333-B	semiduro	alaranjado	semi precoce	-
DKB-214	semi duro	amarelo/ alaranjado	precoce	alta tolerância

4.3 Inoculação das sementes

As sementes dos híbridos DKB-212 e DKB-333-B foram inoculadas com os isolados Mc-44, Mc-59, Mc-66, Mc-72 e Mc-73 de *S. macrospora*. E os

isolados de *S. maydis* May-43, May-46, May-48, May-57 e May-74 inoculados sobre os híbridos de milho DKB-214 e DKB-333-B.

As sementes foram inoculadas pela técnica de restrição hídrica descrita por Machado et al. (2004) com as seguintes modificações: inicialmente preparou-se uma calda de BDA diluído (extrato de 200 g batata mais 20 g de dextrose e 3 g de Agar por litro de água destilada). A esta calda adicionou-se manitol em quantidade suficiente para se obter o potencial osmótico de -1,4 MPa, calculado conforme o programa SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). As folhas de papel germitest, tamanho de 30,0 cm x 38,0 cm, previamente esterilizadas, foram umedecidas com a referida calda. Duas dessas folhas foram transferidas, posteriormente, para uma bandeja de tamanho 46,5 cm x 29,5 cm x 9,5 cm, desinfestadas com álcool e hipoclorito 2% por 10 minutos. Sobre as duas folhas procedeu-se a distribuição de 100 ml da suspensão de inóculo das culturas fúngicas de cada isolado em teste. Esta suspensão foi preparada assepticamente pela trituração em liquidificador do conteúdo de uma placa de petri, culturas desenvolvidas em meio BDA, com a idade de 15 dias. A concentração de inóculo dos isolados de *S. maydis* foi ajustada para $2,0 \times 10^4$ conídios por ml de suspensão. Uma vez aplicado uniformemente o inóculo sobre o substrato de papel com meio BDA osmoticamente modificado com manitol, procedeu-se a distribuição de uma camada das sementes de milho das cultivares pré-selecionadas para este ensaio. Acima da camada de sementes, colocou-se um filme plástico, previamente desinfestado com formaldeído, acima do mesmo colocou-se uma nova camada de substrato de papel com BDA + manitol, inóculo fúngico e sementes de forma semelhante ao descrito anteriormente para a primeira camada na base das bandejas. Este conjunto foi repetido quatro vezes perfazendo um total de 4 camadas de sementes. Cada camada preparada por bandeja correspondeu a um tempo de exposição das sementes, ou seja, 24, 48, 72 e 96 horas para cada isolado de *S. macrospora* em estudo e 24, 47 e 72 h para

os isolados de *S. maydis*. O controle foi preparado da mesma forma, em bandejas separadas, sem aplicar o inóculo dos isolados.

Uma vez cobertas com um filme plástico as bandejas foram transferidas para câmara de crescimento, com temperatura ajustada a 20 ± 2 °C e foto período de 12 horas, onde permaneceram até a finalização do período de incubação mais longo. Após cada período de incubação, 24, 48, 72 e 96 horas, as sementes eram retiradas do substrato e colocadas para secar sobre papel germitest seco, em condições de ambiente, pelo período de 72 horas.

4.4 Avaliações da qualidade das sementes após a inoculação

Uma vez inoculadas as sementes foram avaliadas quanto: (1) a sanidade, pelo método de incubação em substrato de papel com congelamento (Limonard, 1966), sendo desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% durante 1 minuto; (2) a porcentagem de germinação foi determinada em substrato rolo de papel Germitest, utilizando-se 4 repetições de 50 sementes, desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% durante 1 minuto. A umidade do substrato foi de 2,5 vezes o peso do papel em água e a incubação foi a 25 °C por 5 dias. A avaliação foi realizada após a incubação, efetuando-se a contagem de plântulas normais, plântulas anormais, plântulas infectadas e sementes mortas. Além disso, determinou-se o índice de severidade de doença em porcentagem (ISD), calculado pela fórmula de McKinney (1923):

$$\text{ISD (\%)} = \frac{\sum (\text{notas da escala} \times \text{frequência por nota})}{(\text{N}^{\circ} \text{ de indivíduos avaliados} \times \text{nota máxima da escala})} \times 100$$

Utilizou-se uma escala de notas de 0 a 3, onde (0)= plântulas normais, (1)= plântulas com lesões leves, (2)= plântulas com lesões acentuadas, (3)=

plântulas com lesões profundas, mais as sementes mortas (todas as sementes mortas acima da média da testemunha).

A emergência de plântulas em solo foi conduzido com 4 repetições de 25 sementes, desinfestadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% durante 1 minuto, semeadas em caixas plásticas (46,5 cm x 29,5 cm x 9,5 cm) contendo substrato composto da mistura de areia e solo de barranco, na proporção de 1:1, previamente fumigado com brometo de metila. Após a semeadura as sementes foram cobertas com uma camada de 3 cm do substrato. Posteriormente as caixas foram distribuídas aleatoriamente em casa de vegetação. As porcentagens de germinação foram obtidas aos 14 e aos 35 dias após a semeadura (DAS). Foi contado o número de plântulas mortas e realizada a coleta das plantas emergidas. O índice de velocidade de emergência (IVE), foi obtido pela contagem da emergência dos 7 aos 14 DAS, calculado pela fórmula de Maguire (1962):

$$IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$$

IVE = índice de velocidade de emergência;

E_1, E_2, E_n = número de plântulas emergidas na primeira, segunda e última contagem;

N_1, N_2, N_n = número de dias a partir da semeadura.

A emissão de folhas primárias a partir do coleótilo foi o critério adotado para se considerar uma planta de milho emergida. A coleta da parte aérea das plantas emergidas foi realizada efetuando-se corte de cada planta na linha superficial do solo com acondicionamento das parcelas em saco de papel. O sistema radicular de cada parcela, foi peneirado para eliminar o excesso de substrato e lavado em água corrente, depois colocado em saco de papel. Todos os tratamentos foram secos em estufa de circulação forçada por 48 horas, sob temperatura de 80°C. Após esse período foram avaliados os pesos de matéria seca da parte aérea (PMSA) e do sistema radicular (PMSR).

4.5 Análise dos dados

Para cada experimento, foi realizada uma análise de variância, para as variáveis: porcentagem de plântulas normais, anormais e infectadas, sementes sadias e índice de severidade de doença (ISD), sementes sadias, incidência de *S. macrospora* e *S. maydis*, índice de velocidade de emergência (IVE), plântulas emergidas e sementes mortas aos 14 DAS, plântulas sobreviventes e mortas aos 35 DAS, PMSA e PMSR. A verificação da distribuição normal dos dados foi feita com auxílio do Software S.A.S. *for Windows* (S.A.S. Institute, Cary, N.C.). A comparação de médias foi realizada pelo teste de agrupamento de Scott-Knott no SISVAR, $P < 0,01\%$ (Ferreira, 2000).

O experimento com os isolados de *S. macrospora* foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 x 4, sendo 2 híbridos comerciais de milho, 5 isolados mais testemunha sem inoculação e 4 tempos de inoculação, mais um tratamento adicional para cada híbrido (sem inoculação e sem incubação). A análise da área abaixo da curva (AAC) (Campbell & Madden, 1990), para as variáveis foi realizada empregando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6, sendo 2 híbridos de milho e 5 isolados mais o tratamento testemunha sem inoculação. O experimento com os isolados de *S. maydis* foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, a análise foi realizada em esquema fatorial 2 x 6 x 3 (dois híbridos, 5 isolados + a testemunha sem inoculação e 3 tempo de inoculação (24, 48 e 72 horas).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ocorrência e efeito dos isolados de *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho inoculadas via restrição hídrica

De acordo com os dados obtidos no teste de sanidade de sementes, *blotter test*, observou-se efeito significativo, pelo teste de F ($P \leq 0,01$), nas interações entre híbridos x isolados, híbrido x período de inoculação, isolado x período de inoculação e híbrido x isolado x período de inoculação para a incidência de *S. macrospora* (Tabela 1A). Pela análise de variância da área abaixo da curva (AAC), para todas as variáveis avaliadas, observou-se que a interação entre híbridos e isolados foi significativa (Tabela 2A e 3A).

A incidência de *S. macrospora*, detectada pelo teste de sanidade das sementes, tanto para o híbrido DKB-212, quanto para o DKB-333-B, aumentou progressivamente com o aumento do período de incubação (Figura 1A). Observou-se que, houve maior incidência de *S. macrospora* nas sementes do híbrido DKB-212 em relação ao DKB-333-B, em todos os períodos de incubação e que não houve incidência desse fungo no tratamento testemunha (Figura 1B).

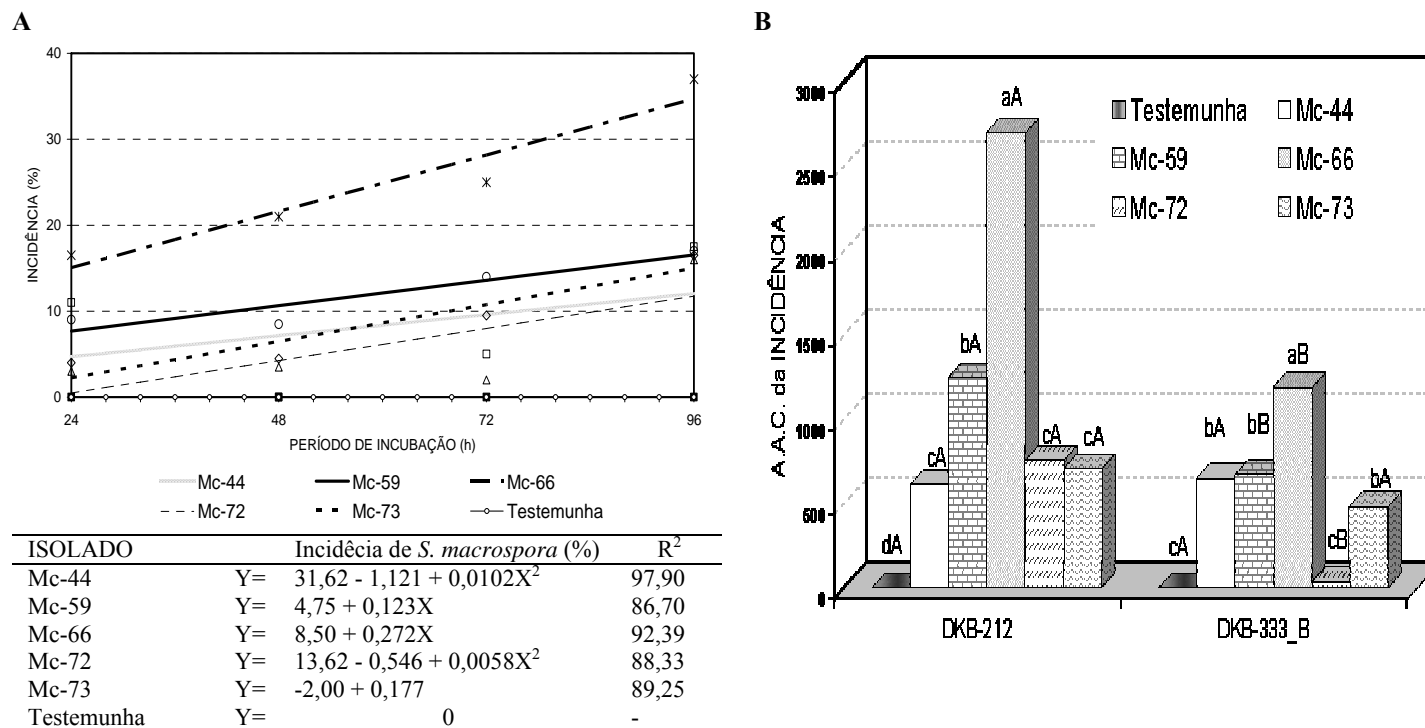
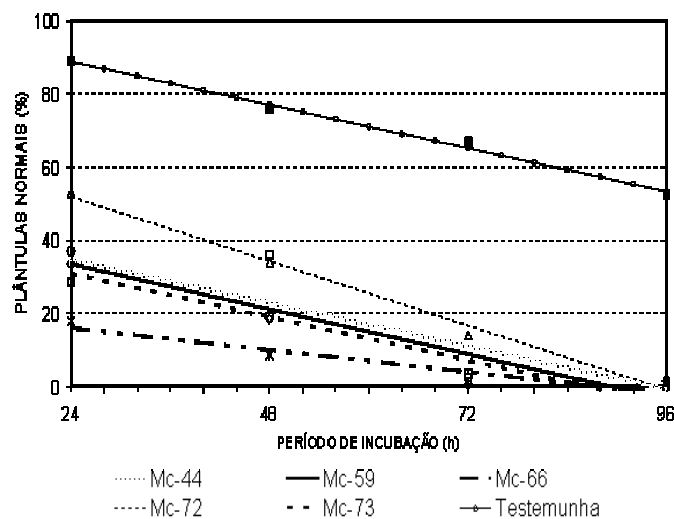


FIGURA 1: Incidência de *S. macrospora* (%) detectada em lotes de sementes dos híbridos DKB-212 e DKB-333-B, nos períodos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas (A), AAC de incidência de *S. macrospora* em sementes de milho inoculadas com os isolados testados e no lote testemunha, sem inoculação (B). As médias com a pelo Teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A porcentagem de plântulas normais foi significativamente influenciadas, teste de F ($P \leq 0,01$), pelo híbrido e pelos isolados avaliados em cada período de tempo de incubação testado (Tabela 2A). Ao avaliar a germinação das sementes, em rolo de papel, verificou-se que houve efeito significativo, pelo teste de F ($P \leq 0,01$), na interação entre híbridos \times isolados, para AAC de plântulas normais e da AAC do ISD, (Tabela 2A). Observou-se que, o aumento da incidência de *S. macrospora*, pelo aumento do período de exposição das sementes aos isolados (Figura 1A), proporcionou a redução na porcentagem de plântulas normais (Figura 2A), e aumento no ISD (Figura 2B), determinados pelo teste de germinação em rolo de papel.

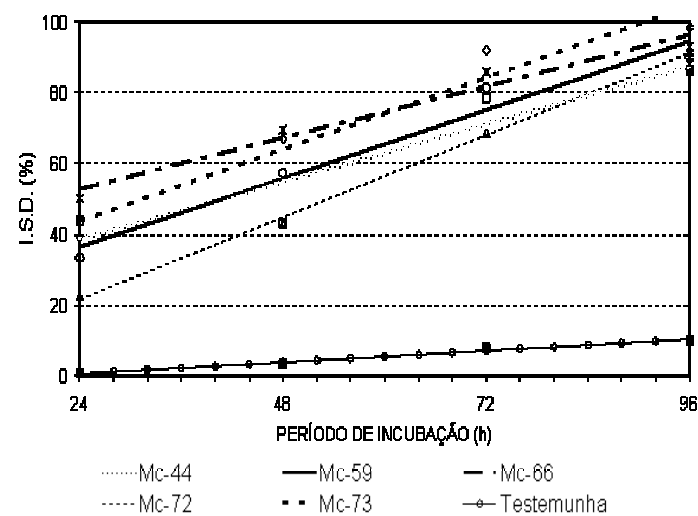
As variáveis relacionadas à qualidade das sementes foram influenciadas significativamente, pela associação de *S. macrospora*. A porcentagem de plântulas normais, representada pela AAC de plântulas normais, dos híbridos DKB-212 e DKB-333-B, inoculadas com o isolado Mc-66, foi reduzida em 70,64 %, e 80,30 %, respectivamente, em relação à testemunha sem o patógeno (Figura 3A). E quanto ao índice de severidade, representado pela AAC do ISD, foi aumentado em 93,57 % nas plântulas do híbrido DKB-212 e 93,38 % para híbrido DKB-333-B, inoculados com os isolados Mc-66 e Mc-73, respectivamente (Figura 3B).

A



ISOLADO	NORMAIS (%)	R ²
Mc-44	Y= 46,50 - 0,491X	72,18
Mc-59	Y= 67,00 - 1,397X	98,83
Mc-66	Y= 22,00 - 0,250X	89,33
Mc-72	Y= 69,50 - 0,733X	99,22
Mc-73	Y= 60,87 - 1,248X	97,29
Testemunha	Y= 100,75 - 0,493X	99,28

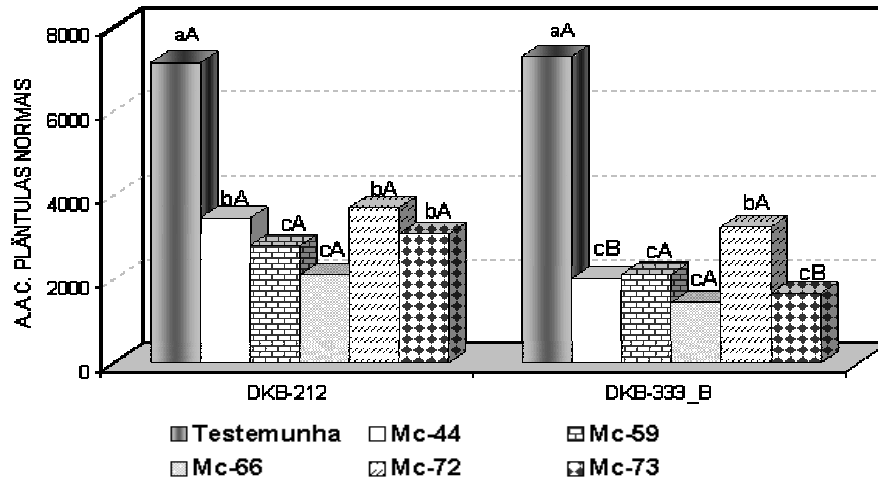
B



ISOLADO	ISD	R ²
Mc-44	Y= 22,290 + 0,677X	85,68
Mc-59	Y= -2,370 + 1,617X - 0,0067X ²	99,37
Mc-66	Y= 22,880 + 1,247X - 0,0053X ²	99,83
Mc-72	Y= -1,575 + 0,967X	99,85
Mc-73	Y= -3,431 + 1,966X - 0,0093X ²	99,44
Testemunha	Y= -2,606 + 0,134X	98,13

FIGURA 2: Plântulas normais (A) e índice de severidade de doença (ISD) (B), em lotes de sementes de milho, inoculadas com os isolados de *S. macrospora*, independente do híbrido avaliado e no lote testemunha, sem inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



B

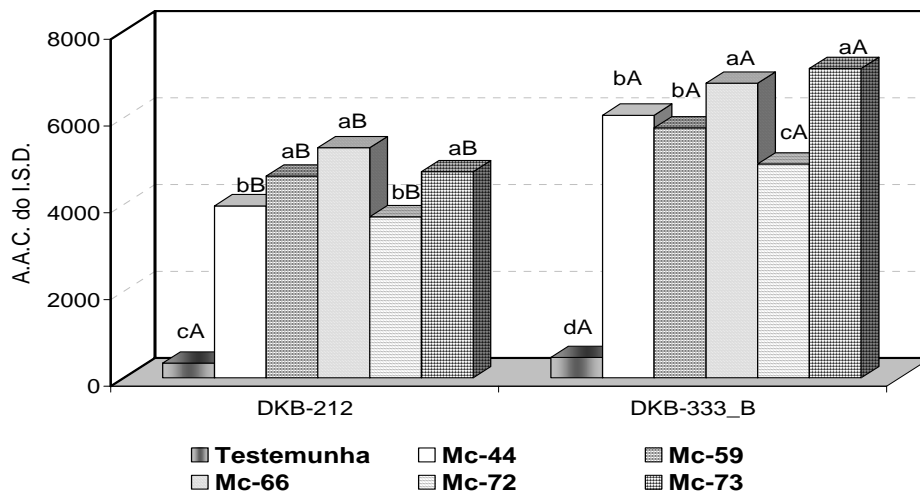


FIGURA 3: AAC da porcentagem de plântulas normais (A) e do índice de severidade de doença (ISD) (B), em lotes de sementes do híbrido DKB-212 e DKB-333-B, inoculadas com os isolados de *S. macrospora* e no lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula entre os isolados, e maiúscula entre os híbridos, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.2 Efeito de *Stenocarpella macrospora* em sementes de dois híbridos de milho pelo teste de ‘emergência em solo/areia’

Na avaliação de germinação em substrato solo/areia, observou-se diferença significativa, pelo teste de F ($P \leq 0,01$), para as interações entre híbrido x isolado, híbrido x período de inoculação, isolado x período de inoculação e híbrido x isolado x período de inoculação, para as variáveis plântulas emergidas aos 14 DAS, plântulas sobreviventes aos 33 DAS, IVE, PMSA e PMSR (Tabela 1A).

Na interação entre híbridos x isolados observou-se que a houve efeito significativo, pelo teste de F ($P \leq 0,01$), entre as variáveis AAC de plântulas emergidas aos 14 DAS, para AAC de plântulas sobreviventes aos 33 DAS, IVE, PMSA e PMSR (Tabela 2A), em sementes dos híbridos DKB-212 e DKB-333-B, inoculadas com *S. macrospora*, nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Observou-se que o aumento do período de incubação das sementes não alterou o aspecto visual, nem coloração do sistema radicular das plântulas originadas das sementes sem inoculação. Entretanto, com a exposição dessas ao patógeno, verificou-se a necrose do sistema radicular e, sobretudo, redução da quantidade de raízes com o aumento do período de exposição.

Na emergência de plântulas em substrato solo/areia, das sementes submetidas à incubação nos períodos de 24, 48, 72 e 96 h sem a presença do fungo, ou seja, no tratamento testemunha, a emergência de plântulas e o ISD não foram afetados (Figuras 4A, 4B).

Considerando-se a porcentagem de plântulas emergidas, representada pela AAC de plântulas emergidas (Figura 5A), observou-se que, exceto nos lotes de sementes inoculadas com o isolado Mc-72, todos os isolados proporcionaram maior redução na emergência de plântulas, no híbrido DKB-333-B (Figura 5A). Em relação ao índice de velocidade de emergência, representado pela AAC do

IVE, foi observada a mesma tendência dos isolados sobre essa variável, ou seja, menor efeito para o híbrido DKB-333-B em relação ao híbrido DKB-212 (Figura 5B).

A sobrevivência das plântulas (Figuras 6A), o PMSA e o PMSR (Figuras 7A e 7B), também foi afetada, com o aumento do tempo de exposição das sementes ao fungo, para todos os isolados. Vale ressaltar que o tratamento testemunha não teve essas variáveis alteradas com o aumento do tempo de exposição.

O isolado MC-73, apesar de ter apresentado incidência de *S. macrospora* estatisticamente igual aos isolados Mc-44 e Mc-72, proporcionou maior redução na porcentagem de sobrevivência, representado pela AAC de plântulas sobreviventes (Figura 6B), no P.M.S.A (Figura 8A) e no PMSR (Figura 8B) do híbrido DKB-212.

Os isolados MC-59 e Mc-73 também apresentaram incidência igual ao isolado MC-44 (Figura 1B), mas, proporcionaram maior redução no PMSA (Figura 8A) e no PMSR (Figura 8B). Da mesma forma, que ocorreu para as variáveis anteriormente citadas, o PMSA (Figura 8A) e o PMSR, (Figura 8B) também foram influenciados negativamente pelo aumento do período de incubação das sementes em contato com os isolados de *S. macrospora*, exceto no tratamento testemunha sem inoculação.

Observou-se que tanto a AAC do PMSA quanto a do PMSR do híbrido DKB-333-B foram menores em relação ao DKB-212 (Figuras 8A e 8B), exceto para o PMSR, nas sementes inoculadas com o isolado Mc-66.

A associação negativa de todos os isolados de *S. macrospora* com sementes de milho foi significativa e extremamente prejudicial para os dois híbridos avaliados, para todas as variáveis analisadas.

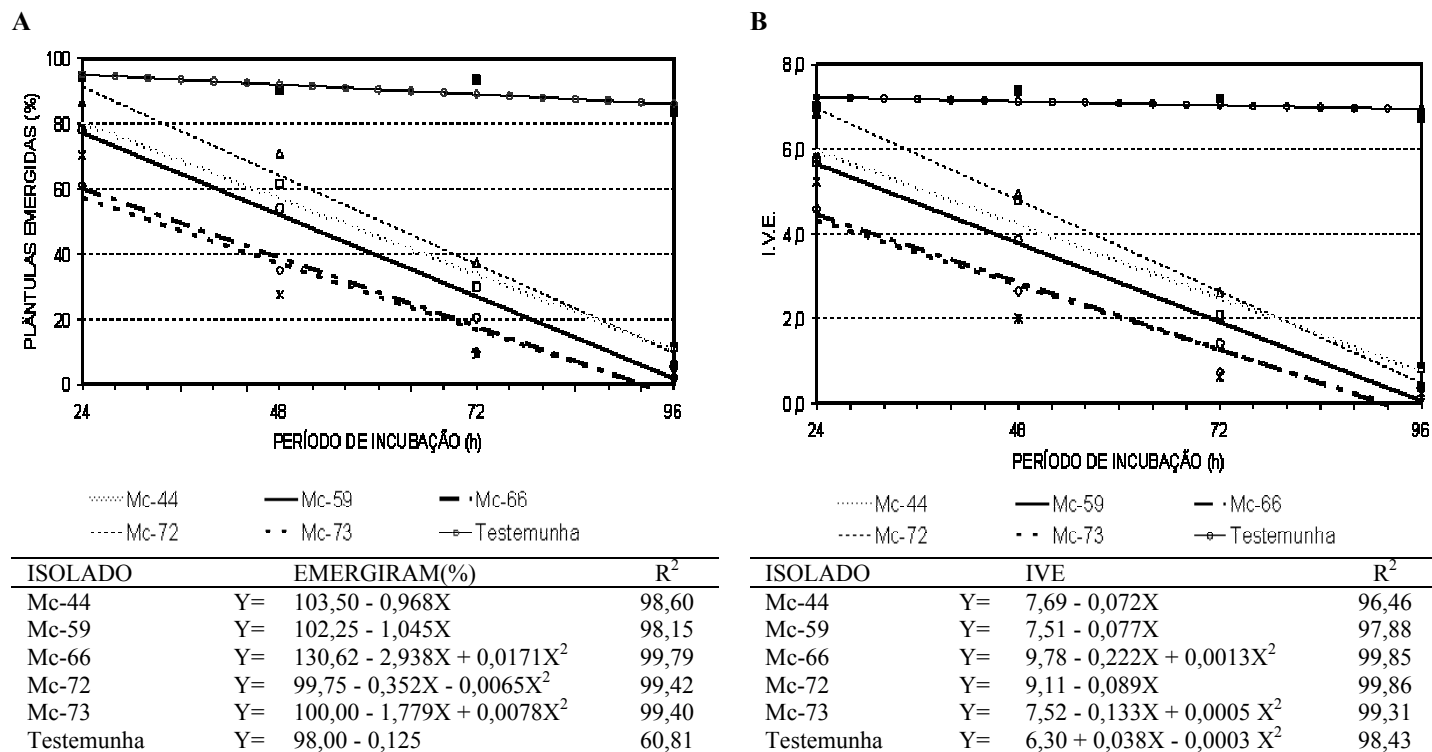
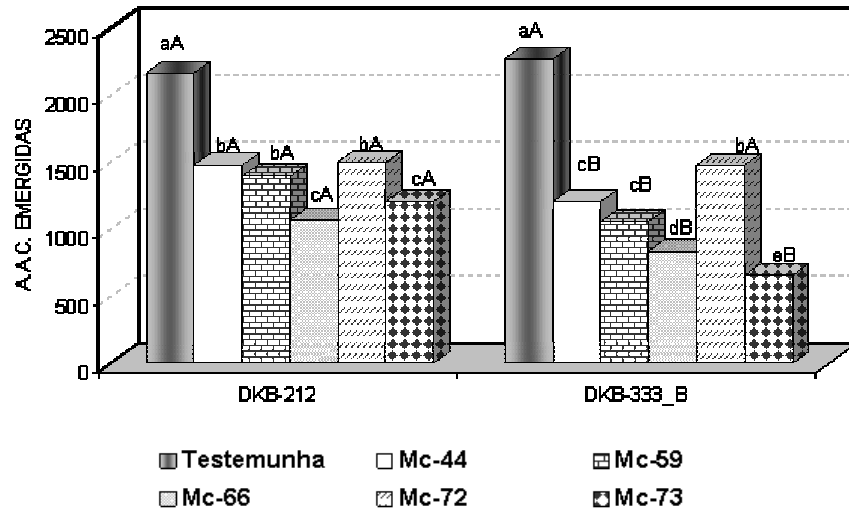


FIGURA 4: Porcentagem de plântulas emergidas aos 14 DAS (A) e do índice de velocidade de emergência (IVE) (B), obtidas de lotes de sementes de diferentes híbridos de milho, inoculadas com os isolados de *S. macrospora* e no lote testemunha, sem inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



B

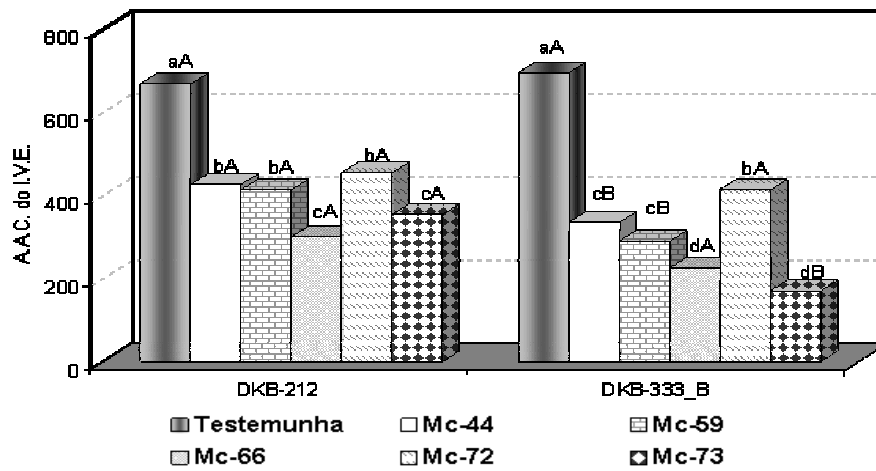


FIGURA 5: AAC da porcentagem de plântulas emergidas aos 14 DAS (A) e do índice de velocidade (IVE) (B) obtida de lotes de sementes dos híbridos DKB-212 e DKB-333-B, inoculadas com os isolados de *S. macrospora* e no lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula entre os isolados e maiúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

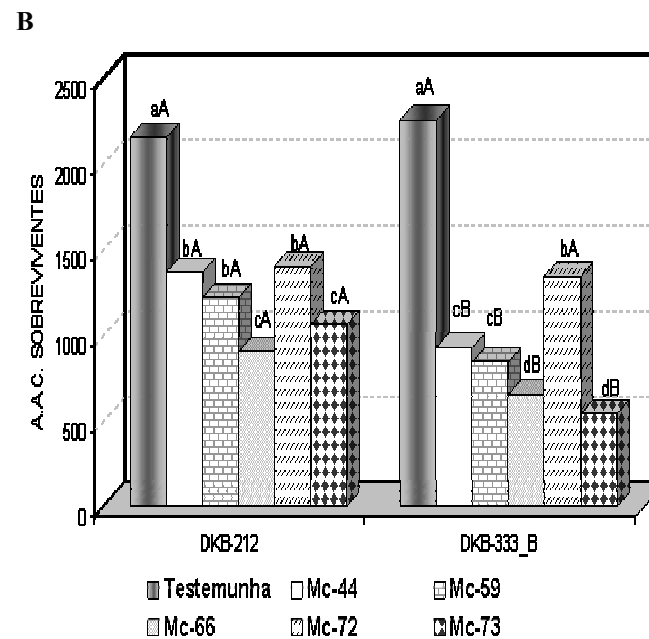
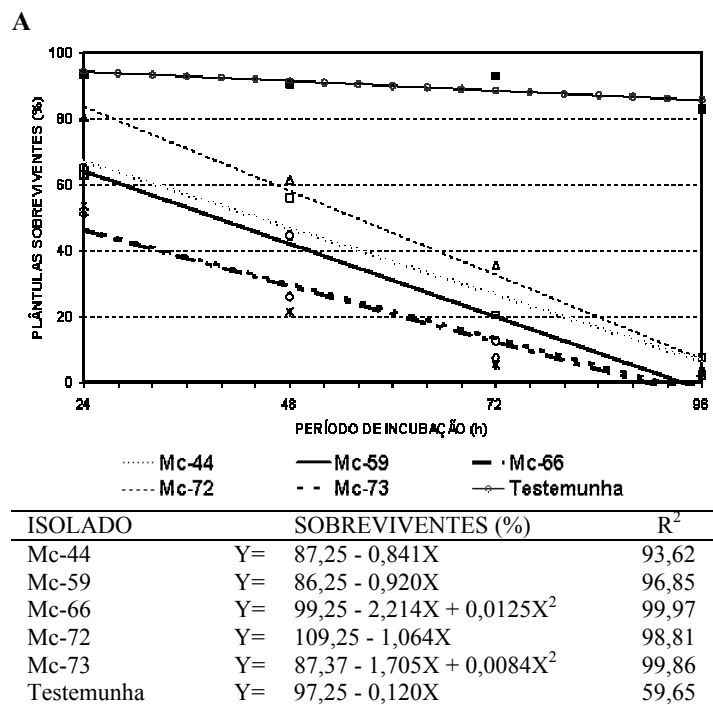


FIGURA 6: Porcentagem de plântulas sobreviventes aos 33 DAS, independente do híbrido inoculado (A) e da AAC da porcentagem de plântulas sobreviventes aos 33 DAS, obtidas de lotes de sementes dos híbridos DKB-212 e DKB-333-B, inoculadas com os isolados testados e no lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula, entre os tratamentos e maiúscula dentro do tratamento, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

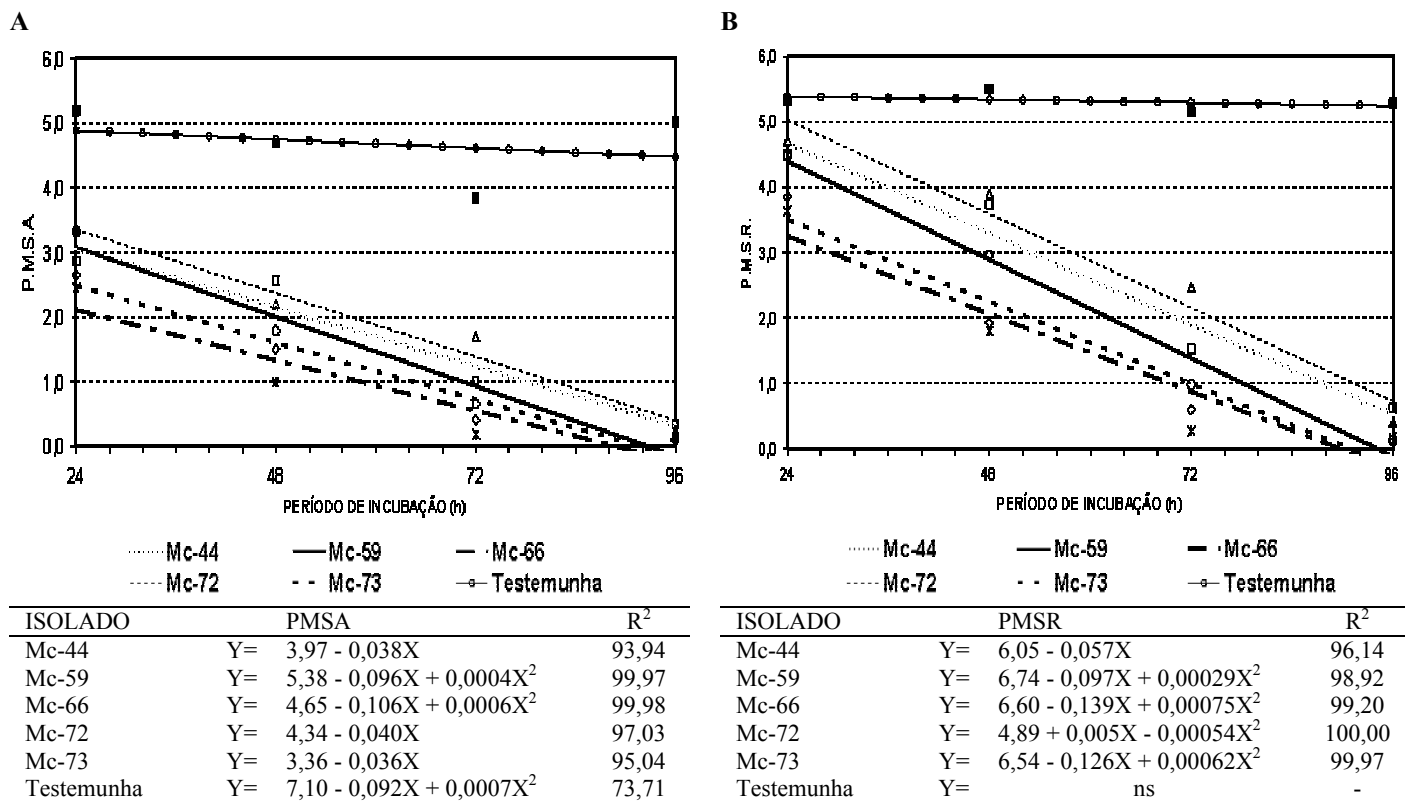
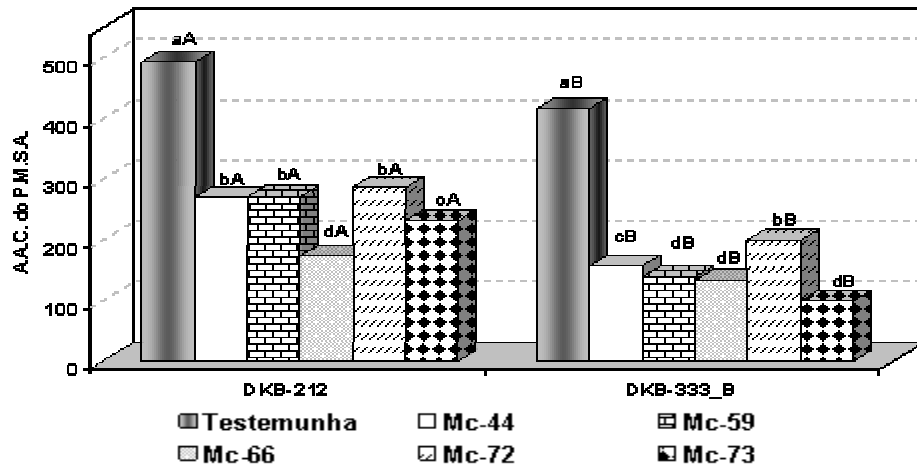


FIGURA 7: Peso de matéria seca da parte aérea (PMSA) (A) e do PMSR (B) em gramas, obtidos de lotes de sementes de milho, inoculadas com os isolados de *S. macrospora* avaliados e no lote testemunha, sem inoculação, independente do híbrido utilizado. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



B

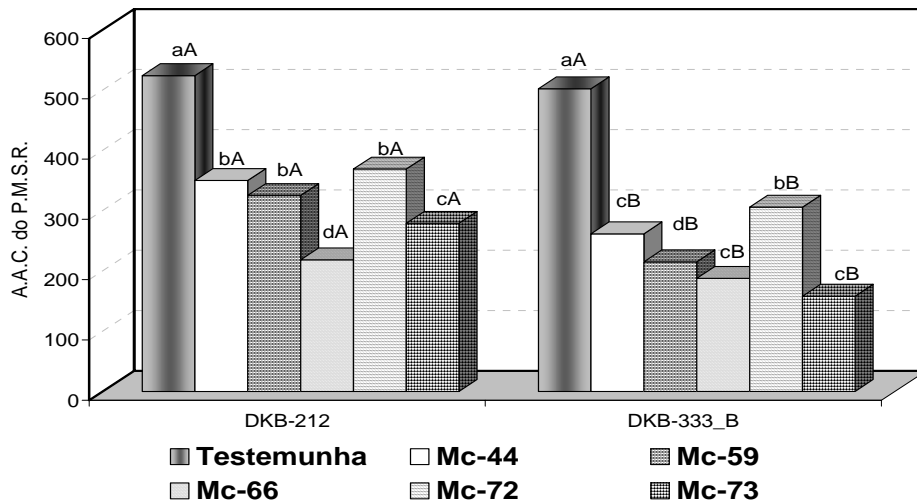


FIGURA 8: AAC da porcentagem do peso de matéria seca da parte aérea (PMSA) (A) e do PMSR (B) obtida de lotes de sementes dos híbridos DKB-212 e DKB-333-B, inoculadas com isolados de *S. macrospora* e no lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula entre os isolados e maiúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.3 Ocorrência e efeito dos isolados de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho inoculadas via restrição hídrica

Pelo teste de sanidade aplicado, incubação em substrato de papel, após análise dos dados, verificou-se que as interações entre híbridos x isolados, híbrido x tempo de exposição e isolado x tempo de exposição foram significativas para a incidência de *S. maydis* (Tabela 4A).

No teste de germinação em rolo de papel verificou-se efeito significativo, pelo teste de F ($P \leq 0,01$), nas interações entre híbridos x isolados, híbrido x tempo de exposição e isolado x tempo de exposição, para as variáveis plântulas normais e ISD (Tabela 4A).

Verificou-se que à medida que aumentou o tempo de exposição das sementes de milho aos isolados de *S. Maydis*, aumentou a incidência desse patógenos nas sementes, para os híbridos DKB-214 e DKB-333-B. Os isolados May-57 e May-74 apresentaram, em média, maior porcentagem de incidência de *S. maydis* (Figuras 9A e 9B). No tratamento testemunha, não foi detectada a presença do patógeno em estudo (Figuras 9A e 9B), nem plântulas de milho com sintomas característicos de podridão.

Os cinco isolados de *S. maydis* utilizados influenciaram negativamente a porcentagem de plântulas normais e aumentaram o ISD, à medida que o tempo de exposição das sementes ao fungo foi aumentada, independente do híbrido avaliado (Figuras 10A e 10B).

A porcentagem de plântulas normais em relação à testemunha foi menor, para todos os lotes de sementes inoculados e para o híbrido DKB-214, no qual não houve diferença estatística significativa entre a testemunha não inoculada e os lotes de sementes inoculados com os isolados May-43 e May-46 (Figura 11A).

Quanto ao ISD, não houve diferença estatística significativa, no lote testemunha, entre os híbridos DKB-214 e DKB-333-B, e entre a testemunha e o lote o inoculado com o isolado May-43, para o híbrido DKB-214 (Figura 11B). Os isolados May-48, May-57 e May-74 proporcionaram significativamente, maior ISD nas sementes do híbrido DKB-214 inoculadas e os isolados May-57 e May-74 foram que mais incrementaram o ISD, nas sementes do híbrido DKB-333-b (Figura 11B).

Resultado análogo foi encontrado por Carvalho (1999), ao estudar o uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro. Esse autor verificou que, com o aumento do tempo de exposição das sementes de feijoeiro ao fungo, aumentou a incidência e a severidade de doença em plântulas.

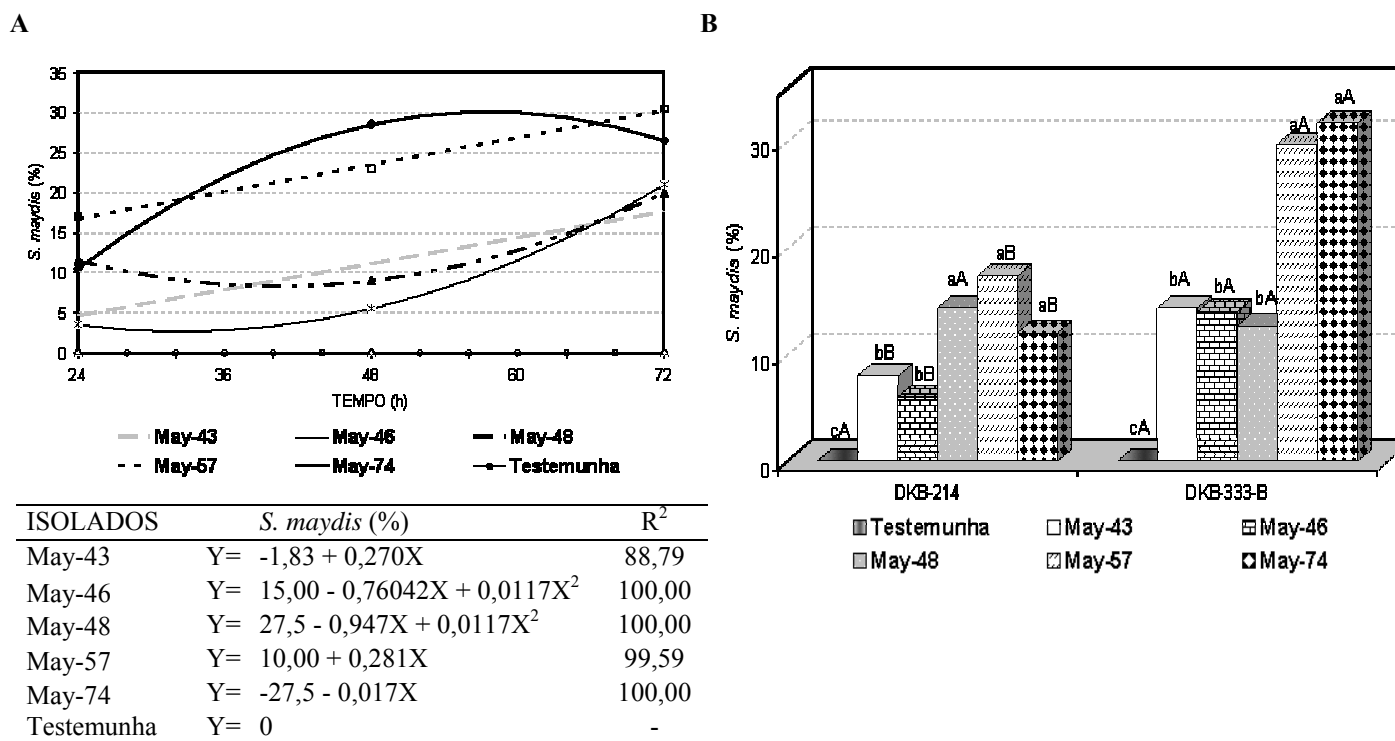
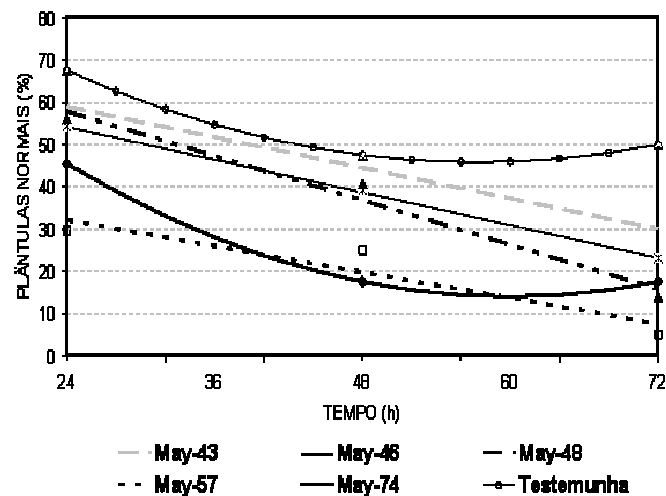


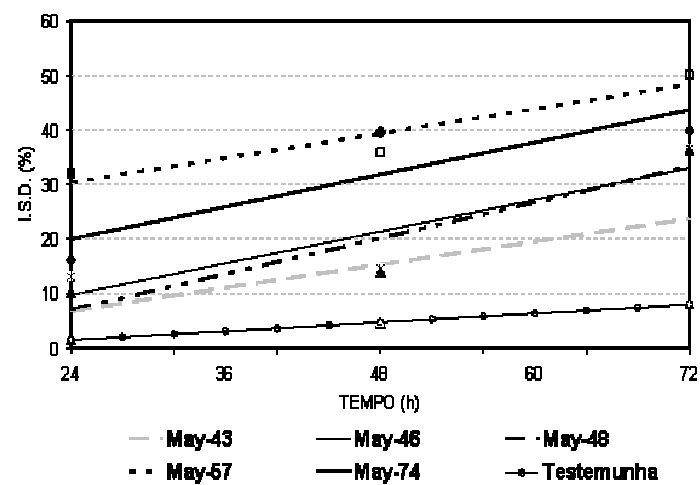
FIGURA 9: Incidência média de cinco isolados de *S. Maydis*, em porcentagem, detectada em lotes de sementes dos híbridos DKB-214 e DKB-333-B, nos períodos de incubação de 24, 48, 72 e 96 horas (A) e incidência de *S. maydis* em sementes de milho inoculadas e no lote testemunha, sem inoculação (B). As médias com a mesma letras minúscula entre os isolados e maiúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



ISOLADOS	Plântulas normais (%)	R ²
May-43	Y= 73,5 - 0,604X	98,59
May-46	Y= 69,66 - 0,645X	99,97
May-48	Y= 78,83 - 0,875X	97,76
May-57	Y= 44,33 - 0,510X	88,23
May-74	Y= 101,50 - 2,916X + 0,0243X ²	100,00
Testemunha	Y= 110,00 - 2,239X + 0,0195X ²	100,00

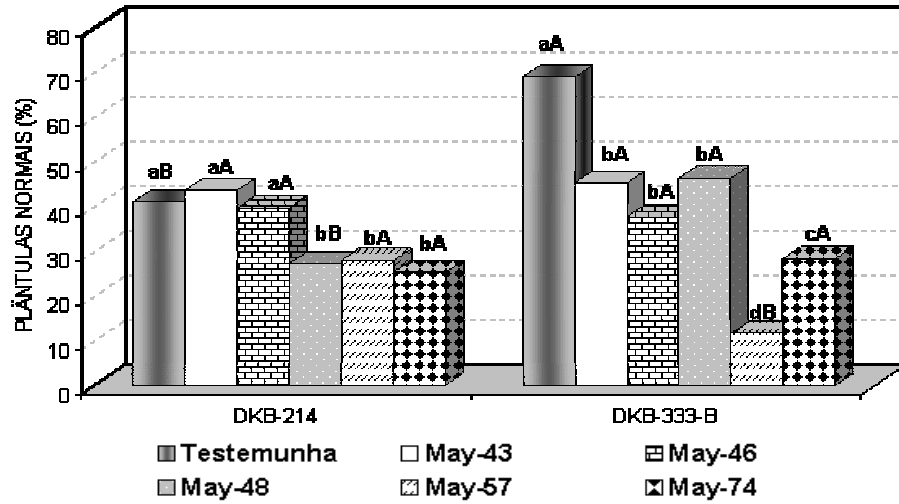
B



ISOLADOS	ISD (%)	R ²
May-43	Y= -1,57 + 0,352X	99,81
May-46	Y= -1,89 + 0,485X	79,59
May-48	Y= -6,07 + 0,547X	85,44
May-57	Y= 21,36 + 0,375X	90,11
May-74	Y= 8,19 + 0,493X	75,65
Testemunha	Y= -1,76 + 0,135X	99,78

FIGURA 10: Porcentagem média de plântulas normais (A) e índice de severidade de doença (ISD) (B) em lotes de sementes de milho, inoculadas com isolados de *S. maydis*, independente do híbrido avaliado e no lote testemunha, sem inoculação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



B

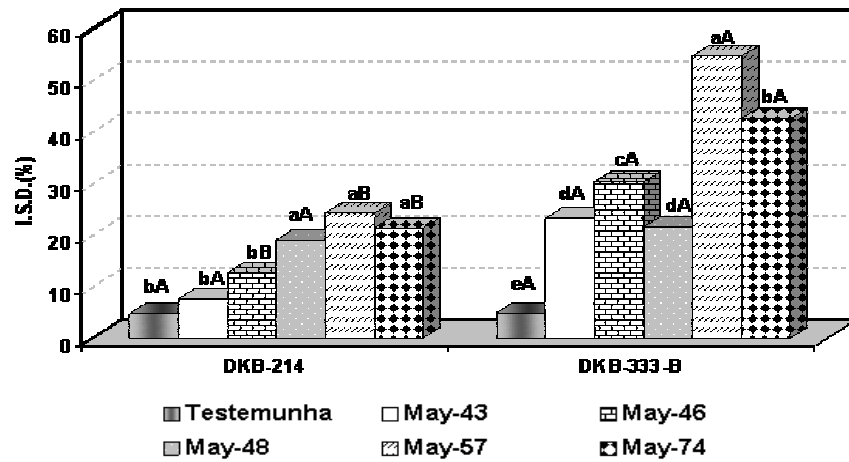


FIGURA 11: Porcentagem de plântulas normais (A) e do índice de severidade de doença (ISD) (B) em lotes de sementes do híbrido DKB-214 e DKB-333-B, inoculadas com isolados de *S. maydis* e lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula entre os isolados e maiúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.4 Efeito de *Stenocarpella maydis* em sementes de dois híbridos de milho avaliados pelo método de ‘emergência em solo/areia’

No teste de emergência, em substrato areia:solo (1:1), observou-se que todas as interações foram significativas, exceto a interação entre híbrido x tempo de exposição, para as variáveis porcentagem de plântulas sobreviventes, o IVE, o PMSA e o PMSR e isolado x tempo de exposição e a interação tripla, para a variável PMSA (Tabela 4A), pelo teste de F ($P \leq 0,01$).

Observou-se influencia negativa de alguns isolados, tanto na porcentagem de plântulas emergidas, quanto no IVE (Figuras 12A e 12B). Os isolados May-43, May-46 e May-48 não influenciaram a emergência de plântulas e nem o IVE, para o híbrido DKB-214 (Figuras 13A e 13B). Em relação a essas variáveis, para o híbrido DKB-333-B, apenas as sementes inoculadas com o isolado May-48 não diferiram estatisticamente da testemunha (Figuras 13A e 13B). Os lotes de sementes de ambos os híbridos inoculados com May-57 e May74 apresentaram alta incidência de *S. maydis* e, em consequência, menor porcentagem de plântulas emergidas e IVE (Figuras 13A e 13B). Esses resultados, de certa forma, contradizem os obtidos por Machado *et al.* (2001), que não verificaram comprometimento na germinação das sementes de milho, com índice de plântulas com lesões de 40%. Entretanto, confirmam os estudos realizados por Pinto (1998) que caracterizou *S. maydis* como um fungo altamente agressivo no estágio de germinação, podendo ocasionar a morte do embrião e o tombamento de plântulas.

A sobrevivência de plântulas aos 35 DAS foi influenciada negativamente pelo tempo de exposição das sementes ao fungo (Figura14A), exceto os lotes de sementes do híbrido DKB-212 inoculados com May-43, May-46 e May-48. Esses lotes comportaram-se estatisticamente iguais à testemunha (Figura 14B). Resultados semelhantes foram obtidos por Machado *et al.* (2001), que

constataram a redução no estande aos 21 dias após germinação, à medida que o potencial foi reduzido de 0 a -1,2 MPa.

As variáveis PMSA e PMSR também foram influenciadas negativamente pela inoculação de *S. maydis*, à medida que aumentou-se o tempo de exposição das sementes aos isolados (Figuras 15A e 15B). Os híbridos DKB-214 e DKB-333-B inoculados sofreram redução no PMSA e no PMSR, em relação à testemunha não inoculada. Entretanto, o lote de sementes do híbrido DKB-214 inoculado com o isolado May-48 não diferiu do tratamento testemunha (Figuras 16A e 16B).

A incubação das sementes de milho pela técnica da restrição hídrica modificada, utilizando-se uma matriz de BDA sobre papel germitest, a um potencial de -1,4 MPa por até 72 horas, proporcionou o envigoreamento (efeito *priming*, condicionamento osmótico ou condicionamento fisiológico) apenas do híbrido DKB-333-B, na ausência de *S. maydis*. Efeito esse observado por Teixeira (2001), ao avaliar a transmissibilidade e o efeito de *Acremonium strictum*, em sementes de milho, utilizando a restrição hídrica convencional no mesmo potencial osmótico. Observou-se que, para o híbrido DKB-214, o efeito da incubação foi negativo, provavelmente, pela incidência de *F. verticillioides* ou pelo baixo vigor das sementes.

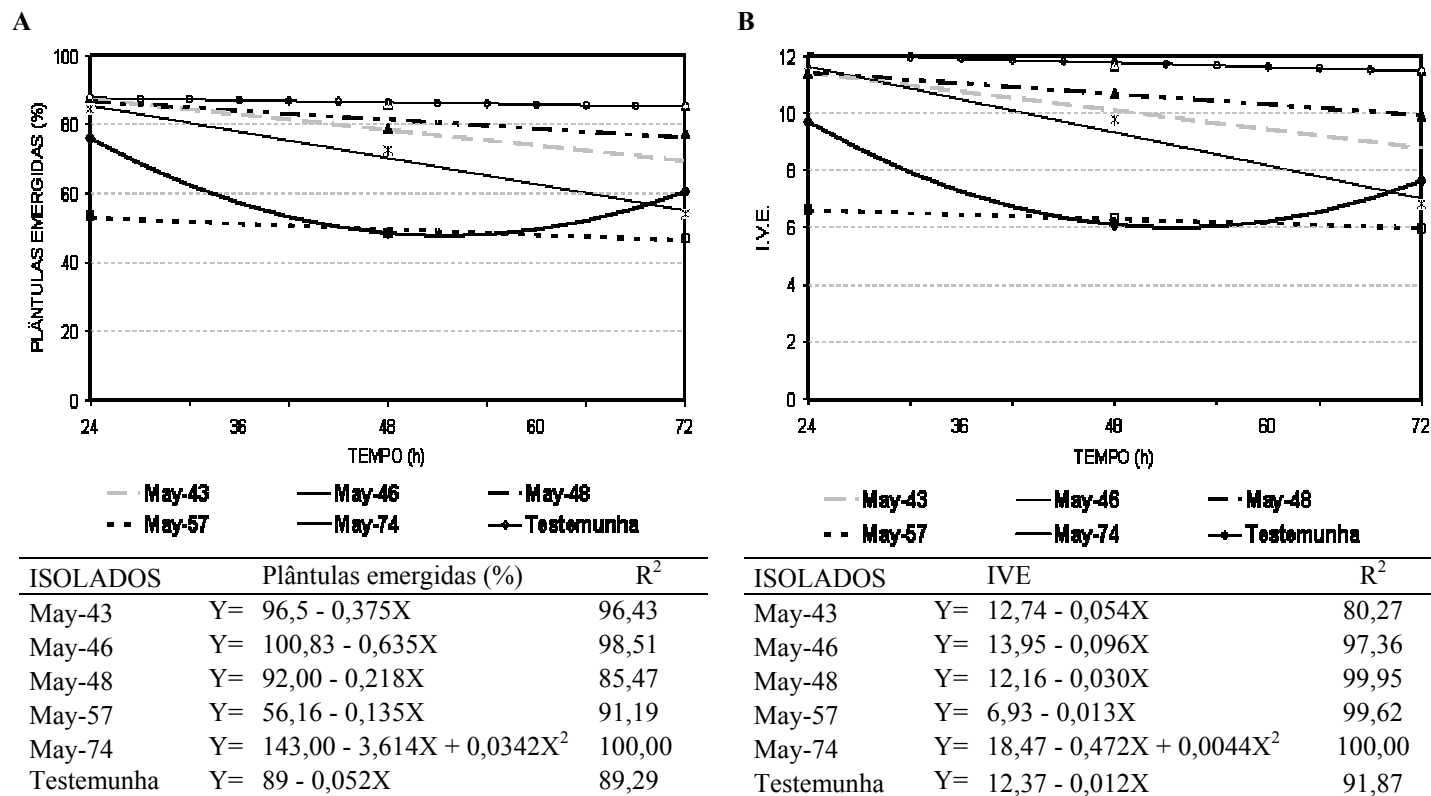
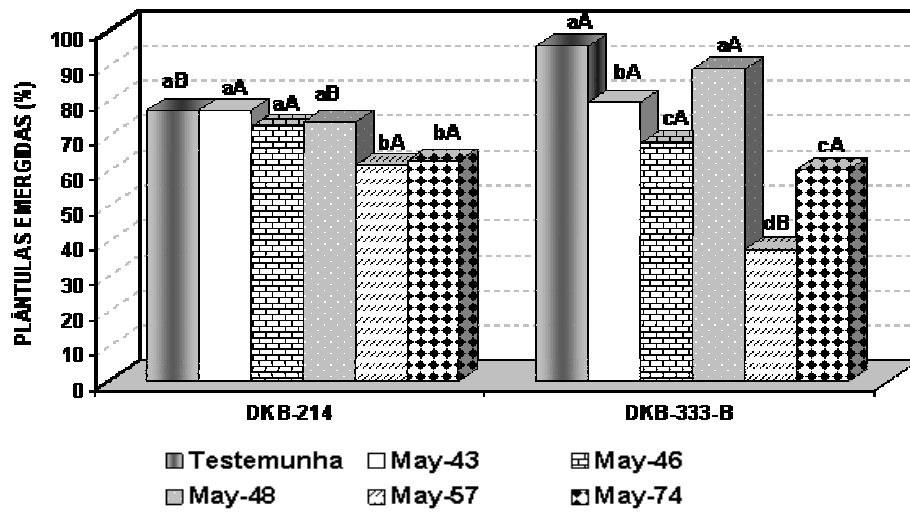


FIGURA 12: Porcentagem de plântulas emergidas aos 12 DAS (A) e do índice de velocidade de emergência (IVE) (B), obtida de lotes de sementes de milho, inoculadas com isolados de *S. maydis* e no lote testemunha, sem inoculação, independente dos híbridos avaliados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



B

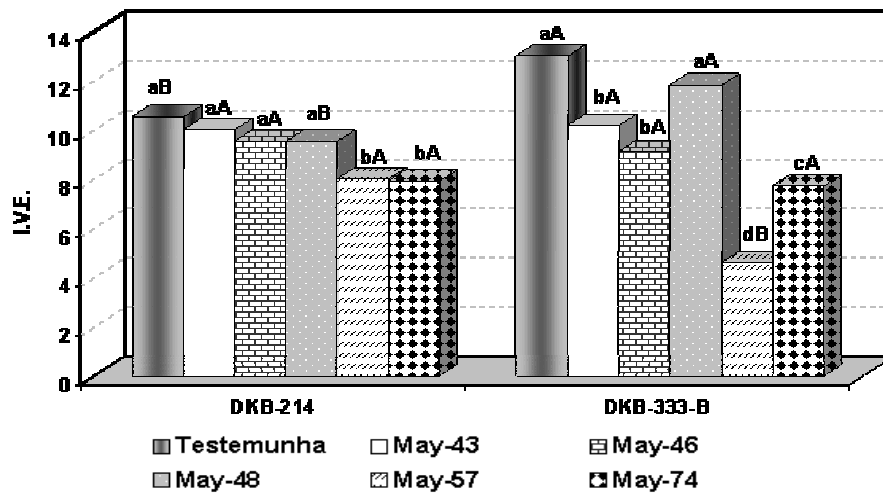


FIGURA 13: Porcentagem de plântulas emergidas aos 12 DAS (A) e do índice de velocidade de emergência (IVE) (B), obtida de lotes de sementes dos híbridos DKB-214 e DKB-333-B inoculadas com isolados de *S. maydis* e lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula entre os isolados e maiúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

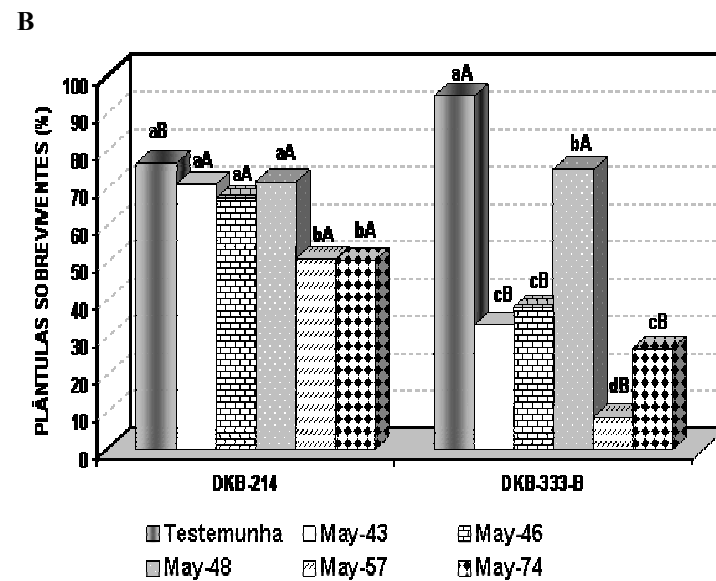
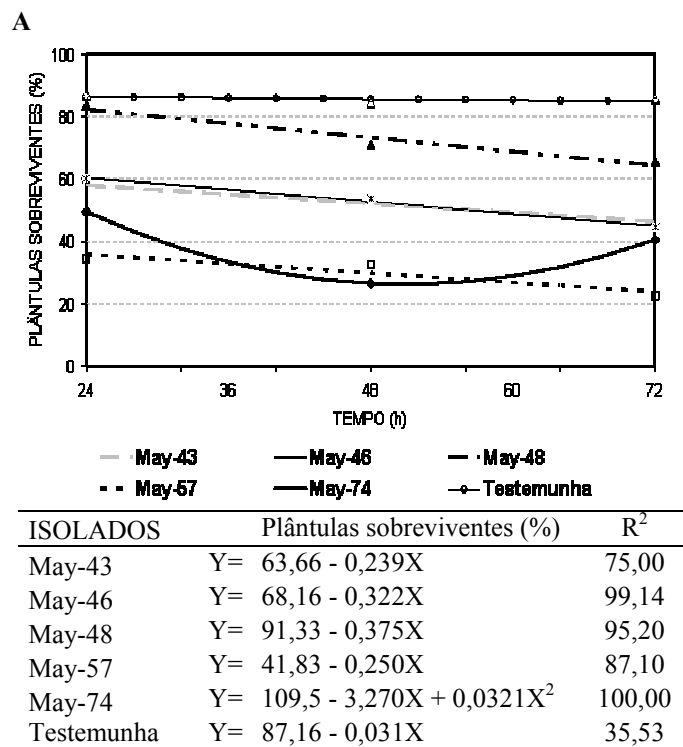
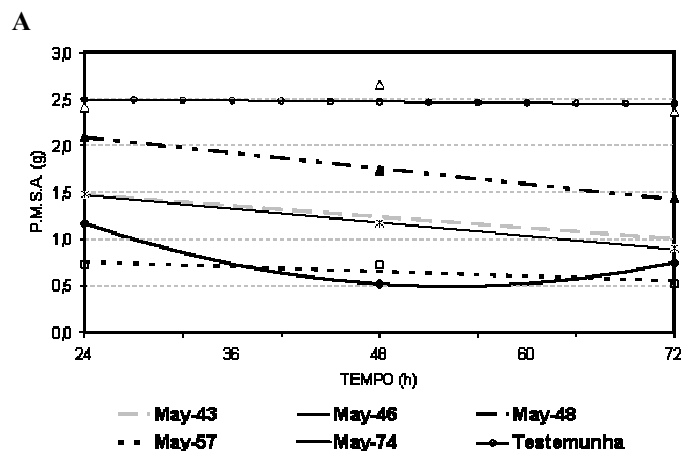
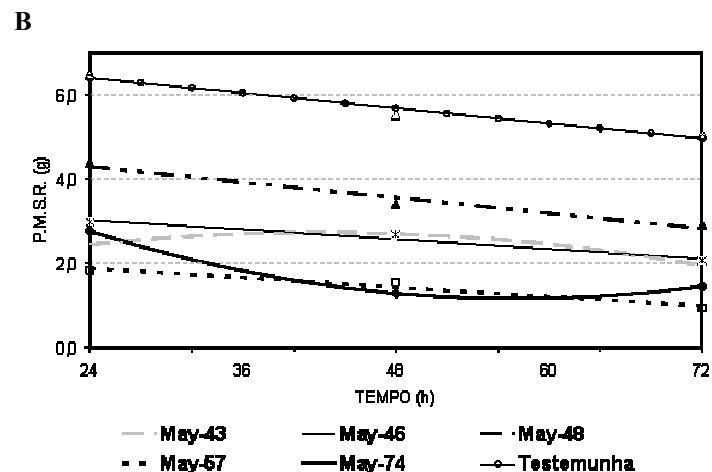


FIGURA 14: Porcentagem de plântulas sobreviventes aos 35 DAS em relação ao tempo de exposição (A) e da porcentagem de plântulas sobreviventes, obtida de lotes de sementes dos híbridos DKB-214 e DKB-333-B, inoculadas com isolados de *S. maydis* e no lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula entre os isolados e maiúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.



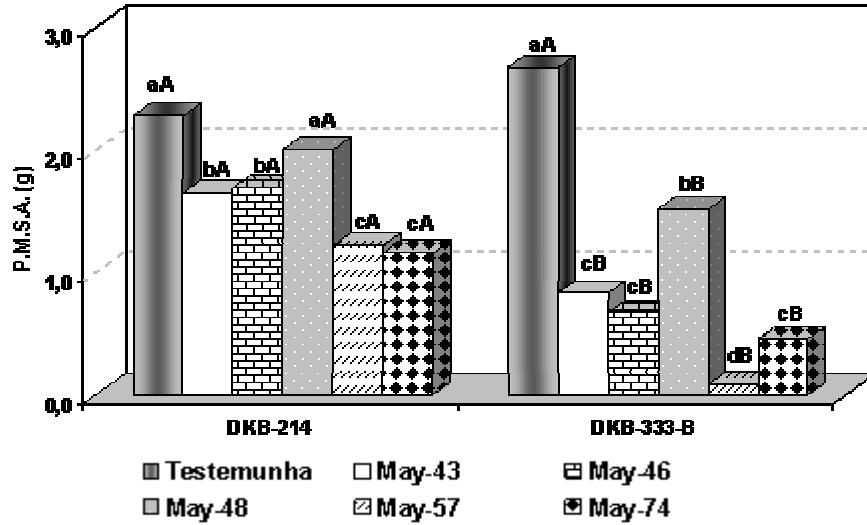
ISOLADOS	PMSA (g)	R ²
May-43	Y= 1,71 - 0,009X	98,16
May-46	Y= 1,75 - 0,012X	99,89
May-48	Y= 2,42 - 0,013X	99,75
May-57	Y= 0,85 - 0,004X	76,86
May-74	Y= 2,70 - 0,082X + 0,0007X ²	100,00
Testemunha	Y= 2,51 - 0,0009X	ns



ISOLADOS	PMSR (g)	R ²
May-43	Y= 1,16 + 0,074X - 0,0008X ²	100,00
May-46	Y= 3,49 - 0,019X	96,33
May-48	Y= 5,03 - 0,030X	96,31
May-57	Y= 2,33 - 0,018X	95,94
May-74	Y= 5,88 - 0,164X + 0,0014X ²	100,00
Testemunha	Y= 7,13 - 0,030X	96,52

FIGURA 15: Peso de matéria seca da parte aérea (P.M.S.A) (A) e do PMSR (B), em gramas, obtido de lotes de sementes de milho inoculadas com os isolados de *S. maydis* e no lote testemunha, sem inoculação, independente do híbrido utilizado. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



B

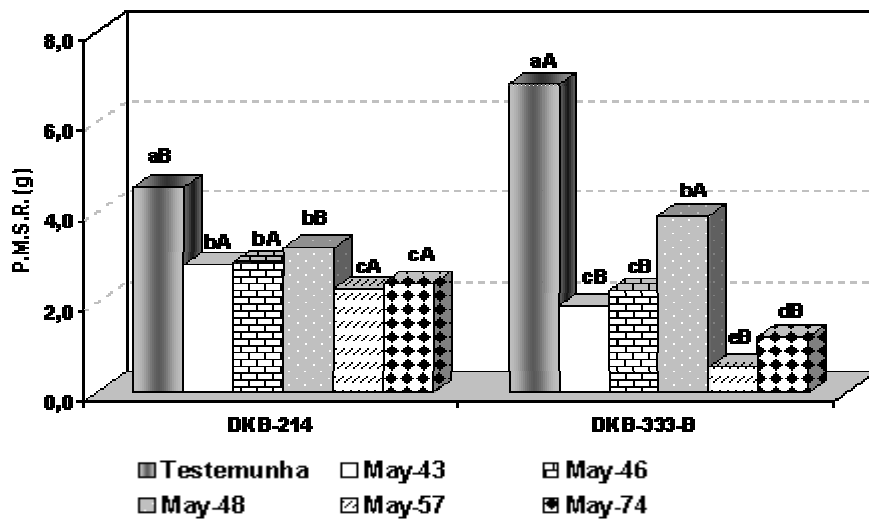


FIGURA 16: Peso de matéria seca da parte aérea (PMSA) (A) e do PMSR (B), em gramas, obtidos de lotes de sementes dos híbridos DKB-214 e DKB-333-B inoculadas com isolados de *S. maydis* e no lote testemunha, sem inoculação. As médias com a mesma letra minúscula entre os isolados e maiúscula entre os híbridos não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

6 CONCLUSÕES

1. Todos os isolados de *S. macrospora* afetaram a germinação, o índice de velocidade de emergência, a emergência de plântulas, a sobrevivência de plântulas, o peso de matéria seca. Os efeitos são mais pronunciados à medida que aumenta o tempo de exposição das sementes ao inóculo fúngico.
2. O isolado de *S. macrospora* Mc-73 proporcionou o maior aumento no índice de severidade de doença e redução na porcentagem de plântulas emergidas e sobreviventes, no índice de velocidade de emergência, no peso de matéria seca em ambos os híbridos avaliados.
3. Apenas os isolados May-57 e May-74, de *S. maydis* afetaram a germinação, o índice de velocidade de emergência, a emergência de plântulas, a sobrevivência de plântulas, o peso de matéria seca da parte aérea e o de raiz do híbrido DKB-212.
4. Todos os isolados de *S. maydis* afetaram a germinação, o índice de velocidade de emergência, a emergência e a sobrevivência de plântulas, o peso de matéria seca do híbrido DKB-333-B, exceto o isolado May-48, que não afetou o IVE e nem a emergência de plântulas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LNARV/SNAD/MA, 1992. 360p.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. Temporal analysis of epidemics I: Description and comparison of disease progress curves. In: CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. Ohio: Wooster, 1990, p.161-202.

CARVALHO, J.B.C. **Uso da restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1999. 98p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia).Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG,.

CASA, R.T. et al. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: SANDINI, I.A.; FANCELLI, A.L. **Milho: Estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. 209p.

EDDINS, A.H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. **Phytopathology**, v.20, p439-448, 1930.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000. São Carlos, SP. **Programa e Resumos**. São Carlos: UFSCar, 2000. p.235.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Incidence of ear rot pathogens under alternating corn tillage practices. **Plant Disease**, v.82, n.7, p.781-784, 1998.

FLETT, B.C.; WEHNER, F.C. Incidence of *Stenocarpilla* na *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **J. Phytopathology**, v.133, n.4, p.237-333, 1991.

KAPPELMAN, A.J.; THOMPSON, D.L.; NELSON, R.R. Virulence of 20 isolates of *Diplodia zeae* as revealed by stalk rot development in corn. **Crop Science**, v.5, p.541-543, 1965.

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

LIMONARD, T.A. Modified blotter test for seed health. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.72, p.319-321, 1966.

LUZ, W.C. **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa/CNPT, 1995. 28p. (Circular Técnica nº: 05).

MACHADO, J.C. et al. **Use of water restriction technique in seed pathology**. Seed Testing International. ISTA News Bulletin n.128. p.14-18. 2004.

MACHADO, J.C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.88-94. 2001.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination in section and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1972.

MÁRIO, J.L.; REIS, E.M.; BONATO, E.R. Reação de híbridos de milho à podridão branca da espiga. **Fitopatologia brasileira**, v.28, n.2, p. 155-158, 2003.

MAXWELL, J.D.; THOMPSON, D.L. Mutual balance between tester resistance and isolate virulence in the evaluation of corn inbreds for Diplodia stalk rot. **Crop Science**, v.14, p.594-595, 1974.

McKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, v.26, n.5, p.195-219, 1923.

MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, v.87, n.1. p.126-130, 1995.

MUNKVOLD, G.P.; O'MARA, J.K. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatment for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. **Plant Disease**, v.86, n.2, p.143-150, 2002.

PINTO, N.F.J.A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1998. 44p.

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

REIS, E.M.; MÁRIO, J.L. Quantificação do inoculo de *Diplodia macropora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar, e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia brasileira**, v.28, n.2, p.143-147, 2003.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VAN WYK, P.S. Fungal associations in corn kernels and effects on germination. **Phytopathology**, v.80, n.2, p.131-134, 1990.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 505-512, Sept. 1974.

SHURTLEFF, M.C.C. **Compendium of maize diseases**. St. Paul: American Phytopathological society, 1992. 105p.

TEIXEIRA, H. **Variabilidade de *Acremonium strictum* e sua transmissibilidade e efeitos em sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 114p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ULLSTRUP, A.J. A method for producing artificial epidemics o *Diplodia* ear rot. **Phytopathology**, v.39, p.93-101, 1949.

YOUNG, H.C. Jr. et al. An ecological study of the pathogenicity of *Diplodia maydis* isolates inciting stalk roto f corn. **Plant Disease Reporter**, v. 43, p.1124-1129, 1959.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton e *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton)

1 RESUMO

A podridão do colmo e a podridão de espigas do milho (*Zea mays* L.) causadas pelos fungos *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton e *Stenocarpella maydis* (Berk.) são de ocorrência ampla, abrangendo toda a região onde a cultura é cultivada. O presente estudo teve como objetivos avaliar as características morfológicas e a viabilidade de marcadores moleculares na diferenciação e caracterização de isolados *S. macrospora* e de *S. maydis*, originários de diferentes regiões brasileiras. Para os estudos de caracterização morfológica, o crescimento miceliano dos isolados das duas espécies foi determinado em placas de Petri plásticas, em quatro meios de cultura distintos, BDA, OA, EMA, CZA (meio Czapek), em dois regimes de temperatura, a 20°C e a 25°C. Além do crescimento miceliano, foram avaliados o número de picnídios/cm² e as características morfológicas dos conídios e picnídios (largura e diâmetro). A caracterização molecular dos isolados de *S. macrospora* e de *S. maydis* foi realizada por meio do seqüenciamento dos produtos de PCR obtidos com *primers* complementares à seqüência fúngica da região ITS do rDNA já publicadas e para o gene que codifica a β -tubulina. Ambos os métodos foram eficientes na diferenciação dos isolados de *S. macrospora* e de *S. maydis*. Entretanto, não foi possível distinguir, com consistência, a origem geográfica dos isolados, a partir das análises de caracterização morfológica e molecular dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2 ABSTRACT

The white ear rot disease of maize (*Zea mays* L.) caused by *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle in Bull.] and *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. Zeae* (Schw.) Lev.], is widely distributed in the hot and wet tropical regions occurring in areas where the crop is cultivated. Those pathogens are responsible for damages to seeds, killing infected plants at the flowering stage and causing significant yield losses and affecting quality of grains. *Stenocarpella* species are also important microorganisms responsible for the production of mycotoxins. “*Diplodiosis*” is associated with the feeding of grain colonized by *Stenocarpella* species in poultry, lambs, and ruminants. The aim of this work was to evaluate the morphological characteristics and molecular markers in the differentiation of *S. macrospora* and *S. maydis* isolates collected in different regions of Brazil. The mycelial growth was measured in Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA), oat-agar (OA), corn extract, and Czapek medium at two temperatures, 20 °C and 25 °C. Evaluation was also made for number of pycnidia/cm² and morphological characteristics of the conidia and pycnidia. The molecular characterization of *S. macrospora* and *S. maydis* isolates was performed by sequencing PCR products obtained with *primers* for rDNA ITS region and for the β -tubulin gene. Both methods were efficient in differentiating *S. macrospora* and *S. maydis* isolates. The results showed that no correlation was found between isolates of *S. macrospora* and *S. maydis* and their geographical origins as detected by morphological and molecular traits.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3 INTRODUÇÃO

As espécies fúngicas *Stenocarpella macrospora* (Earle)(Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle in Bull.] e *S. maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. Zeae* (Schw.) Lev.] pertencem à classe Ascomicetos e ao gênero Botryosphaeria (Denman et al., 2000; Burgess et al., 2001; Burgess et al., 2003; Van Niekerk et al., 2004), embora a fase sexuada ainda não tenha sido relatada para nenhuma das espécies. São agentes causais da podridão do colmo e espigas do milho (*Zea mays* L.), afetando a germinação das sementes, matando prematuramente as plantas infectadas na fase reprodutiva e paralisando o processo normal de enchimento de grãos, o que resulta em queda de produção (Sutton & Waterston;1966; Farr et al., 1989; Luz, 1995; Reis & Casa, 1996; Reis & Casa, 2000). A presença desses fitopatógenos nos grãos de milho reduz a qualidade nutricional das rações, por produzirem micotoxinas responsáveis por intoxicação, conhecidas como “*diplodiosis*”, associadas à alimentação de ruminantes e aves (Latterell & Rossi, 1983; Munkvold & Desjardins, 1997; Reid & Sinha, 1998; Danielsen & Jensen, 1998; Odrizola et al., 2005).

Casa (2000) utilizou o meio batata, sacarose e ágar (BSA), para verificar o efeito da temperatura e do regime luminoso sobre *S. macrospora* e *S. maydis*. Observou que não houve crescimento miceliano de ambos os fungos, nas temperaturas mais baixas, entre 5°C e 10°C, e nem nas temperaturas mais elevadas, entre 40°C e 45°C. Para *S. macrospora*, o maior desenvolvimento do micélio se deu nas temperaturas entre 24,5°C e 27,3°C e, para *S. maydis*, a temperatura ideal para o crescimento miceliano foi em torno de 26,5°C. O mesmo autor observou, ainda, que o isolado de *S. macrospora* adaptou-se melhor à temperatura mais baixa do que o isolado de *S. maydis*. Tanto para *S.*

macrospora quanto para *S. maydis*, o crescimento miceliano foi superior quando se empregou o fotoperíodo de 12 horas.

Considerando-se a importância desses dois fitopatógenos para a cultura do milho, pouca informação acerca da variabilidade genética e características moleculares de isolados dessas duas espécies foi encontrada na literatura. O desconhecimento dessa característica é uma grande limitação em programas de melhoramento de plantas visando resistência às doenças. As alterações fenotípicas observadas em variedades tidas como resistentes que, repentinamente, tornam-se susceptíveis, podem não ser devido a alterações intrínsecas das variedades, mas a modificações genéticas no agente causador da doença (Wheeler, 1976).

Nesse contexto, as técnicas moleculares vêm se tornando ferramentas importantes para o estudo das diferenças genéticas entre os microrganismos, assim como na detecção e identificação destes no solo, nas diferentes partes da plantas e até mesmo em sementes. A utilização dessas técnicas tem grande potencial de aplicação, principalmente nos casos em que há grande semelhança entre os microrganismos, o que resulta em difícil diagnose por meio dos métodos tradicionais e ou, nos casos que demandam longos períodos de incubação, para a realização dos testes de sanidade.

O uso da técnica RAPD (sigla para o inglês *random amplified polymorphic dna*), para a detecção molecular de patógenos, inicialmente descrita por Williams et al. (1990) passou por várias modificações e adaptações, nos últimos anos. Ultimamente, tem sido utilizados *primers* curtos, 10 pb, em RAPD-PCR e baixa temperatura, para a produção de modelos de bandas polimórficas entre indivíduos (Rafalski & Tingey, 1993; Burgess et al., 2001).

A técnica de RAPD foi utilizada na diferenciação de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* patogênicas ao algodão (Assigbetse et al., 1994), na análise genética entre espécies de *Tilletia*, um basidiomiceto, agente causador

do carvão do trigo (Shi et al., 1996) e no estudo da diversidade genética e origem geográfica de populações de *Setosphaeria turcia* Leonard (Anamorph: *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard et Suggs) (Borchardt et al., 1998) e em populações de *Pyrenophora teres* Drechs. (Anamorph: *Drechslera teres* (Sacc) Shoem.) em cevada (Jonsson et al., 2000). Xia & Achar (2001), também utilizaram RAPD na diferenciação de isolados e na detecção de *S. maydis* em sementes de milho.

Nos últimos anos, os avanços nas técnicas de seqüenciamento em larga escala proporcionaram redução nos custos e muitos trabalhos têm adotado a produção de seqüências para as análises filogenéticas de patógenos de plantas e de animais (Edel et al., 1995, Berbee, 2001;).

O DNA ribossomal (rDNA) é uma região do DNA nuclear codificante de ribossomos e suas seqüências têm sido muito utilizadas em estudos filogenéticos de fungos. O gene é interrompido pelas regiões espaçadoras internas do rDNA, *internal transcribed spacer* (ITS), as quais são muito variáveis (Gardes & Bruns, 1993).

A região ITS é conveniente para a identificação molecular de fungos, por possuir de 600 a 800 pb e ser facilmente amplificada com *primer* universal, complementares à seqüência dos genes do rDNA (White *et al.*, 1990). Além disso, as múltiplas cópias naturalmente existentes do rDNA facilitam sua amplificação de pequena quantidade de DNA, de amostras diluídas ou degradadas. A região ITS é, freqüentemente, altamente variável entre espécies de fungos morfológicamente diferentes (Gardes et al., 1991; Baura et al., 1992; Lee & Taylor, 1992; Gardes & Bruns, 1993; Martin & Rygiewicz, 2005).

Embora a região ITS seja o principal alvo, outros genes também são amplamente estudados, em particular o gene da β -tubulina (Glass & Donaldson, 1995; Schütze et al., 1999; Keeling, 2003; Roux et al., 2003; Scott et al., 2004; Zucaro et al., 2004). O gene que codifica a β -tubulina é altamente conservado,

mas, os introns dentro do gene são variáveis e podem ser utilizados em estudos filogenéticos (Glass & Donaldson, 1995; Keeling, 2003; Scott et al., 2004).

O presente estudo teve como objetivos avaliar as características morfológicas de isolados de *S. macrospora* e de *S. maydis* originários de diferentes localidades, caracterizar as seqüências da região ITS e β -tubulina desses isolados e avaliar a viabilidade de marcadores moleculares na diferenciação e caracterização de isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido sob condições controladas nos Laboratórios de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras e de Genética Molecular da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Foram utilizados isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* (Tabela 1) originários de diferentes regiões brasileiras. Os isolados foram cedidos pelo Dr. Ivan Resende (Monsanto do Brasil S.A.), pela Universidade Federal de Pelotas, RS (UFP) e a partir de coletas realizadas em campo.

TABELA 1: Identificação dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*, local de origem e estado. UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADOS	LOCAL	UF	FUNGO
Mc-2	Araguari	MG	<i>S. macrospora</i>
Mc-8	Poços de Caldas	MG	
Mc-39	Sete Lagoas	MG	<i>S. macrospora</i>
Mc-40	Patos de Minas ¹	MG	<i>S. macrospora</i>
Mc-44	Pelotas	RS	<i>S. macrospora</i> ²
Mc-47	Castro	PR	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-50	Conquista	MG	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-51	Iraí de Minas	MG	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-52	Indianópolis	MG	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-54	Três Corações	MG	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-56	Guaíra	SP	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-58	Jardinópolis	SP	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-59	Morro Agudo	SP	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-60	Formosa	GO	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-61	Uberaba	MG	<i>S. macrospora</i>
Mc-62	Uberaba	MG	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-64	Barro Branco	MG	<i>S. macrospora</i>
Mc-65	Iraí de Minas	MG	<i>S. macrospora</i> ¹

Continuação da TABELA 1

Mc-66	Formoso de Goiás	GO	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-67	Balsas	MA	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-69	Mauá da Serra	PR	<i>S. macrospora</i> ¹
Mc-72	Barra Mansa	RJ	<i>S. macrospora</i>
Mc-73	Ingáí	MG	<i>S. macrospora</i>
Mc-267	Sete Lagoas	MG	<i>S. macrospora</i>
Mc-295	Sete Lagoas	MG	<i>S. macrospora</i>
May-17	Poços de Caldas	MG	<i>S. maydis</i>
May-18	Poços de Caldas	MG	<i>S. maydis</i>
May-21	Poços de Caldas	MG	<i>S. maydis</i>
May-38	Sete Lagoas	MG	<i>S. maydis</i>
May-43	Pelotas	RS	<i>S. maydis</i> ²
May-45	Iguatama	PR	<i>S. maydis</i> ¹
May-46	Castro	PR	<i>S. maydis</i> ¹
May-49	Cravinhos	SP	<i>S. maydis</i> ¹
May-55	Jardinópolis	SP	<i>S. maydis</i> ¹
May-57	Morro Agudo	SP	<i>S. maydis</i> ¹
May-68	Mauá da Serra	PR	<i>S. maydis</i> ¹
May-74	Ingáí	MG	<i>S. maydis</i>
May-75	Ingáí	MG	<i>S. maydis</i>
May-271	Sete Lagoas	MG	<i>S. maydis</i>
May-349	Sete Lagoas	MG	<i>S. maydis</i>

Isolados de *S. macrospora* (Mc) e *S. maydis* (May), cedidos pelo ¹Dr. Ivan Resende (Monsanto do Brasil S.A.) e pela ²Universidade Federal de Pelotas.

4.1 Caracterização morfológica de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella Maydis*

O crescimento miceliano das espécies *S. macrospora* e *S. maydis* foi determinado em placas de Petri plásticas de 80 cm de diâmetro, em diferentes meios de cultura, BDA (extrato de 200 g de batata, 18 g de dextrose e 18 g de ágar), OA (30 g de aveia, 18 g de ágar), EMA (extrato 100 g de milho, 18 g de ágar), CZA (meio Czapek) em 2 regimes de temperatura, 20°C e 25°C. O meio Czapek consiste em uma mistura de 3,0 g de NaNO₃, 1,0 g K₂HPO₄, 30,0 g de sacarose, 10 ml de solução mineral e 18 g de ágar, por litro de meio. A solução

mineral é preparada adicionando-se 5,0 g de KCl, 5,0 g de MgSO₄.7H₂O e 0,1 g de FeSO₄.7H₂O, em 100 ml de água destilada (Fernandez, 1993).

Para a caracterização dos isolados de *S. macrospora*, empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, em esquema fatorial 25 isolados x 3 meios de cultura (BDA, OA e CZA) x 2 temperaturas. Para os isolados de *S. maydis*, empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 5 repetições, em esquema fatorial 18 isolados x 4 meios de cultura x 2 temperaturas. As avaliações foram realizadas de 12 em 12 horas, até que o micélio do fungo cobrisse toda a placa. Efetuou-se o cálculo da área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM) e área abaixo da curva do número de picnídios produzidos por cm² (AACP).

As medidas dos conídios e picnídios foram tomadas com o auxílio de uma régua micrométrica acoplada ao microscópio óptico. O comprimento e o diâmetro dos conídios foram multiplicados por um fator de 2,42 µm e o diâmetro (menor e maior) dos picnídios multiplicado por um fator de 9,7 µm.

4.2 Multiplicação dos isolados de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*

Para os estudos de caracterização molecular, foram utilizados 15 isolados de *S. macrospora*, 10 de *S. maydis* (Tabela 1). Adicionalmente, foram utilizados um isolado de *Fusarium verticillioides* e um de *Drechslera sp.*, do município de Uberlândia, MG. Todos os fungos foram isolados de sementes de milho após a incubação em papel de filtro (Limonard, 1966).

A multiplicação dos isolados foi realizada em meio sólido BDA (Acumedia[®]), na proporção de 24 g/l, mais 18 g/l de ágar, cultivados em placas de Petri plásticas, a 27°C, fotoperíodo de 12 horas de luz, durante 7 dias, em câmara incubadora tipo BOD.

4.3 Extração do DNA genômico

Para extração do DNA genômico, utilizou-se micélio dos fungos com 7 dias de incubação em meio BDA, a 25°C. O micélio crescido superficialmente sobre o meio de cultura foi raspado, lavado com água estéril, seco em folhas de papel toalha e congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente, esse micélio foi pulverizado com pistilo em almofariz de louça contendo nitrogênio líquido. Para cada isolado, foram utilizados 50 mg do micélio pulverizado e acondicionados em microtubos de 2 mL. Foram adicionados 900 µL de tampão de extração (0,5 M de NaCl, 10 mM Tri-Cl –pH= 7,5, 10 mM EDTA, 1,0% SDS) ao microtubo de 2 mL, o qual foi agitado por 30 segundos, para homogeneização da amostra. Em seguida, foram adicionados 400 µL de FCI (24 fenol:24 clorofórmio:1 álcool isoamílico), homogeneizados e levados para centrifuga a 13.200 rpm, 4°C, durante 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 10 µL de RNA_{se} e incubados a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 volume de FCI ao microtubo e procedeu-se a uma nova centrifugação por 15 minutos, a 13.200 rpm, 4°C. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo microtubo, ao qual foi adicionado 1 volume de CI (24 clorofórmio:1 álcool isoamílico), levado para centrifuga por 15 minutos. O DNA genômico foi precipitado por meio da adição de 0,7 volume de isopropanol ao sobrenadante, em um novo microtubo e recuperado por centrifugação durante 15 minutos. O DNA foi lavado com uma solução de etanol (70%), seco a 37°C por 30 minutos, ressuspensão em 50 µL solução TE (10 mM de Tris-HCl, pH=8,0; 1 mM de EDTA, pH= 8,0) e armazenado a –20,0°C.

A qualidade do DNA genômico nas amostras, foram verificadas, por meio de eletroforese em gel de agarose (0,7%), preparado em tampão TAE 1x e coloração em brometo de etídio (0,15 mg/mL). O sistema tampão gel/eletrodo

utilizado foi TAE. Em cada poço do gel, foram colocados 2 µL da amostra mais 2 µL de tampão de corrida e 16 µL água miliQ. O marcador de λ *Hind*III foi utilizado como padrão. A corrida foi realizada a 90 V, durante 2 horas. As amostras de DNA foram quantificadas utilizando-se espectrofotômetro da marca Eppendorf, modelo Biophotometer.

4.4 Amplificação do DNA genômico

Após a extração do DNA genômico, os fragmentos foram amplificados por PCR (*polymerase chain reaction*). A reação foi realizada utilizando-se 5 µL do tampão de reação 10X (200 mM Tris-HCl, pH= 8,4; 500 mM de KCl), 1,5 µL MgCl₂ (50 mM), 2 µL do mix dNTP (10 mM de cada dNTP), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5,0 un/µL em tampão de 20mM Tris-HCl, pH= 8,0, 40 mM NaCl; 2 mM Na₃(P04), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glicerol), 38 µL de água milliQ, 1 µL de uma solução 10 µM de cada oligonucleotídio específico para a região ITS (região de espaçadores transcritos internos) de rDNA, ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), mais 2 µL de DNA genômico, na concentração de 200-400 ng/µL (Xia & Achar, 2001; Slippers et al., 2004). A mesma reação também foi realizada para a região que codifica a β -tubulina, sendo utilizados 1 µL de cada oligonucleotídio específico para a rDNA na concentração de 10 µM, β _T2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT 3') e β _T2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') (Glass & Donaldson, 1995; Roux et al., 2003; Scott et al., 2004).

A reação de amplificação foi realizada com um ciclo inicial de 2 minutos a 96⁰C, mais 30 ciclos de 45 segundos a 96⁰C, 30 segundos a 50⁰C e 2

minutos a 68⁰C, seguido de um ciclo final e 4 minutos a 68⁰C, em um termociclador Peltier Thermal Cycler – PTC-100[®].

Os produtos da PCR, após eletroforese em gel de agarose 0,7% e coloração com brometo de etídio (0,1 mg/mL), foram visualizados em luz UV, fotografados no equipamento de fotodocumentação Egle Eye[™] II – Stratagene[®]. Posteriormente, efetuou-se a purificação dos produtos de PCR utilizando-se o sistema de purificação “Wizard[®] PCR *clean-up system*” (Promega).

4.5 Reação de seqüenciamento das regiões amplificadas

A reação para o seqüenciamento do DNA foi preparada em gelo, misturando-se 1 µL do oligonucleotídio específico para a região (ITS1, ITS4, β_T2a ou β_T2b) na concentração de 32 µM, 1 µL do tampão de reação 5X (*Big Dye[®] Terminator V1.1, V3.1*), 2 µL de *Big Dye*, 2 µL de de água Milli Q e 4 µL do DNA em estudo (200 a 400 ng/µL) em um microtubo. A reação de amplificação foi realizada com 25 ciclos, nas mesmas condições descritas anteriormente (item 4.4).

A purificação da reação de sequenciamento foi realizada adicionando-se 80 µL de isopropanol (65%) ao microtubo, misturando-se 3 vezes suavemente por inversão do microtubo. Esse foi colocado em repouso por 15 minutos, à temperatura ambiente. O microtubo foi levado para a centrífuga por 40 minutos (3.400 rpm a 20°C). O sobrenadante foi descartado, por inversão do microtubo em papel toalha durante 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de etanol (60%), levado à centrifuga por 10 minutos (3.400 rpm a 20°C) e o sobrenadante foi descartado, tendo esse procedimento sido repetido por duas vezes. O microtubo foi deixado para secar, à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador ABI-3.700 (*Applied Biosystems*).

4.6 Análise das seqüências

A qualidade das seqüências produzidas foi analisada pelo programa *Electropherogram Quality Analysis* (<http://genoma.embrapa.br/phph>), tendo todas as seqüências apresentado mais de 350 pb (Phred \geq 20).

As seqüências consenso, resultantes do seqüenciamento das duas fitas de DNA (*forward* e *reverse*) foram obtidas por meio de análises no programa SeqMan™ II (*Export Sequence Analysis Software* – DNASTAR).

O alinhamento e a comparação das seqüências foi realizado utilizando-se o programa *Clustalw* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004; <http://www.megasoftware.net/>), com *bootstrap* de 1.000 repetições.

4.7 Análise estatística dos dados

Para a caracterização morfológica, foi realizada uma análise de variância para as variáveis área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM) e área abaixo da curva do número de picnídios produzidos por cm² (AACP). A verificação da distribuição normal dos dados foi feita com auxílio do Software S.A.S. *for Windows* (S.A.S. Institute, Cary, N.C.). As médias foram comparadas pelo Teste Agrupamento de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$ ou $P \leq 0,05\%$, utilizando-se o software SISVAR (Ferreira, 2000).

A análise de formação de grupos hierárquicos aglomerados (GHA), *Agglomerative Hierarchial Clustering* (AHC), uma subárea da análise estatística

multivariada (Klein et al., 1984; Perrière et al., 1996), foi realizada no software XLSTAT-PRO *version 7.5.2.* (copyright© 1995-2004 Addinsoft) em versão disponível (<http://www.xlstat.com>), com nível de significância $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização cultural e morfológica de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*

Ao avaliar o comportamento dos 25 isolados de *S. macrospora*, sob dois regimes de temperatura, cultivados em meios de cultura diferentes, observou-se, nos resultados da análise de variância para a variável área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM), que houve diferença significativa entre as interações: isolado x temperatura, isolado x meio de cultura meio de cultura, temperatura x meio de cultura e isolado x temperatura x meio de cultura, pelo teste de F ($P \leq 0,01$) (Tabela 4A).

Observou-se que o crescimento miceliano de *S. macrospora*, independente do isolado, foi maior no meio de cultura BDA e no CZA, quando incubados a 25°C (Figura 1A). No meio de cultura OA, a melhor temperatura para crescimento dos isolados foi a de 20°C. O meio de cultura que mais estimulou a reprodução foi o OA, quando os isolados de *S. macrospora* foram incubados a 20°C (Figura 1B). O meio de cultura CZA não favoreceu a formação de picnídios e também foi o que apresentou os piores resultados de crescimento miceliano, em termos absolutos.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Casa (2000), ao estudar o efeito da temperatura e do regime luminoso no crescimento de micélio, germinação de conídios e liberação de cirro de *S. macrospora* e *S. maydis*, em que foi observado que o maior crescimento miceliano desses fungos ocorreu em meio de cultura BSA, numa faixa de temperatura de 23°C a 28°C, com fotoperíodo de 12 horas.

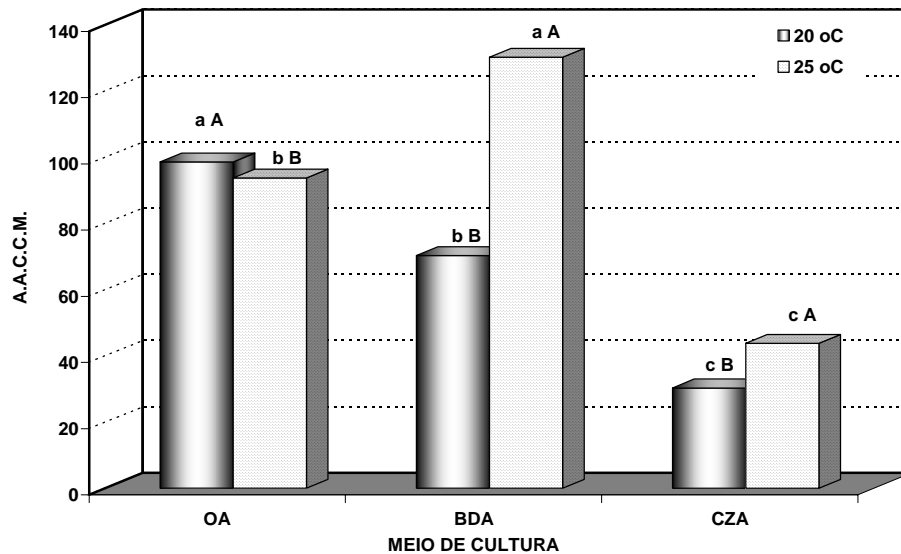
Quanto ao crescimento miceliano, observou-se que, independente da temperatura de incubação, a AACM dos isolados de *S. macrospora* variou de

65,5 a 140,7 cm² no meio OA, 25,1 a 161,7 cm² no meio BDA e 14,7 a 57,9 cm² no meio CZA (Tabela 2). De maneira geral, os meios de cultura OA e BDA proporcionaram condições nutricionais mais favoráveis ao desenvolvimento dos isolados de *S. macrospora* do que o meio CZA. O meio de cultura também influenciou a produção de picnídios. Observou-se que, no meio OA, a produção de picnídios variou de 0,19 a 4,69 picnídios/cm², em BDA de 0,0 a 0,94 picnídios/cm² e em CZA não houve formação de picnídios (Tabela 2).

A temperatura de incubação, independente do meio de cultura, para o fator crescimento miceliano dos isolados de *S. macrospora*, foi de 25°C (Tabela 3). Entretanto, os isolados Mc-65 e Mc-295 apresentaram maior crescimento miceliano a 20°C e vários outros isolados tiveram crescimento miceliano similar nas duas temperaturas testadas (Tabela 3).

Pela análise dos GHA, calculados pelo coeficiente de dissimilaridade de correlação de Pearson, entre todas as características avaliadas, observou-se que houve a formação de cinco grupos com características fisiológicas diferentes (Figura 2). Entretanto, esses resultados não possibilitaram detectar nenhuma associação relacionada à origem geográfica dos isolados.

A



B

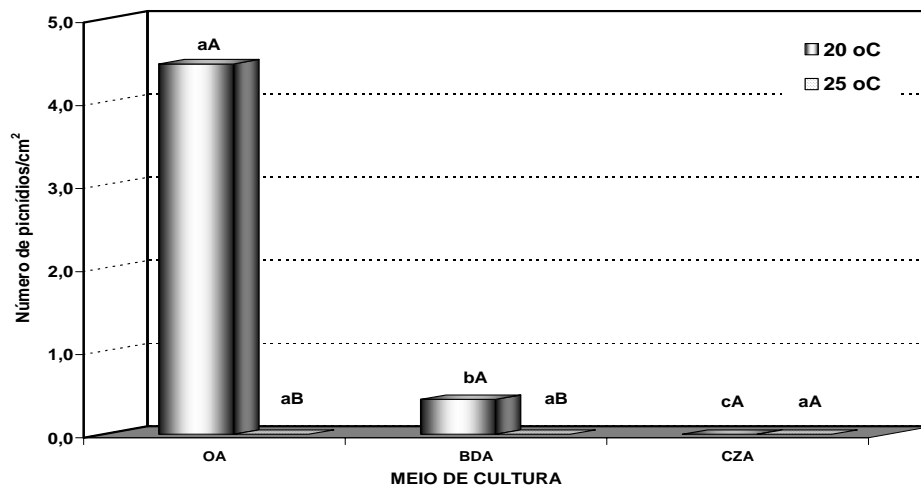


FIGURA 1: (A) Área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM) e (B) número de picnídios/cm² de *S. macrospora* produzidos em BDA, OA e CZA, a 20°C e 25°C. Médias com a mesma letra maiúscula, entre temperaturas e minúsculas, entre meios de cultura, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,001$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 2: AACCM *S. macrospora* e número de picnídios produzidos nos meios de cultura BDA, OA, EMA e CZA, independente da temperatura de incubação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADOS	AACCM						NÚMERO DE PICNÍDIOS/cm ²					
	OA		BDA		CZA		OA		BDA		CZA	
Mc-2	113,6	c A	111,7	d A	55,2	a B	2,16	c A	0,10	b B	0,00	a B
Mc-8	67,5	e A	77,7	f A	22,6	c B	0,19	f A	0,00	b A	0,00	a A
Mc-39	55,4	f B	81,6	f A	29,2	c C	3,25	b A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-40	90,6	d A	95,8	e A	38,4	b B	3,97	b A	0,25	b B	0,00	a B
Mc-44	77,0	e A	71,4	f A	14,7	c B	2,16	c A	1,00	a B	0,00	a C
Mc-47	107,6	c B	139,9	b A	49,9	a C	2,22	c A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-50	95,5	d A	69,4	f B	18,8	c C	2,09	c A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-51	140,4	a A	112,	d B	46,0	a C	3,81	b A	0,50	a B	0,00	a C
Mc-52	80,1	d B	104,7	d A	39,7	b C	3,38	b A	0,19	b B	0,00	a B
Mc-54	134,2	a B	161,7	a A	44,8	a C	0,78	e A	0,94	a A	0,00	a B
Mc-56	93,7	d A	87,3	e A	33,9	b B	4,69	a A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-58	103,1	c A	105,3	d A	38,1	b B	2,31	c A	0,13	b B	0,00	a B
Mc-59	93,5	d A	76,0	f B	40,1	b C	3,66	b A	0,06	b B	0,00	a B
Mc-60	102,5	c A	82,6	f B	32,9	b C	0,43	f A	0,13	b A	0,00	a A
Mc-61	98,9	c A	83,3	f A	22,8	c B	1,87	c A	0,28	b B	0,00	a C
Mc-62	86,1	d A	97,3	e A	36,7	b B	2,19	c A	0,63	a B	0,00	a C
Mc-64	72,0	e A	25,1	g B	24,5	c B	1,22	d A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-65	107,4	c A	99,8	e A	45,7	a B	1,31	d A	0,10	b B	0,00	a B
Mc-66	120,3	b B	148,1	b A	57,9	a C	1,25	d A	0,13	b B	0,00	a B
Mc-67	84,7	d B	120,3	c A	46,1	a C	2,57	c A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-69	72,9	e B	89,4	e A	38,5	b C	1,66	d A	0,72	a B	0,00	a C
Mc-72	104,7	c B	125,1	c A	34,4	b C	1,88	c A	0,06	b B	0,00	a B
Mc-73	91,2	d B	115,0	d A	35,1	b C	1,97	c A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-267	108,3	c B	128,0	c A	44,5	a C	1,19	d A	0,00	b B	0,00	a B
Mc-295	101,5	c A	95,9	e A	34,9	b B	3,50	b A	0,10	b B	0,00	a B
MÉDIAS	96,15	B	100,26	A	37,06	C	2,23	A	0,21	B	0,00	C

Médias com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), P< 0,01 %.

TABELA 3: Média da AACCM e do número de picnídios/cm² de *S. macrospora* crescidos a 20°C e a 25°C, independente do meio de cultura utilizado. UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADOS	AACCM		NÚMERO DE PICNÍDIOS/cm ²	
	20°C	25°C	20°C	25°C
Mc-2	79,3 cB	107,8 bA	1,5 cA	0,0 aB
Mc-8	34,8 fB	77,1 eA	0,1 eA	0,0 aB
Mc-39	26,9 fB	84,1 dA	2,2 bA	0,0 aB
Mc-40	65,9 dB	84,1 dA	2,8 aA	0,0 aB
Mc-44	33,2 fB	75,7 eA	2,1 bA	0,0 aB
Mc-47	102,1 bA	96,3 cA	1,5 cA	0,0 aB
Mc-50	29,7 fB	92,9 cA	1,4 cA	0,0 aB
Mc-51	65,2 dB	134,3 aA	2,9 aA	0,0 aB
Mc-52	71,5 dA	78,3 eA	2,4 bA	0,0 aB
Mc-54	121,8 aA	105,4 bB	1,1 dA	0,0 aB
Mc-56	48,6 eB	94,8 cA	3,1 aA	0,0 aB
Mc-58	80,6 cB	83,8 dA	1,6 cA	0,0 aB
Mc-59	57,4 eB	82,4 dA	2,5 bA	0,0 aB
Mc-60	74,1 dA	71,5 eA	0,4 eA	0,0 aB
Mc-61	30,0 fB	106,9 bA	1,4 cA	0,0 aB
Mc-62	71,0 dA	75,8 eA	1,9 bA	0,0 aB
Mc-64	34,7 fA	45,9 fA	0,8 dA	0,0 aB
Mc-65	92,3 bA	76,5 eB	0,9 dA	0,0 aB
Mc-66	112,4 aA	105,2 bA	0,9 dA	0,0 aB
Mc-67	41,6 eB	126,0 aA	1,7 cA	0,0 aB
Mc-69	45,5 eB	88,5 dA	1,6 cA	0,0 aB
Mc-72	86,4 cA	89,8 dA	1,3 cA	0,0 aB
Mc-73	65,3 dB	95,7 cA	1,3 cA	0,0 aB
Mc-267	96,8 bA	90,5 dA	0,8 dA	0,0 aB
Mc-295	93,0 bA	61,9 fB	2,4 bA	0,0 aB
MÉDIAS	66,4 B	89,2 A	1,6 B	0,0 C

Médias com a mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), P< 0,01%.

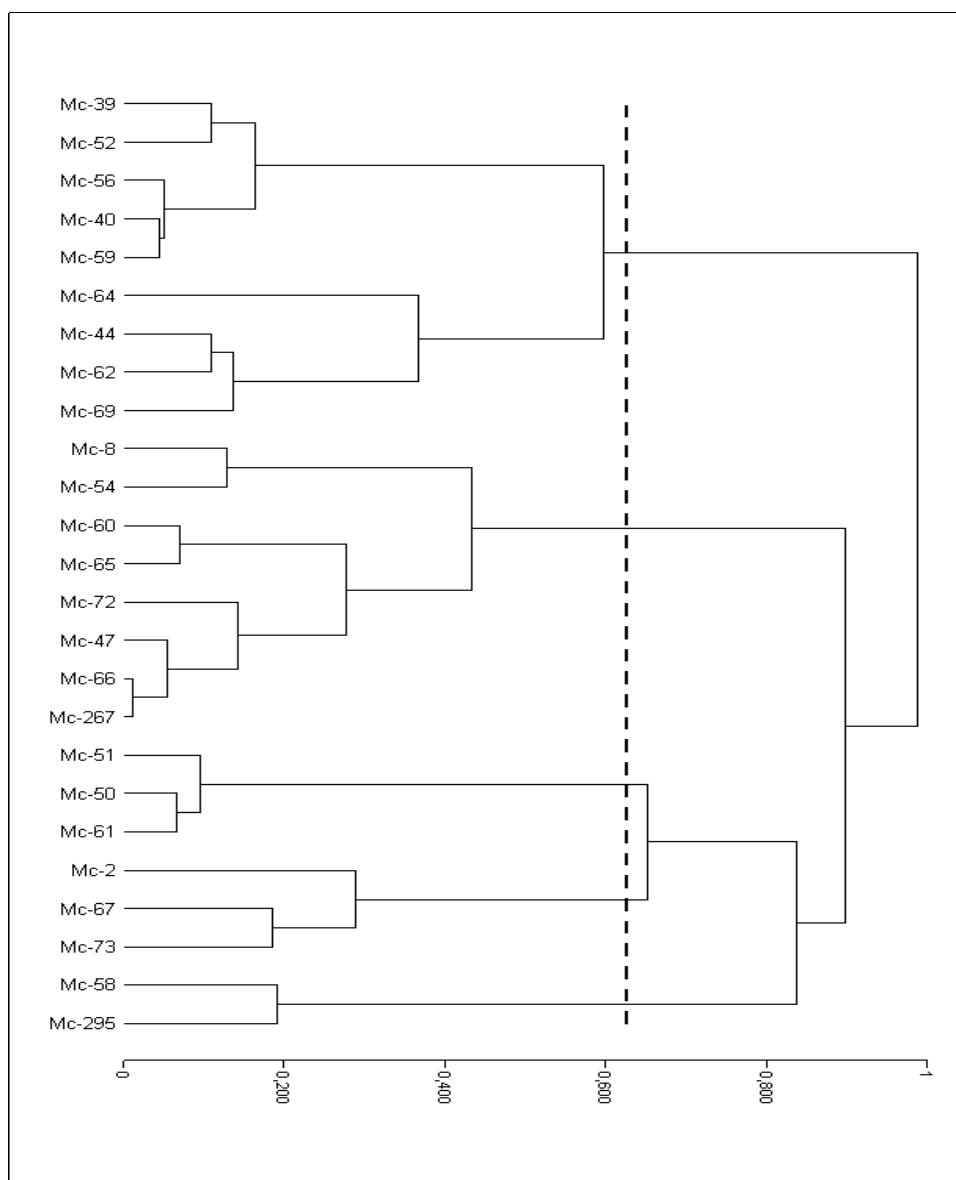


FIGURA 2: Dendrograma obtido pela análise dos grupos hierárquicos aglomerados (GHA), calculado pelo coeficiente de dissimilaridade de correlação de Pearson, a partir da AACCM e número de picnídios/cm², observados nos meios de cultura BDA, OA e CZA,

a 20°C e a 25°C, entre os isolados de *S. macrospora*. UFLA, Lavras, MG, 2006..

No estudo do comportamento dos 18 isolados *S. maydis*, cultivados em meios de cultura diferentes e incubados sob dois regimes de temperatura, pôde-se observar pelos resultados da análise de variância para a variável área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM), diferença significativa entre as interações: isolado x temperatura, isolado x meio de cultura, temperatura x meio de cultura e isolado x temperatura x meio de cultura, pelo teste de F e $P \leq 0,01$ (Tabela 5A).

Independente do isolado, verificou-se que, tanto a temperatura quanto o meio de cultura influenciaram o crescimento e a reprodução dos isolados (Figuras 3A e 3B). Observou-se que a melhor temperatura para crescimento e produção de picnídios de *S. maydis* foi a de 25,0°C, para todos os meios de cultura avaliados (Figura 3A). Além disso, esses mesmos isolados produziram maior número de picnídios por cm², no meio OA (Figura 3B). De maneira similar às observações realizadas para os isolados de *S. macrospora*, o meio CZA não proporcionou condições favoráveis para o crescimento miceliano e nem produção de picnídios para *S. maydis*, tanto a 20°C quanto a 25°C (Figuras 3A e 3B).

Observou-se que, independente da temperatura, houve uma grande variação do crescimento miceliano dos isolados e na produção de picnídios de *S. maydis* (Tabela 4). O meio OA proporcionou a maior produção de picnídios/cm² para todos os isolados, exceto para o isolado May-349, que produziu mais picnídios no meio EMA (Tabela 4). Apenas os isolados May-38 e May-63 produziram picnídios no meio CZA (Tabela 4).

Em relação à temperatura, todos os isolados de *S. maydis* apresentaram maior crescimento miceliano a 25°C (Tabela 5). A maioria dos isolados produziu maior número de picnídios a 25°C, com exceção dos isolados May-48, May-63 e May-349, que produziram maior quantidade de picnídios por cm² a 20°C (Tabela 5). Observou-se também que a temperatura não afetou a produção de picnídios

para os isolados May-17 e May-80.

Semelhantes às observações realizadas por Johann (1935) e Morant et al. (1993) verificou-se que a produção de picnídios por *S. maydis* foi mais rápida e em maior quantidade, em relação à *S. macrospora*.

Pela análise dos GHA, calculados pelo coeficiente de dissimilaridade de correlação de Pearson, entre todas as características avaliadas, observou-se que houve a formação de quatro grupos com características fisiológicas diferentes (Figura 4). Entretanto, os dados indicam que esses agrupamentos não tiveram nenhuma correlação com a origem geográfica dos isolados. Pela análise de GHA, não foi observado o agrupamento, em relação à produção de picnídios em meio BDA, por isolados de *S. maydis*, conforme proposto por Xia & Achar (2001). Esses autores avaliaram 34 isolados de *S. maydis* de diferentes localidades na África do Sul e os caracterizaram em dois grupos distintos: grupo I (RG I), não esporulam em BDA e grupo II (RG II), isolados que esporulam em BDA.

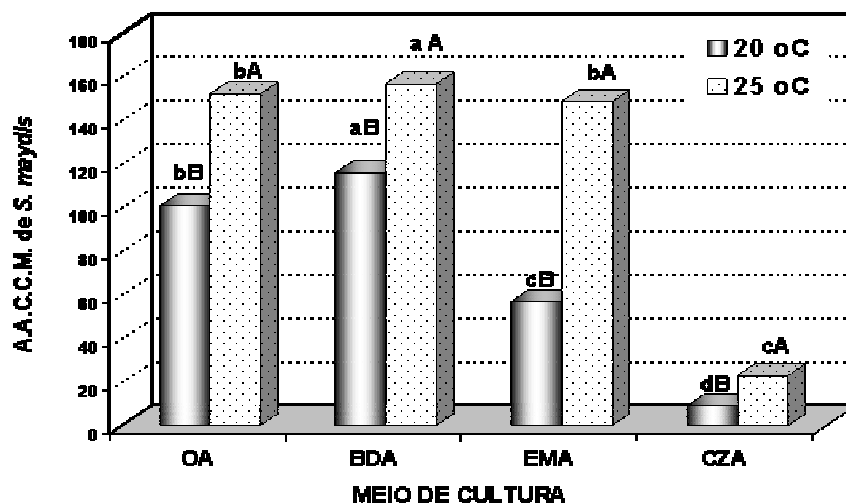
Os resultados da análise de variância para as variáveis comprimento de conídios (L_c), diâmetro de conídios (D_c), comprimento de picnídios (L_p), diâmetro de picnídios (D_p), razão entre o diâmetro de conídios e o comprimento de conídios e (D_c/L_c) e o diâmetro de picnídios/comprimento de picnídios (D_p/L_p), para *S. macrospora* e *S. maydis*, apresentaram diferenças significativas, pelo teste de F, $P \leq 0,01$ (Tabela 6A).

Os dados morfológicos de conídios e picnídios revelam que, para todos os isolados de *S. maydis* avaliados, os conídios apresentam as seguintes características: são cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, com 1 septo, com as medidas entre as descrições realizadas por Sutton & Waterston (1966). Para a espécie *S. macrospora*, também foram encontradas características semelhantes às descritas para *S. maydis*. Porém, os conídios de *S. macrospora* apresentaram-se de 2 a 3 vezes maiores e de 2 a 3 septos, situando-se entre as

características já descritas por Sutton & Waterston (1966) e Sutton (1980), para essa espécie (Tabela 6). Além disso a largura e o comprimento dos picnídios de *S. macrospora* tendem a ser maiores em relação às medidas de *S. maydis* (Tabela 6).

O resultado da comparação das características morfológicas, por meio da análise dos GHA, calculado pelo coeficiente de dissimilaridade de correlação de Pearson, entre o comprimento (L), diâmetro (D) e a razão entre o diâmetro e o comprimento (D/L), de conídios e picnídios de isolados *S. macrospora* e *S. maydis* indicam que as variáveis analisadas permitiram a clara separação dos isolados *S. macrospora* e *S. maydis*, em dois grupos distintos (Figura 5). Os dados mostram também que houve a formação de subgrupos entre os isolados de *S. maydis*, entretanto, sem nenhuma correlação com a origem geográfica dos isolados.

A



B

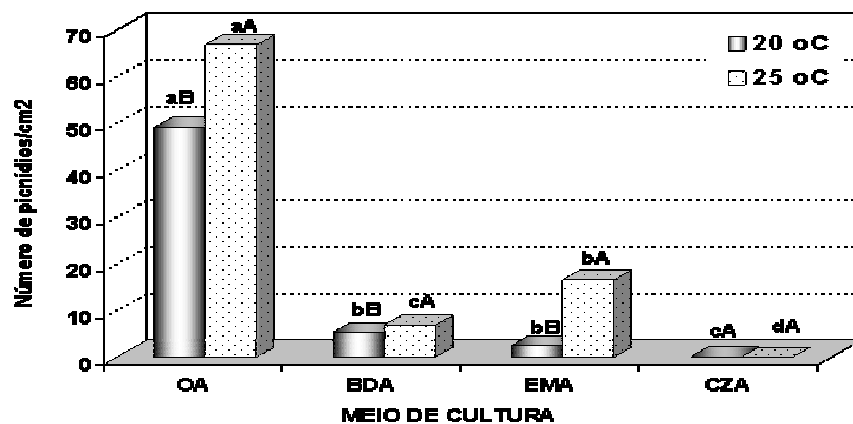


FIGURA 3: (A) Área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM) e (B) número de picnídios/cm² de *S. maydis* em meio de cultura BDA, OA, EMA e CZA, com temperatura de incubação de 20°C e 25°C. Médias com a mesma letra maiúscula entre temperaturas e minúsculas, entre meios de cultura, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P \leq 0,01\%$. UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 4: AACCM *S. maydis* e número de picnídios/cm² produzidos nos meios de cultura BDA, OA, EMA e CZA, independente da temperatura de incubação. UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADO	AACCM				NÚMERO DE PICNÍDIOS/cm ²			
	BDA	OA	EMA	CZA	BDA	AO	EMA	CZA
May-17	114,3 d A	113,6 d A	113,7 b A	10,6 c B	14,7 b B	54,0 f A	2,6 c C	0,0 a C
May-18	144,1 b A	137,9 b A	116,4 b B	14,5 c C	5,2 d B	65,2 e A	5,2 c B	0,0 a C
May-21	133,2 b A	131,1 c A	103,1 c B	21,7 b C	15,9 b B	72,6 c A	17,3 a B	0,0 a C
May-38	161,7 a A	133,1 c B	109,0 b C	18,9 c D	3,3 e C	84,5 b A	9,0 b B	0,2 a C
May-43	174,0 a A	137,2 b B	102,3 c C	13,0 c D	2,8 e B	55,7 f A	1,9 c B	0,0 a B
May-45	142,4 b A	126,3 c B	96,1 c C	7,7 c D	0,7 e B	75,2 c A	4,0 c B	0,0 a B
May-46	110,9 d B	133,2 c A	81,8 d C	14,5 c D	0,3 e C	63,6 e A	10,6 b B	0,0 a C
May-48	62,7 e A	64,5 e A	28,6 e B	4,9 c C	0,0 e B	37,9 h A	0,0 c B	0,0 a B
May-49	114,2 d A	120,7 d A	112,6 b A	9,8 c B	1,7 e C	68,8 d A	5,4 c B	0,0 a C
May-55	172,1 a A	149,8 a B	130,8 a C	38,1 a D	29,1 a B	64,7 e A	9,5 b C	0,0 a D
May-57	149,3 b A	129,0 c B	103,2 c C	10,9 c D	0,0 e B	55,3 f A	3,2 c B	0,0 a B
May-63	165,9 a A	109,3 d B	112,3 b B	4,5 c C	11,2 c C	22,8 i A	15,4 a B	0,1 a D
May-68	166,1 a A	129,1 c B	118,7 b B	26,3 b C	0,5 e C	49,0 g A	13,96 a B	0,0 a C
May-74	119,6 c A	115,4 d A	97,2 c B	8,5 c C	1,0 e C	45,9 g A	13,7 a B	0,0 a C
May-75	128,6 c A	122,6 d A	94,3 c B	6,7 c C	3,8 e C	56,7 f A	17,4 a B	0,0 a C
May-80	157,6 a A	142,5 b B	115,3 b C	40,2 a D	9,6 d C	72,5 c A	14,4 a B	0,0 a D
May-271	142,4 b A	116,8 d B	96,6 c C	9,0 c D	2,0 e C	92,7 a A	12,9 a B	0,0 a C
May-349	103,8 d B	162,9 a A	115,0 b B	26,3 b C	7,6 d B	5,8 j B	15,0 a A	0,0 a C
MÉDIAS	136,32 A	126,35 B	102,64 C	15,94 D	6,11 C	57,98 A	9,56 B	0,01 D

Médias com a mesma letra minúscula, nas colunas e maiúscula, nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), P < 0,001

TABELA 5: Média da AACCM e do número de picnídios/cm² de *S. maydis*, crescidos a 20°C e a 25°C. UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADO	AACCM		NÚMERO PICNÍDIOS/cm ²	
	20°C	25°C	20°C	25°C
May-17	53,9 c B	122,1 b A	17,0 a A	18,6 c A
May-18	83,4 b B	122,9 b A	10,6 b B	27,2 b A
May-21	76,8 b B	117,7 c A	17,6 a B	35,3 a A
May-38	81,0 b B	130,2 b A	13,2 b B	35,3 b A
May-43	88,1 a B	125, b A	11,9 b B	18,3 c A
May-45	56,9 c B	124,4 b A	12,7 b B	60,5 a A
May-46	63,4 c B	106, d A	12,3 b B	24,9 c A
May-48	24,0 e B	56,3 e A	19,0 a A	0,0 f B
May-49	59,0 c B	119,6 c A	15,3 b B	22,7 c A
May-55	92,3 a B	153,1 a A	13,6 b B	38,1 a A
May-57	77,8 b B	118,43 c A	14,61 b B	14,6 d A
May-63	74,5 b B	121,5 b A	17,8 a A	7,0 e B
May-68	92,7 a B	127, b A	12,2 b B	19,5 c A
May-74	43,3 d B	127,0 b A	11,3 b B	19,0 c A
May-75	58,4 c B	117,7 c A	13,7 b B	25,3 b A
May-80	96,2 a B	131,6 b A	19,9 a A	28,4 b A
May-271	66,8 c B	115,6 c A	15,8 b B	38,0 a A
May-349	81,6 b B	121,9 b A	7,9 b A	6,2 e B
MÉDIAS	70,88 B	120,00 A	14,27 B	22,57 A

Médias com a mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), P< 0,01%.

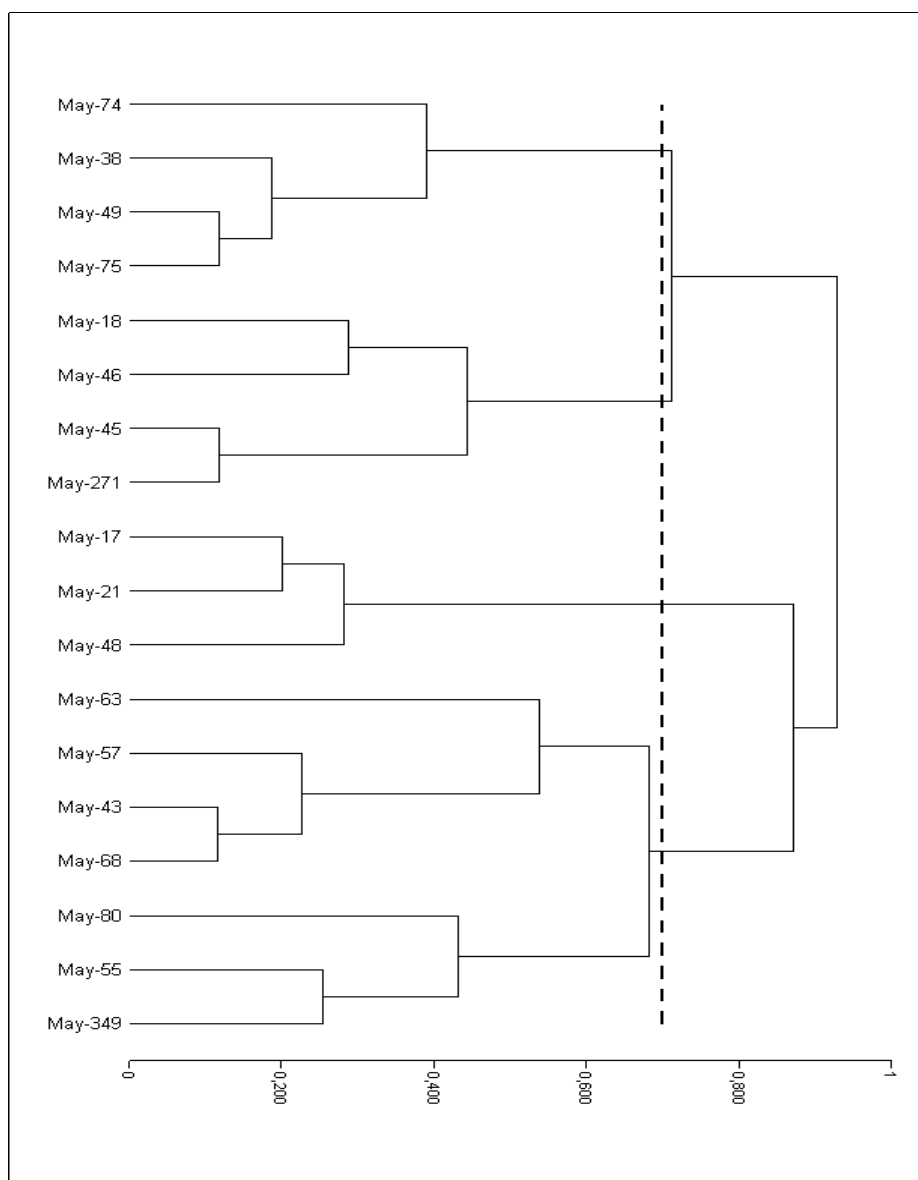


FIGURA 4: Dendrograma obtido pela análise dos grupos hierárquicos aglomerados (GHA), calculados pelo coeficiente de dissimilaridade de correlação de Pearson, a partir da AACCM e número de picnídios/cm², observados nos meios de cultura BDA, OA e CZA, a 20°C e a 25°C, entre os isolados de *S. maydis*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 6: Comprimento (L), diâmetro (D) e a razão entre o diâmetro e o comprimento (D/L) de conídios e picnídios de isolados *S. maydis* e *S. macrospora*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADOS	CONÍDIOS			PICNÍDIOS		
	L	D	D/L	L	D	D/L
May-11	22,58 c	4,87 b	0,217 c	419,36 b	353,73 c	0,843 b
May-17	22,37 c	5,69 b	0,257 a	416,13 b	360,19 c	0,867 b
May-18	21,57 c	5,45 b	0,253 a	369,57 c	325,27 d	0,880 b
May-21	21,03 c	5,38 b	0,253 a	301,99 c	293,26 d	0,973 a
May-38	21,72 c	5,01 b	0,233 c	322,36 c	317,19 d	0,993 a
May-43	22,79 c	5,07 b	0,223 c	404,81 b	370,54 c	0,917 b
May-45	22,21 c	5,09 b	0,230 c	353,08 c	351,46 c	0,997 a
May-46	21,76 c	6,07 b	0,233 c	327,86 c	312,34 d	0,950 a
May-49	22,59 c	5,04 b	0,227 c	385,41 b	374,74 c	0,970 a
May-55	21,43 c	5,03 b	0,237 c	336,59 b	315,57 d	0,943 a
May-57	21,17 c	5,05 b	0,240 b	423,89 b	381,53 c	0,910 b
May-68	21,54 c	5,14 b	0,240 b	412,90 b	394,79 c	0,953 a
May-74	22,14 c	5,02 b	0,227 c	351,79 c	349,20 c	0,993 a
May-75	22,34 c	5,15 b	0,230 c	351,79 c	355,34 c	1,013 a
May-80	22,36 c	5,00 b	0,233 c	344,35 c	354,37 c	1,027 a
May-271	22,31 c	5,14 b	0,230 c	297,79 c	293,91 d	0,987 a
May-349	22,34 c	4,84 b	0,220 c	441,67 a	403,84 c	0,910 b
Mc-44	73,32 a	10,68 a	0,147 d	536,73 a	511,19 a	0,953 a
Mc-59	68,56 b	9,52 a	0,140 d	517,66 a	506,99 b	0,980 a
Mc-62	67,76 b	9,52 a	0,137 d	516,69 a	472,07 b	0,917 b
Mc-67	69,00 b	9,57 a	0,140 d	485,97 a	435,53 b	0,900 b
Mc-72	68,54 b	9,57 a	0,140 d	513,45 a	451,37 a	0,880 b

Médias com a mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974), $P < 0,01\%$.

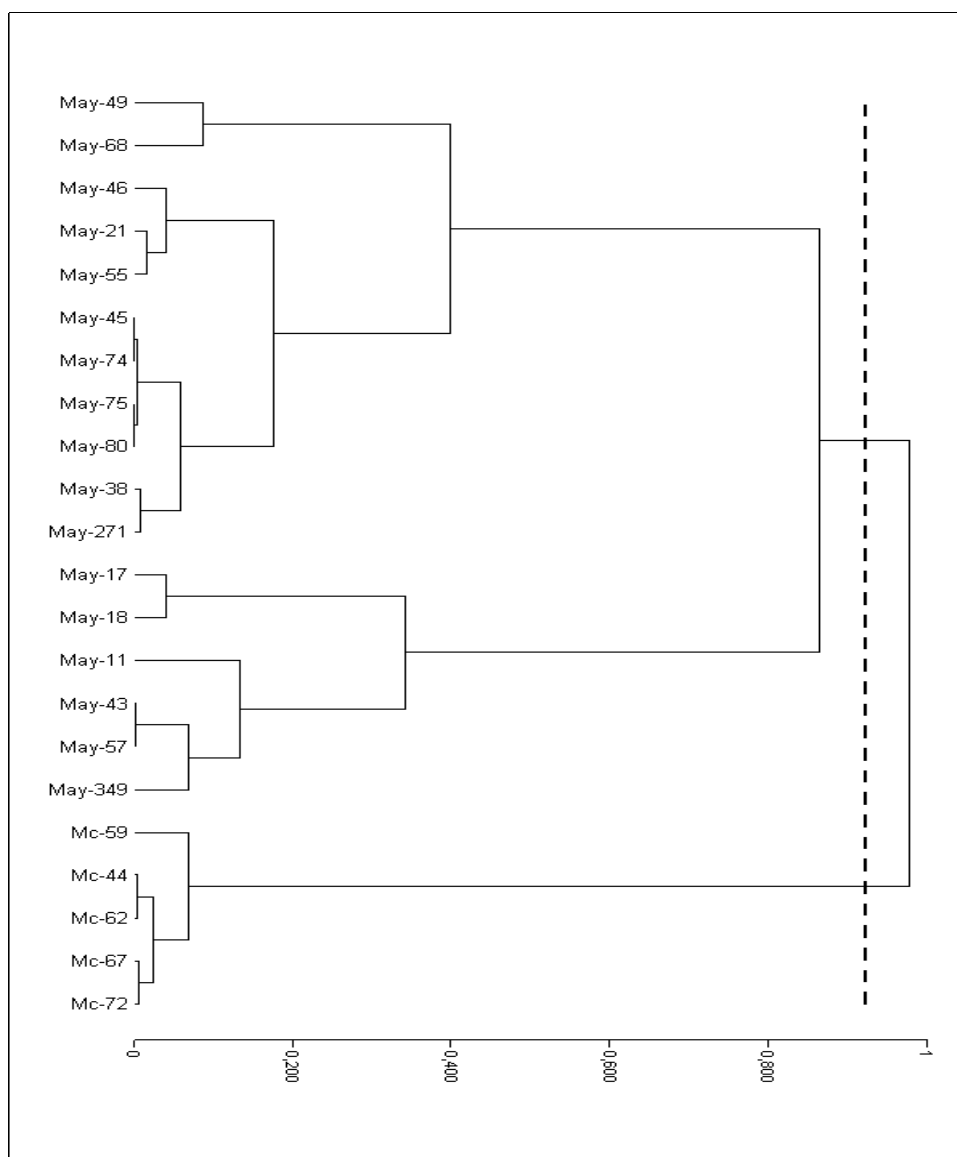


FIGURA 5: Dendrograma obtido pela análise dos grupos hierárquicos aglomerados (GHA), calculado pelo coeficiente dissimilaridade de correlação de Pearson, a partir do comprimento (L), diâmetro (D) e razão entre o diâmetro e o comprimento (D/L) de conídios e picnídios entre isolados *S. maydis* e de *S. macrospora*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.2 Caracterização Molecular de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*

5.2.1 Amplificação da região ITS e β -tubulina

A metodologia utilizada na amplificação da região ITS e β -tubulina, a partir do DNA genômico extraído dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*, resultou em produtos de PCR, com o tamanho esperado (\pm 500-550 pb), em todos os isolados testados. Além disso, as condições utilizadas na reação de PCR resultaram na amplificação de um fragmento de DNA único, eliminando-se, assim, a necessidade de clonagem para a realização das reações de seqüenciamento.

5.2.2 Qualidade do seqüenciamento

Os eletroferogramas resultantes do seqüenciamento de todos os produtos de PCR obtidos, nas duas direções (*forward* e *reverse*), foram inicialmente submetidos à análise de qualidade pelo programa *Electropherogram Quality Analysis* (<http://genoma.embrapa.br/phph>), tendo todas as seqüências produzidas apresentado mais de 350 pb (Phred \geq 20), indicando boa qualidade de seqüenciamento e alta confiabilidade nas seqüências produzidas.

5.2.3 Análise das seqüências obtidas com *primers* ITS

As seqüências consenso, resultantes do sequenciamento dos produtos de PCR nas duas direções, foram obtidas após o alinhamento destas, duas a duas, com o uso do programa SeqManTM II. Após a eliminação das seqüências

correspondentes aos *primers* usados na reação de seqüenciamento, foram obtidas seqüências nucleotídicas consenso, de 500 e 540 pb, para todos os isolados.

Os resultados das análises de BLASTn, com parâmetros padrão, (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>), destas seqüências com o conjunto NR (não redundante) das seqüências depositadas no banco de dados, revelaram alta similaridade com seqüências fúngicas de rRNA, em todos os casos. Esses resultados confirmaram identidade das seqüências produzidas como da região ITS dos diferentes isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*.

Os resultados das análises de BLASTn com as seqüências obtidas da região ITS dos isolados de *S. macrospora* revelaram similaridade de 96% com seqüências do gene rRNA e região ITS1 de isolados de *Diaporthe phaseolorum* (GI:4100538) e 96% com seqüências similares de isolados de *Diaporthe meridionalis* (GI:14599175) e *Phomopsis* sp R338E (GI:37812464). Além disso, foi também observada alta similaridade (96% de identidade) com as seqüências gênicas de rRNA de isolados de *S. maydis* (GI: 32967058, 32967060 e 32967065).

No caso das análises de Blast, com as seqüências dos isolados de *S. maydis*, os resultados obtidos indicaram alta similaridade (98% a 99% de identidade) com as seqüências gênicas de rRNA de isolados da mesma espécie, já presentes na base de dados. Além disso, alta similaridade (95% de identidade) foi também observada com seqüências do gene rRNA provenientes de isolados de *Diaporthe phaseolorum*.

A árvore filogenética apresentada na Figura 7 foi construída utilizando-se análises de UPGMA, no programa MEGA 3.1, *bootstrap* (1000 repetições), utilizando-se o modelo de Kimura-2 para nucleotídeos, a partir da região consenso amplificada pelos *primers* ITS1 e ITS4. Também, foram incluídos, na lista de comparação, algumas seqüências das espécies de fungos que apresentaram alta similaridade nas análises de BLASTn, disponíveis na base de

dados do NCBI. Também foram incluídas na análise filogenética 10 seqüências do gene rDNA de *S. maydis* e uma seqüência de *Fusarium verticillioides* (GI:1122878). Este último é um importante patógeno comumente encontrado em sementes de milho.

Os resultados apresentados revelam a formação de dois grupos filogenéticos distintos entre os isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*, a partir das seqüências obtidas do gene rRNA para esses isolados (Figura 7). Isso indica a presença de polimorfismos característicos nas seqüências de cada espécie, conservada entre os diferentes isolados de origem brasileira utilizados no estudo, o que possibilita o desenho de *primers* específicos para cada espécie, com potencial utilização em novos estudos de diagnose detecção (Tabela 7).

Além disso, pode-se também observar, por meio das análises filogenéticas, que existem diferenças significativas entre as seqüências dos outros patógenos utilizados na análise, os quais se associam em grupos filogeneticamente diferentes. Nesse sentido, é importante salientar o agrupamento da seqüência produzida neste trabalho, de *F. verticillioides* isolado a partir de sementes de milho, no mesmo grupo filogenético da seqüência de *F. verticillioides* (GI:1122878), obtida na base de dados do NCBI, indicando consistência nas análises de caracterização molecular.

Adicionalmente, o grupo filogenético de *S. maydis* gerado a partir das seqüências produzidas nesse estudo, apresentou-se de maneira coerente com três seqüências de isolados canadenses, disponíveis na base de dados do NCBI (GI:32967058; GI:32967060; GI:32967065). Entretanto, também se observa, nos resultados apresentados na Figura 7 e Figura 8B, que outras seqüências de *S. maydis* já disponíveis na base de dados associam-se em grupo filogenético distinto dos isolados brasileiros. Isso pode ser devido à diferente origem geográfica dos isolados, o que indicaria a possibilidade de utilização do polimorfismos dessas seqüências em programas de segurança biológica. Vale

salientar, entretanto, que as seqüências depositadas ainda não foram publicadas em trabalho científico.

Os dados apresentados nas Figuras 8A e 8B revelam que não foi possível a diferenciação dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* de acordo com a origem geográfica, a partir dos polimorfismos detectados nas seqüências parciais do gene rRNA.

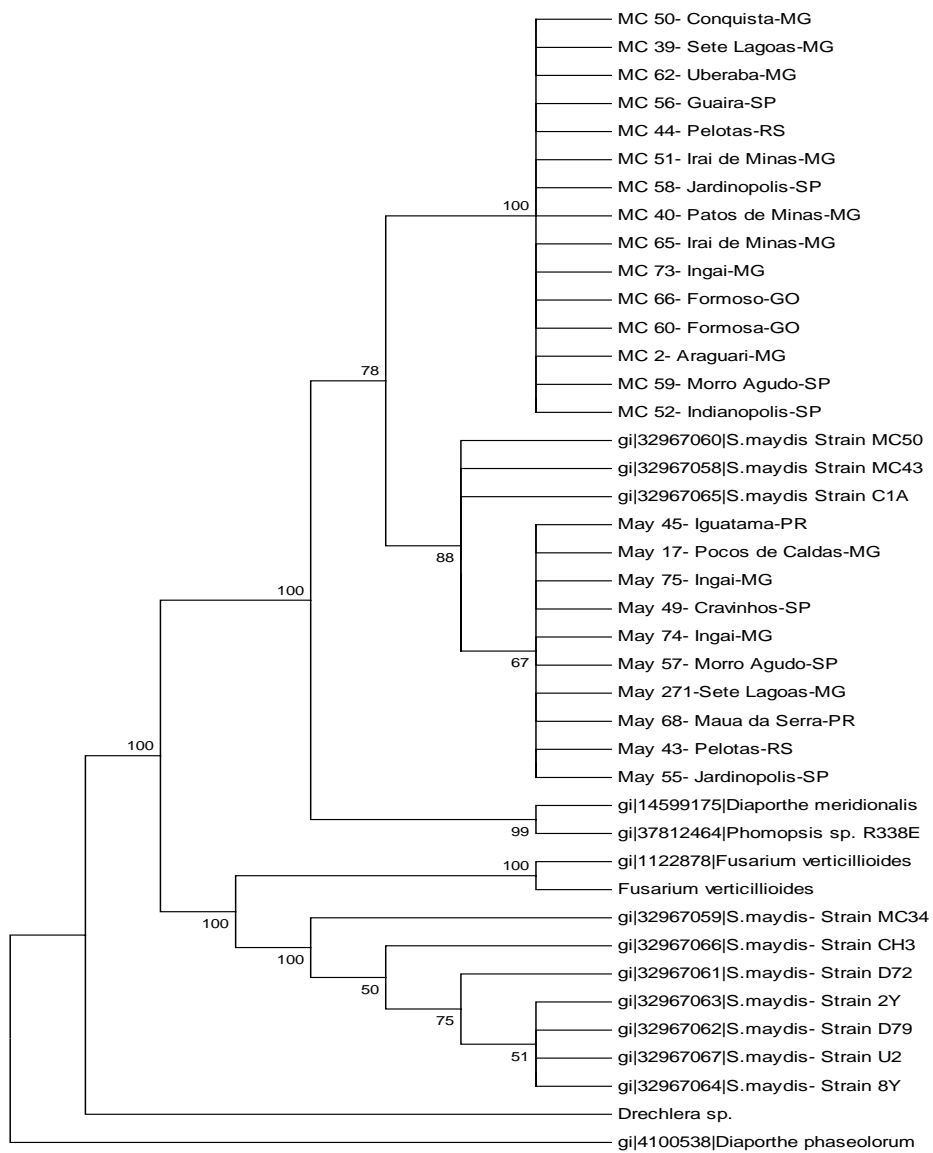


FIGURA 7: Árvore filogenética, referente à análise do consenso das seqüências de nucleotídios entre as regiões ITS1 e ITS4 do DNA genômico de *S. maydis* e de *S. macrospora*. Os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) *cut-of* acima de 75%. UFLA, Lavras, MG, 2006.

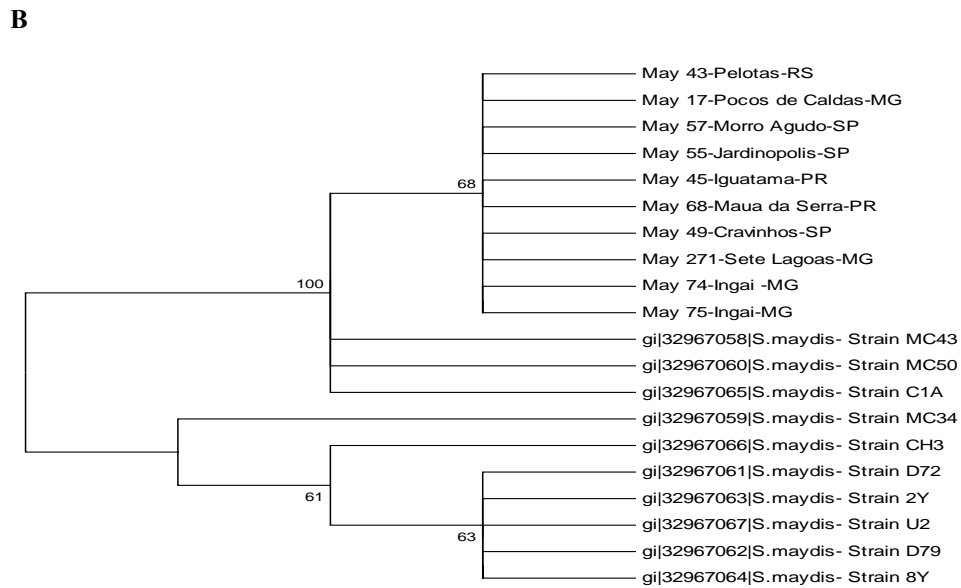
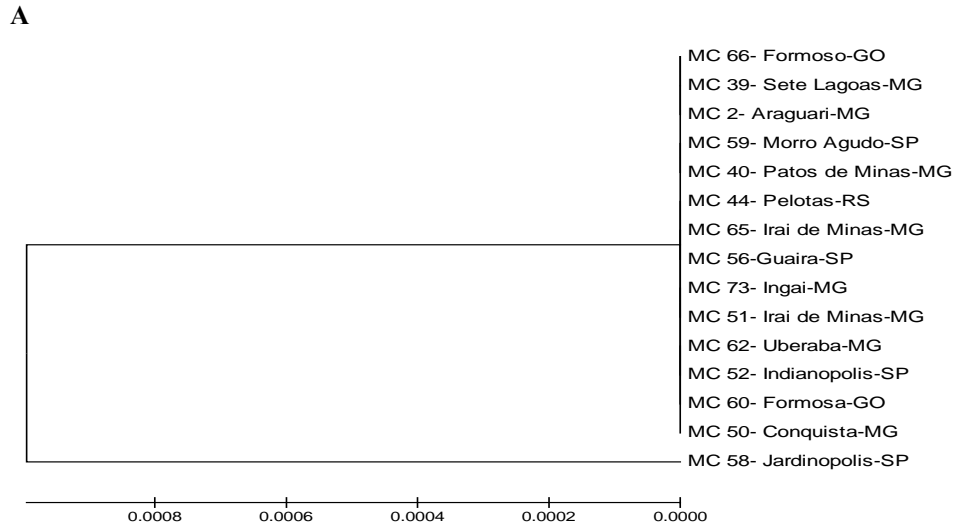


FIGURA 8: Árvore filogenética, referente à análise do consenso das seqüências de nucleotídios obtido das regiões ITS1 e ITS4 do DNA genômico de entre os isolados de (A) *S. macrospora* e (A) *S. maydis*. Os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) *cut-of* acima de 75%. UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 7: Nucleotídios polimórficos (ou alelos) da seqüência de dados da região do gene da região ITS do rDNA, de isolados de *S. macrospora* (Mc) e *S. maydis* (May). UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADO	POSIÇÃO DAS BASES											
	54	64	76	91	98	144	155	162	174	376	395	414
Mc-2	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-39	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-40	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-44	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-50	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-51	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-52	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-56	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-58	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-59	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-60	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-62	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-65	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-66	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
Mc-73	C	C	G	C	-	C	C	G	-	C	C	C
May-17	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-43	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-45	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-49	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-55	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-57	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-68	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-74	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-75	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T
May-271	T	T	A	A	G	T	T	A	G	T	A	T

5.2.4 Análise das seqüências obtidas com *primers* β -tubulina

A árvore filogenética construída pela análise de *UPGMA*, no programa MEGA 3.1, *bootstrap* (1000 repetições), a partir das seqüências consenso amplificadas pelos *primers* BT2a e BT2b, também revela a associação em grupos filogenéticos distintos dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* (Figura 9).

Por meio dessa análise, também foi possível identificar diferenças entre os isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*, utilizados neste estudo, com algumas espécies de fungos do banco de dados. Dentre eles, o grupo de fungos que apresentaram alta identidade com os isolados *S. macrospora* e *S. maydis* estudados: *Gelasinospora tetrasperma*, *Cylindrocarpon didymum*, *Diaporthe ambigua*, além do patógeno do milho *Fusarium verticillioides*.

A árvore filogenética, construída a partir das seqüências nucleotídicas do gene que codifica a β -tubulina, revela o agrupamento dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis*, em grupos filogenéticos distintos (Figura 9). Essa região do DNA, portanto, mostrou-se satisfatória para diferenciar essas duas espécies. Da mesma forma que foi observado para a região ITS do rDNA, existem polimorfismos específicos nas seqüências de β -tubulina, que permitem o desenho de *primers* específicos para a detecção de maneira diferencial dessas duas importantes espécies de fungos, causadoras de podridões de colmo e espiga, na cultura do milho (Tabela 8).

Esses resultados foram análogos aos obtidos por Slippers *et al.* (2004), ao caracterizarem *Botryosphaeria* spp. e mapearem sua distribuição em plantações de *Eucalyptus* nativos e introduzidos na Austrália e na África do Sul. Esses autores identificaram cinco espécies de *Botryosphaeria* spp., baseando-se na seqüência dados de DNA nuclear da região ITS do rDNA, β -tubulina e do fator de elongação 1- α . Salienta-se que, neste estudo, foram utilizados os

mesmos *primers* empregados pelos referidos pesquisadores. Além disso, esse ascomiceto tem *Diplodia* sp. como um dos representantes de seus anamorfos (Proffer, 1989; van Niekerk et al., 2004).

A análise das árvores filogenéticas apresentadas revelam que não foi possível a separação, em grupos filogenéticos distintos, dos diferentes isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* de acordo com a origem geográficas (Figuras 10A e 10B), de maneira análoga ao observado nas análises filogenéticas utilizando-se as seqüências gênicas de rRNA. Entretanto, observa-se que as análises filogenéticas utilizando-se as seqüências de β -tubulina permitiram maior diferenciação dos isolados, em grupos filogenéticos distintos.

O fato não terem sido encontradas diferenças associadas à origem geográfica dos isolados de *S. maydis* e de *S. macrospora*, nas seqüências do rRNA e β -tubulina, não significa que diferenças genéticas entre esses isolados não existam. Essas diferenças podem estar presentes em outras porções do genoma das duas espécies estudadas.

5.2.5 Considerações sobre a caracterização molecular

Os resultados de caracterização molecular dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* fornecem informações suficientes para o desenvolvimento de um método rápido e seguro de detecção destes fungos em sementes de milho, a partir da utilização de *primers* específicos para cada espécie, desenhados a partir das regiões dos nucleotídeos polimórficos da região ITS e do gene da β -tubulina, identificados neste trabalho.

Esses resultados podem ser empregados no desenvolvimento de um método para a detecção de *S. macrospora* e *S. maydis*, utilizando-se PCR em tempo real (RT-PCR) com *primers* desenhados a partir das seqüências obtidas

para esse dois fitopatógenos. Estratégias similares têm sido utilizadas na detecção de *Helminthosporium solani* em tubérculos e em solo, na identificação, detecção e quantificação de espécies de *Pyrenophora* em sementes de cevada e na detecção de *Prunus necrotic ringspot vírus* em fruteira temperadas, tais como, pêssegueiro, noqueiras, ameixeiras e damasqueiros (Bates et al. 2001; Danny et al. 2001; Marbot et. al. 2003).

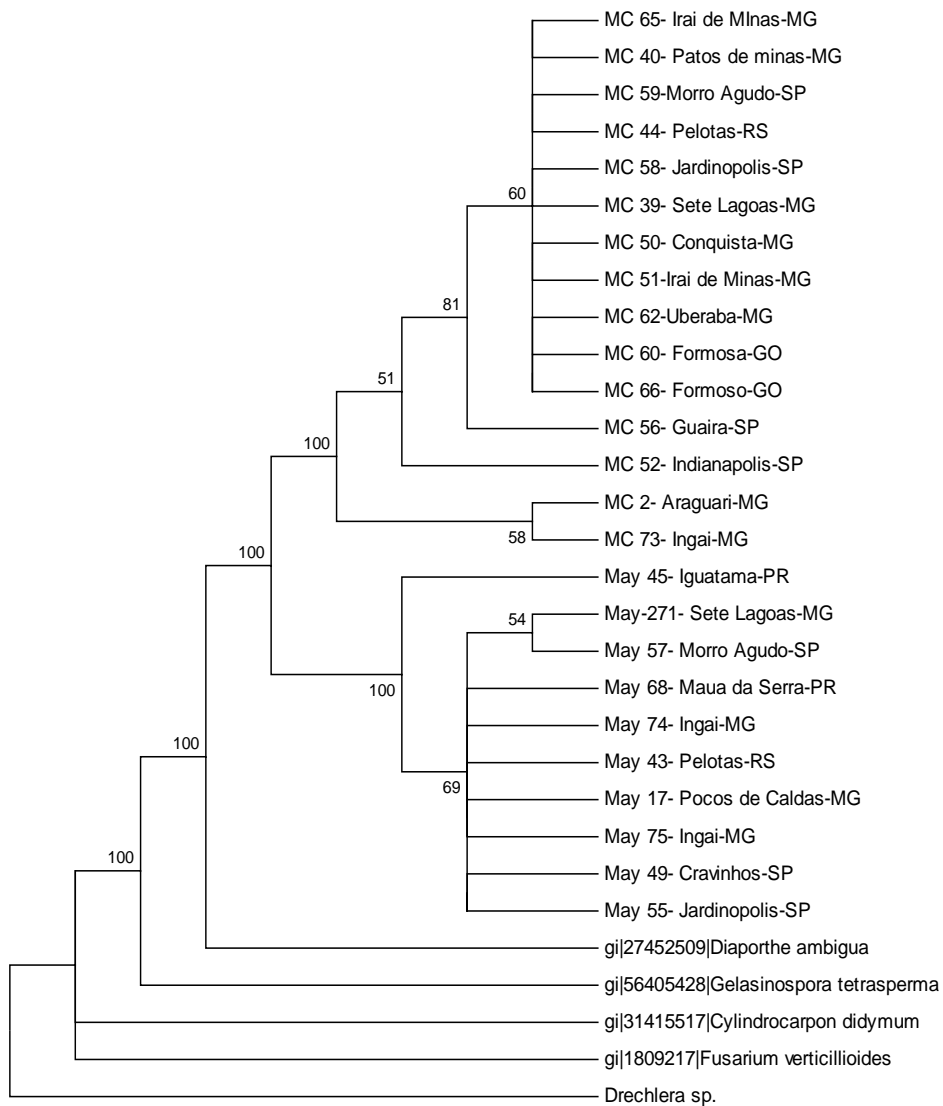
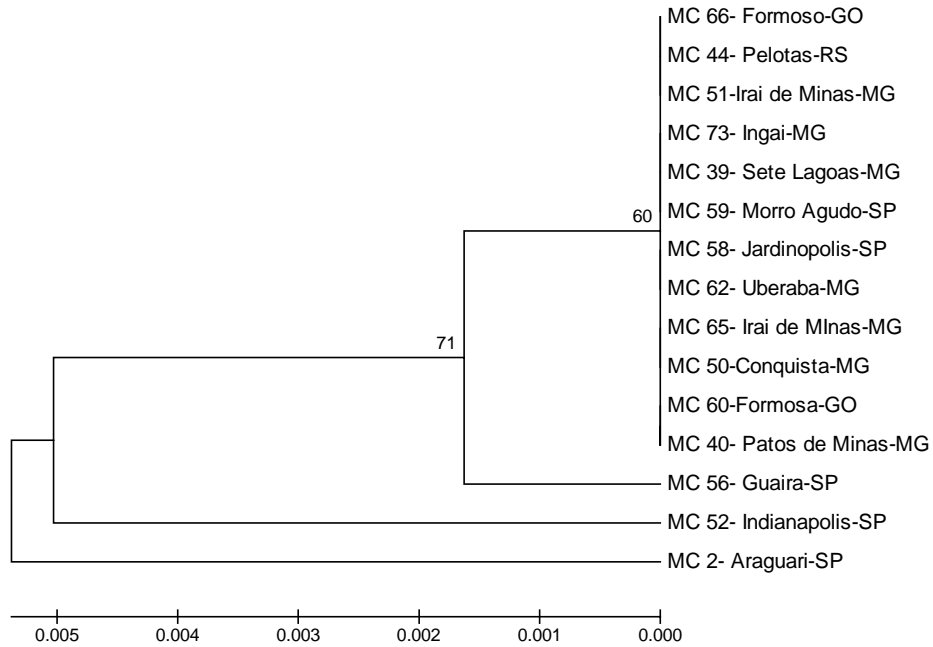


FIGURA 9: Dendrograma de filogenia, referente à análise do consenso das seqüências de nucleotídios entre as regiões β T2a e β T2b do DNA genômico de *S. maydis* e de *S. macrospora*. Os valores de *bootstrap* foram obtidos por meio do programa MEGA, versão 3.1, com 1.000 repetições, sendo mostrados os valores acima de 60%. UFLA, Lavras, MG, 2006.

A



B

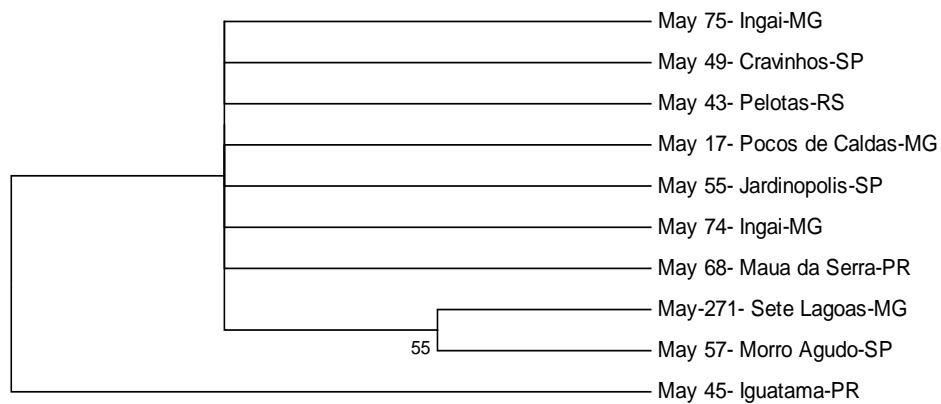


FIGURA 10: Árvore filogenética, referente à análise do consenso das seqüências de nucleotídeos obtido das regiões β T1a e β T2b do DNA genômico de entre os isolados de (A) *S. macrospora* e (A) *S. maydis*. Os valores de *bootstrap* (1.000 repetições) *cut-of* acima de 50%. UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 8: Nucleotídios polimórficos (ou alelos) da seqüência de dados da região do gene da β -tubulina, de isolados de *S. macrospora* (Mc) e *S. maydis* (May). UFLA, Lavras, MG, 2006.

ISOLADO	POSIÇÃO DAS BASES												
	177	189	190	205	209	219	225	229	271	322	324	357	358
Mc-2	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-39	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-40	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-44	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-50	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-51	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-52	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-56	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-58	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-59	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-60	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-62	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-64	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-65	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-66	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-67	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-73	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
Mc-267	T	C	T	T	G	T	C	T	G	A	A	A	G
May-17	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-43	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-45	G	G	A	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-49	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-55	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-57	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-68	G	G	G	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-74	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-75	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A
May-271	G	G	C	C	A	C	T	C	A	C	G	C	A

6 CONCLUSÕES

1. As análises de caracterização morfológica e molecular de vários isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* são eficientes em diferenciar, com segurança, estas duas espécies fúngicas.
2. A caracterização morfológica confirmou as diferenças marcantes existentes entre os tamanhos de conídios de *S. macrospora* e *S. maydis*.
3. As seqüências nucleotídicas de rRNA e do gene da β -tubulina apresentam polimorfismos característicos das espécies de *S. macrospora* e *S. maydis*, os quais permitem a separação destes fungos em dois grupos filogenéticos distintos.
4. A caracterização molecular dos isolados de *S. macrospora* e *S. maydis* forneceu informações suficientes para o desenvolvimento de um método rápido e seguro de detecção destes fungos em sementes de milho, a partir da utilização de *primers* específicos para cada espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIGBETSE, K.B. et al. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Phytopathology**, v.84, p.622-626, 1994.

BATES, J. A. et al. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seeds. **Molecular plant pathology**, v.2, n.1, p.49-57. 2001.

BAURA, G.; SZARO, T.M.; BRUNS, T.D. *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. **Mycologia**, v.84, p.592-597, 1992.

BERBEE, M.L. The phylogeny of plant and animal pathogens in the ascomycota. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, p.165-187, 2001.

BORCHARDT, D.S.; WELZ, H.G.; GEIGER, H.H. Molecular marker analysis of European *Setosphaeria turcica* populations. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.611-617, 1998.

BURGES, T.; WINGFIELD, M.J.; WINGFIELD, B.W. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeriopsis sapinea*. **Appl. Envir. Microbiology**, v.67, n.1, p.354-362, 2001.

CASA, R.T. **Sobrevivência de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em restos culturais de milho**. 2000. 130p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

DANIELSEN, S.; JENSEN, D.F. Relationships between seed germination, fumonisin content, and *Fusarium verticillioides* infection in selected maize samples from different regions of Costa Rica. **Plant Pathology**, v.47, p.690-614, 1998.

DANNY, W. et al. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.387-398, 2001.

EDEL, V. et al. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. **Phytopathology**, v.85, n.5, p.579-585, 1995.

FARR, D.F. et al. **Fungi on plants and plants products in the United States**. APS PRESS. 1252p. 1989.

FERANDEZ, M.R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo:EMBRAPA/CNPT. 1993. 128p. Documentos, 6.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. São Carlos. **Anais...** São Carlos – UFSCar, 2000, p.235.

GARDES, M. et al. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.180-190, 1991.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS primers with enhanced specific for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v.2, p.113-118, 1993.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.1323-1333, 1995.

JOHANN, H. *Diplodia macropora* on corn in Brasil. **Plant Disease Reporter**, v.19, n.9-10, 1935. MORANT, M.A.; WARREN, H.L. & VON QUALEN, S.K. A synthetic medium for mass production of pycnidiospores of *Stenocarpella* species. **Plant Disease**, v.77, p.424-426, 1993.

JONSSON, R.; SÄLL, T.; BRYNGELSSON, T. Genetic diversity for Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. **Can. J. Plant Pathol.**, v.22, p.258-264, 2000.

KEELING, P.J. Congruent evidence from α -tubulin and β -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. **Fungal Genetics and Biology**, v.38, p.298–309, 2003.

KLEIN, P.; KANEHISA, M.; DeLISI, C. Prediction of protein function from sequence properties discriminant analysis of a data base. **Biochim. Biophys. Acta**, v.787, p.221-226, 1984.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5:150-163, 2004.

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

LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of five fungus-like protist species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v.9, p.636-653, 1992.

LIMONARD, T.A. Modified blotters test for seed health. Netherlands **Journal of Plant Pathology**, v.72, p.319-321, 1966.

LUZ, W.C. **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa/CNPQ, 1995. 28p. (Circular Técnica nº: 05).

MARBOT, S. et al. Development of real-time RT-PCR assay for detection of *Punus necrotic ringspot virus* in fruit trees. **Plant disease**, v. 87, n.11, p.1344-1348, 2003.

MARTIN, K.J.; RYGIEWICZ, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**, v.28, n.5, p.1-11, 2005.

MORANT, M.A.; WARREN, H.L. & VON QUALEN, S.K. A synthetic medium for mass production of pycnidiospores of *Stenocarpella* species. **Plant Disease**, v.77, p.424-426, 1993.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v.81, p.556-565, 1997.

ODRIZOLA, E. et al. *Diplodia maydis*: a cause of death of cattle in Argentina. **N.Z. Vet J.**, v.53, n.2, p.160-161, 2005.

PERRIÈRE, G.; LOBRY, J.R.; THIOULOUSE, J. Correspondence discriminant analysis: a multivariate method for comparing classes of protein and nucleic acid sequences. **CABIOS**, v.12, n.6, p.519-524, 1996.

PROFFER, T.J. *Botryosphaeria* cankers and dieback. **Plant pathology**, circular nº: 325. 2p. 1989.

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends Genet.**, v.9, p.275-279, 1993.

REID, L.M.; SINHA, R.C. Maize maturity and the development of giberella ear rot symptoms and deoxynivalenol after inoculation. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.147-154, 1998.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Controle de doenças fúngicas na cultura do milho em plantio direto. In: BORGES, G. & BORGES, L.D. **Seminário sobre tecnologia de produção e comercialização do milho**. Passo Fundo, RS: Editora Aldeia Norte, 2000. p.62-71.

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

ROUX, J. et al. Biological and Phylogenetic Analyses Suggest that Two *Cryphonectria* spp. Cause Cankers of *Eucalyptus* in África. **Plant Disease**, v.87, n.11, p.1329-1332, 2003.

SCHÜTZE, J. et al. Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porífera. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, v.266, p63-73, 1999.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p.505-512, Sept., 1974.

SCOTT, J. et al. Genotypic variation in *Penicillium chysogenum* from indoor environments. **Mycologia**, v.96, n.5, p.1095-1105, 2004.

SHI, Y.L. et al. Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. **Phytopathology**, v.86, n.3, p.311-318, 1996.

SLIPPERS, B. et al. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South África. **Studies in Mycology**, v.50, p.343-358, 2004.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696p.

SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. **Diplodia maydis**. London: C.M.I, 1966. Não paginado. (C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 84).

ULLSTRUP, A.J. Diseases of corn. In: SPRAGUE, G.G. et al. **Corn and corn improvement**. American Society of Agronomy, Madison USA. 1977. p.391-500.

van NIEKERK, J.M. et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. **Mycologia**, v.96, n.4, p.781–798, 2004.

WHEELER, B.E.J. **An introduction to plant diseases**. London: J. Wiley, 1976. 374p.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (eds). **PCR Protocols**. 315-322. Academic Press, San Diego. 1990.

WILCOXSON R.D. Stalk rot in relation to yield of corn. **Phytopathology**, v.52, p.416-418. 1962.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

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

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE DETECÇÃO DE *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton e *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton EM SEMENTES DE MILHO, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

1 RESUMO

Para a detecção de *S. maydis* e *S. macrospora* em semente de milho, nos testes de sanidade rotineiros, atualmente utilizados, são necessários até quatorze dias para conclusão da análise. Neste sentido, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver um método de detecção de *S. maydis* e *S. macrospora* em sementes de milho, com base no perfil cromatográfico em RP-HPLC (cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência) e espectrometria de massa (MS). A digestão trípica dos extratos protéicos totais obtidos de culturas puras de *S. maydis*, *S. macrospora*, *F. verticillioides*, *Drechslera maydis* e sementes de milho controle e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* foram analisados por RP-HPLC e espectrometria de massa. Os dados obtidos por RP-HPLC revelaram diferenças nos perfis cromatográficos de culturas puras de *S. maydis* e *S. macrospora*, no tempo de retenção de 25 minutos. Entretanto, diferenças marcantes nos perfis cromatográficos obtidos de sementes inoculadas com esses dois fitopatógenos, não foram identificadas por essa técnica. A análise discriminante realizada com base nos espectros MS, dos intervalos de 20 a 30 minutos e 50 a 60 minutos, obtidos das diferentes amostras estudadas revelaram que os fungos *S. maydis* e *S. macrospora* podem ser detectados diferencialmente em sementes de milho e também possibilitaram a distinção das diferentes espécies fúngicas analisadas. Desta forma, os dados obtidos neste trabalho, indicam que existe grande potencial de utilização da espectrometria de massa no desenvolvimento de novos métodos de detecção de fitopatógenos em sementes.

*Comitê Orientador: José da Cruz Machado - UFLA (Orientador) Edson Ampélio Pozza - UFLA e Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2 ABSTRACT

The current method to detect *Stenocarpella maydis* and *S. macrospora* in maize seeds comprises a period of two weeks. Thus, the development quicker and preciser routine methods analysis to detect and to distinguish those species in maize seeds is a current priority. In that direction, the present work was designed to look for methods that can provide quicker and reliable results. The strategy was focused on the identification of specific markers by comparing the tryptic profile of diferent samples by RP-HPLC and mass spectrometry (MS) analysis. Analyses were made on tryptic digestions of total protein extracts obtained from pure cultures of *S. maydis*, *S. macrospora*, *F. verticillioides* and *D. maydis*, maize seeds artificially infected by *S. maydis* and *S. macrospora*. Seeds were inoculated by the water restriction technique with exposition of seeds to fungal colonies for periods of 48 and 72 hours. The same procedure was followed for maize seeds without inoculation. The chromatography profiles from RP-HPLC of *S. maydis* and *S. macrospora* showed differences in 25 minutes of retention time. However, no differences could be detected between the RP-HPLC chromatograms of non inoculated and inoculated maize seeds with *S. macrospora* and *S. maydis*. Results of MS profiling at CapLC fractions collected at intervals of 20-30 and 50-60 minutes, showed that *S. maydis* and *S. macrospora* can be diferentially detected in maize seeds and this methodology is also able to diferentiate the fungal species used in this study. Data obtained in this study indicate a great potential for mass spectrometry use in the development of new methods for seed-pathogen detection.

*Advising Committee: José da Cruz Machado - UFLA (Adviser) Edson Ampélio Pozza - UFLA and Alan Carvalho Andrade – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3 INTRODUÇÃO

A qualidade de sementes era inicialmente determinada, predominantemente, por dois componentes: a pureza e a germinação. Independente da boa germinação e pureza, sabe-se que patógenos associados às sementes podem destruir plantações inteiras, em qualquer região do mundo. O que não se sabe é por que a qualidade sanitária de sementes vem sendo negligenciada há décadas. Salvo raras exceções, a nova geração de tecnologistas de sementes e fitopatologistas tem se dedicado a integrar os testes de sanidade de sementes como parte dos métodos utilizados para se avaliar a qualidade de sementes (Neergaard, 1965; Machado, 1988).

Apesar de ter havido um grande avanço na formação de mão-de-obra qualificada em técnicas de detecção de patógenos em sementes e na epidemiologia dos principais fungos, o cenário descrito há mais de 50 anos permanece no Brasil e tem mudado muito lentamente. Em 22 de fevereiro de 1999, foi publicada a Portaria nº 71, do Ministério da Agricultura e Pecuária, que normatiza os aspectos relacionados à qualidade de sementes. No entanto, essa medida é ainda muito tímida, dada a quantidade de perdas na agricultura em decorrência da utilização de sementes contaminadas.

Alguns importantes fungos associados a sementes, tais como *Ascochyta* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Septoria* sp. e ferrugens, não são macroscopicamente visíveis ou seus sintomas são invisíveis e inconspícuos. Já fitopatógenos, como *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp., *Phoma* sp. e *Stemphylium* sp., dentre outros, podem produzir sintomas em plântulas e reduzir drasticamente a germinação (Neergaard, 1965).

Nos testes de inspeção de campo, as plântulas infectadas são contadas como plântulas anormais, de acordo com as regras internacionais, para os testes

em sementes. O número de plântulas infectadas depende das condições ambientais (umidade e temperatura) nas quais os testes foram realizados. Em alguns, tem havido subestimação de importantes patógenos em sementes (Neergaard, 1965; McGee, 2002a).

As condições dos testes de sanidade de sementes devem ser adaptadas para o requerimento específico de cada patógeno investigado. Além disso, a natureza complexa dos patógenos, bem como a microflora de saprófitas, em diferentes culturas existentes, pode levar à subestimação de fitopatógenos presentes nas sementes.

Os testes de sanidade de sementes, que envolvem incubação direta de sementes, necessitam, normalmente, de 7 dias (Singh et al., 1974; McGee, 2002b) e no caso específico de detecção de *S. maydis* e *S. macrospora* em sementes de milho, até 14 dias para a obtenção do resultado (Mário e Reis, 2001), o que, em determinadas situações, é um tempo muito longo.

Em meados da década de 1970, com avanços na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tornou-se possível a rápida resolução de misturas complexas de proteínas e peptídeos (Kotake & Funae, 1980; Meek, 1980; Fallon et al., 1996). Além de demonstrar diferenças nos mapas de peptídeos caracterizados pelo elevado grau de similaridade, massa molecular e ponto isoelétrico semelhantes (Libera, 2001), oferecem a combinação de automação com alta eficiência, alta sensibilidade e baixa interferência, para o monitoramento direto dos componentes dos ensaios enzimáticos (Ritov et al., 2004).

Essa técnica foi utilizada, com sucesso, por Guthertz et al. (1993), para separar cepas de *Mycobacterium bovis*, *M. avium* e *M. intracelulare*, causadoras de doenças pulmonares em animais. Da mesma forma, Papadopoulou e colaboradores (1999) fizeram o monitoramento do teor de avenacina em extrato de raízes de aveia selvagem (*Avena strigosa*) e seus mutantes, deficientes na

produção de avenacinas, com o objetivo de selecionar plantas tolerantes a *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. e *Fusarium avenaceum*. Martins et al. (2003), por meio da técnica de HPLC, efetuaram um levantamento de micotoxinas presentes em rações para cães, em Lisboa.

A espectrometria de massa (MS), atualmente, é a técnica mais versátil para a detecção e o sequenciamento direto de proteínas (Aebersold & Mann, 2003; Cooper et al., 2003), pela análise e separação de íons da amostra de trabalho na razão da massa pela carga (m/z) (Hoffmann et al., 1996; Finehout & Lee 2004). Ela também é utilizada no controle de qualidade e na caracterização de proteínas recombinantes e macromoléculas, na identificação de proteínas em larga escala e para medir a massa molecular de proteínas. Além disso, é o método escolhido para detecção e caracterização de modificações pós-traducionais e modificações covalentes, as quais alteram a massa das proteínas (Mann et al., 2001).

Os valores m/z para os íons no espectro de massa e os modelos observados são específicos, além de apresentar análises não tendenciosas, indicam a massa molecular dos reais componentes da amostra (Wintzingerode et al., 2002; Olsen & Mann, 2004; Wunschel et al., 2005) sem necessidade de cultivo do microrganismo em meio de cultura, ou seja, o preparo da amostra é realizado diretamente do tecido infectado (Hollemeier et al., 2005).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de detecção de *S. maydis* e *S. macrospora* em sementes de milho, com base na detecção de fragmentos específicos desses patógenos, a partir da comparação dos perfis de extratos protéicos totais, digeridos com tripsina, utilizando-se a cromatografia líquida de fase reversa e espectrometria de massa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido nos Laboratórios de Genética Molecular e de Espectrometria de Massa, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, utilizando-se culturas puras de *Drechslera maydis*, *Fusarium verticillioides*, *S. maydis* (isolado May-74) e *S. macrospora* (isolado Mc-73). Esses isolados foram cultivados em meio sólido BDA (Acumedia[®]), na proporção de 24 g/l, mais 18 g/l de ágar, em placas de Petri plásticas, a 27°C, fotoperíodo de 12 horas de luz, durante 7 dias, em câmara incubadora tipo BOD. Também foram utilizadas amostras de sementes de híbridos de milho, inoculadas artificialmente com *S. maydis* e com *S. macrospora* e um lote de sementes sem inoculação.

4.1 Análise em HPLC

Esse experimento foi realizado com extrato de culturas puras de *D. maydis*, *F. verticillioides*, *S. macrospora* (isolado Mc-73) e *S. maydis* (isolado May-74). Também foram utilizados dois lotes de misturas de sementes dos híbridos DKB-212 e AG-6018, os quais foram inoculados com *S. macrospora* (Mc-73) e *S. maydis* (May-74). A seleção das sementes foi realizada após um período de 48 horas de incubação em meio BDA, para a confirmação da ausência ou presença dos referidos patógenos.

A pulverização, tanto das sementes quanto do micélio dos fungos, foi realizada com pistilo em almofariz de louça contendo nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em microtubos de 2.000 µL e armazenadas em freezer, a -80°C.

O extrato de peptídeos totais foi obtido utilizando-se aproximadamente 80 mg do milho ou micélio pulverizado. A cada amostra adicionaram-se 250 µL de acetonitrila (ACN) contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA), mais 250 µL de solução aquosa de TFA a 3,0%. Efetuou-se a homogeneização das amostras em vortex por 30 segundos; em seguida, elas foram levadas ao ultrassom durante 30 minutos. Após esse período, realizou-se a centrifugação (13.200 rpm) por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado.

Após a liofilização, a ressuspensão do extrato sólido foi realizada em água milli Q, com volume suficiente para preparar uma solução na concentração de 0,45 mg/µL. Posteriormente, foram adicionados 50,0 µL de tampão carbonato ácido de amônio, $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$, 0,25 M e 50,0 µL de tripsina, 1,0 µg/µL. A digestão foi realizada durante 17:00 horas a 37,0°C. Realizou-se uma nova centrifugação (13.200 rpm) durante 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e acondicionado em freezer a -20,0°C.

A separação dos peptídeos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (RP-HPLC), em um cromatógrafo LC10AD Class VP Shimadzu, utilizando-se uma coluna analítica C-18 de fase reversa (Vidac-218 TP.54, nº: 3), em um gradiente linear de 0% a 100%, com os solventes água (0,1% TFA) e acetonitrila (0,1% TFA).

4.2 Análise por espectrometria de massa

Neste experimento foram utilizadas sementes dos híbridos de milho DKB-212, AG-6018 e DKB-333-B. A composição dos lotes para análise foi realizada da seguinte maneira: controle sementes sem inoculação e sem incubação (Milho) e incubadas por de 72 horas (Milho_72h), em restrição

hídrica (RH) em um potencial de -1,4 MPa, sementes inoculadas com *S. maydis* em RH durante 48 horas (Milho_May_48h) e 72 horas (Milho_May_72h), sementes inoculadas com *S. macrospora* em RH por 48 horas (Milho_Mc_48h) e 72 horas (Milho_Mc_72h). Além do micélio de culturas puras de *S. maydis*, de *S. macrospora* e de *F. verticillioides*. Este ensaio foi conduzido em três repetições para todos os tratamentos, exceto para os extratos de *S. maydis* e *S. macrospora*, separadamente, os quais foram realizados com cinco repetições.

Efetou-se o teste de sanidade de sementes para avaliar o perfil sanitário das sementes utilizadas neste estudo.

Para a extração de peptídeos totais, as amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido, de modo semelhante ao descrito anteriormente. A ressuspensão das amostras foi realizada em tampão carbonato ácido de amônio, $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$, 0,25 M, com volume suficiente para preparar uma solução a concentração de 0,255 mg/ μL e 8,0 μL de tripsina (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A digestão foi realizada durante 17 horas a 37,0°C. Realizou-se uma nova centrifugação (13.200 rpm) por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e acondicionado em freezer a -20,0°C.

Posteriormente, as amostras foram levadas para análise em espectrômetro de massa Q-TOF Ultima API waters (CapLC/MS/MS)MS (Q-TOF –), operando no modo *survey* de aquisição direta de dados, acoplado ao sistema CapLC waters (Waters, Manchester, UK), com coluna narrow-bore Symmetry® C18 5 μm (0,32 x 150mm, Waters, Manchester, UK). As soluções utilizadas para diluir as amostras foram água/acetonitrila/ácido trifluoracético, nas proporções 90:10:0,1 e 10:90:0,1, como soluções A e B, respectivamente. O fluxo foi de 100nL/min., com um gradiente de 5% a 100% de B, em 120 minutos, no qual efetuaram-se a análise de massa e o seqüenciamento MS/MS, com o equipamento operando com fonte *nanoflow* e modo de ionização *Electrospray* positivo. As frações da RP-HPLC (cromatografia de alta

eficiência de fase reversa) foram dissolvidas em uma solução de água/metanol 1:1 com 0,1% de ácido acético. As condições experimentais foram: voltagem do capilar 2,80 kV, voltagem do cone 40V e o método de fragmentação *CID* (*collision induced dissociation*), utilizando argônio como gás de colisão. As amostras foram infusas em um fluxo de 200nL/min. com o espectrômetro de massa operando no modo W e aquisição direta de dados (Taquita, 2006 – comunicação pessoal).

4.3 Análise dos espectros de massa

Os íons gerados no espectrômetro de massa, no tempo de corrida de 70 minutos, foram selecionados, utilizando-se o programa MassLynks, para a obtenção dos íons de maior intensidade, em intervalos de 10 minutos. Esses dados foram transportados para o programa OriginPro 7.0 e novamente selecionados os picos no filtro de 1x1x1 seleção de picos - pesquisa de retângulos: largura=1, altura=1 e altura mínima=1 (*pick peaks - search rectangle: width=1, Height=1 e minimum height=1*) e transportados para uma planilha do programa Excel, para análise estatística desses grupos de íons obtidos.

A análise discriminante (AD), uma técnica de análise estatística multivariada (MANOVA) utilizada em análise das propriedades e de seqüências de proteínas (Klein et al., 1984; Perrière et al., 1996), foi realizada no software XLSTAT-PRO version 7.5.2. (copyright© 1995-2004 Addinsoft), em versão disponível por 30 dias (<http://www.xlstat.com>), com nível de significância $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos resultados obtidos em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A análise em HPLC dos estratos digeridos com tripsina obtido de isolados dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Drechslera maydis* (Figura 1) gerou um perfil cromatográfico semelhante para as duas espécies, devido, provavelmente, à existência de baixa concentração de peptídeos detectáveis na amostra de trabalho,

Os perfis cromatográficos gerados a partir da digestão com tripsina, do extrato total de proteínas, do micélio de *S. maydis*, isolado May-74, e *S. macrospora*, isolado Mc-73, apresentaram diferença no tempo de retenção de 25 minutos (Figura 2). Observou-se que esses dois fungos podem ser distinguidos com base nos perfis cromatográficos obtidos. Entretanto, para as sementes de milho com e sem inoculação com *S. macrospora* e com *S. maydis* (Figura 3A e 3B), não foi possível observar diferenças marcantes entre os respectivos cromatogramas. Isso ocorreu, provavelmente, por tratar-se de misturas de proteínas e peptídeos muito complexas e muito concentradas.

Segundo Fallon et al. (1996) e Sanchez (1998), quando se efetua a separação de peptídeos, tais como os resultantes de digestão trípica, recomenda-se avaliar diferentes fases hidrofóbicas, para determinar a que proporciona melhor seletividade de separação da mistura particular de peptídeos. Isso porque a separação de peptídeos em HPLC resulta da interação súbita dos peptídeos com a superfície da fase reversa, ou seja, a fase sólida, e afeta essa separação de maneira sutil, mas, muito importante. Essa separação é muito sensível à densidade e à uniformidade da fase hidrofóbica ligada na matriz de sílica.

Todavia, Moraes et al. (2003) utilizaram HPLC para determinar a dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em grãos de milho armazenados, por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Esses autores observaram alta correlação (0,94; $P < 0,01$) entre a concentração de ergosterol e as unidades formadoras de colônias fúngicas presentes nas amostras. Ao utilizar HPLC na detecção de micotoxinas, presentes em rações comerciais para animais em Lisboa, Portugal, Martins et al. (2003) observaram que a ocratoxina A foi detectada em cinco amostras (8,3%), com níveis que oscilaram de 2,0 a 3,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A fumonisina B1 e o deoxinivalenol estavam presentes em três amostras (5,0%) com níveis de contaminação de 12,0 a 24,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 100,0 a 130,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Guthertz et al. (1993), utilizando também HPLC, mas, para identificação de mycobacteria, demonstraram que esse método foi específico e reprodutível, para a identificação rápida e acurada do complexo *M. avium* e *M. intracelulare*.

Portanto, esse método pode ser empregado na detecção de fungos em sementes, desde que sejam aperfeiçoadas as técnicas para extração e encontrados os marcadores bioquímicos específicos para cada microrganismo avaliado.

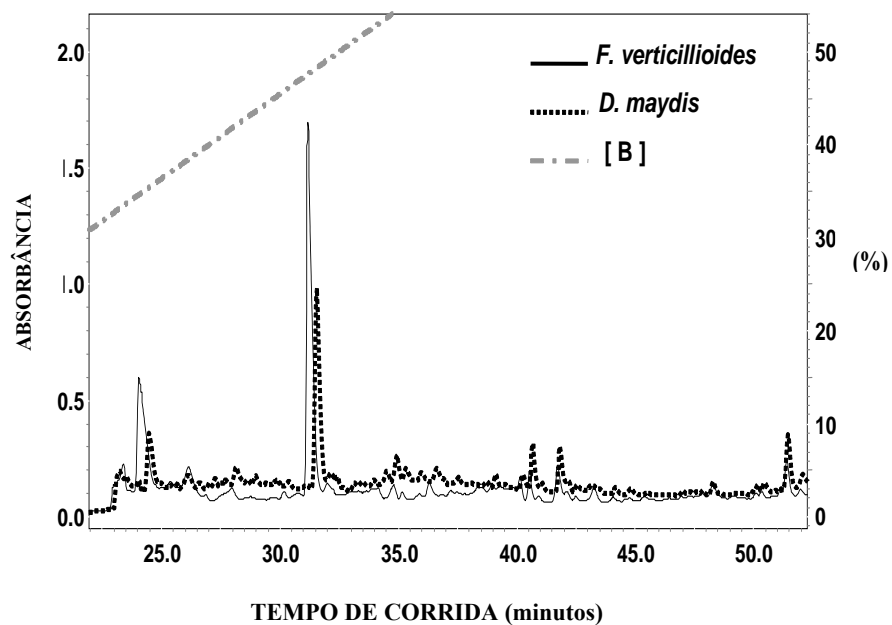


FIGURA 1: Cromatograma do extrato bruto de proteínas, digerido com tripsina, de *F. verticillioides* e *D. maydis*, em HPLC. Intensidade de absorbância do detector UV igual a 216 nm e [B] gradiente linear de acetonitrila (0,1 % ac. trifluoracético) em porcentagem (%). UFLA, Lavras, MG, 2006.

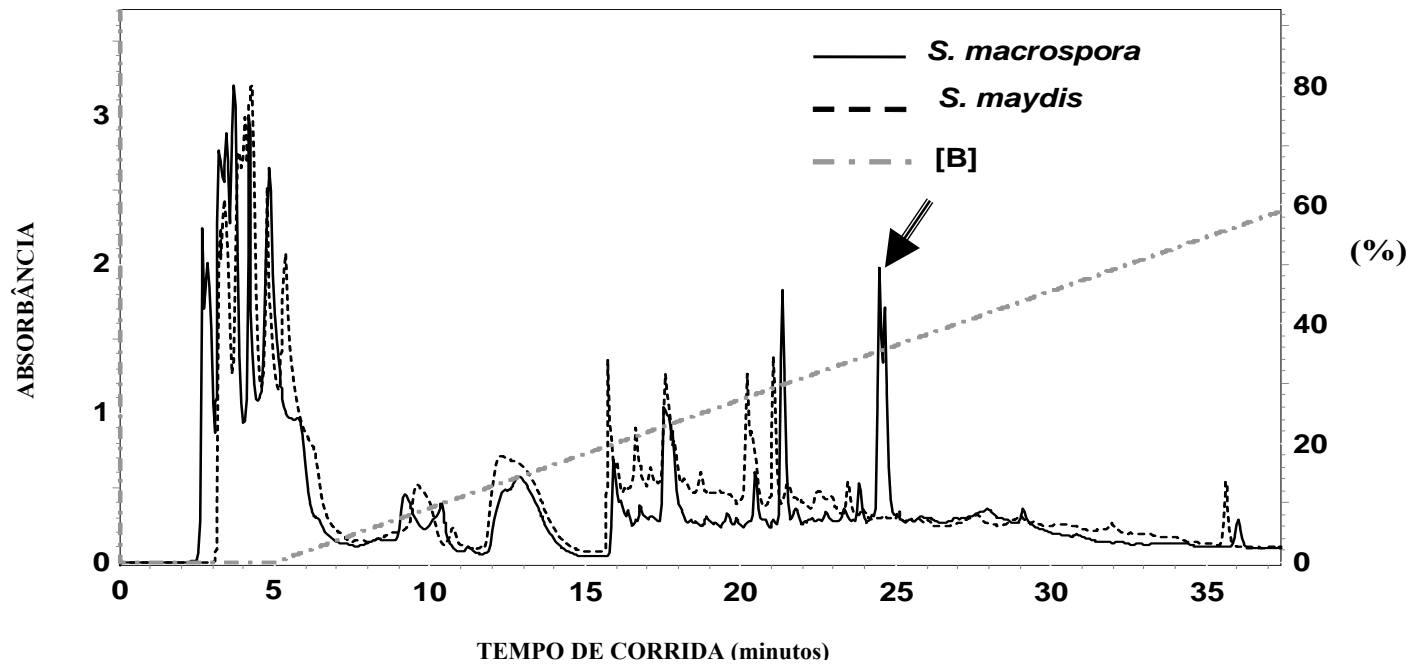


FIGURA 2: Cromatograma do extrato bruto de proteínas, digerido com tripsina, de *S. macrospora* e *S. macrospora*, em HPLC. Intensidade de absorvância do detector UV igual a 216 nm e [B] gradiente linear de acetonitrila (0,1 % ac. trifluor acético) em porcentagem (%). UFLA, Lavras, MG, 2006

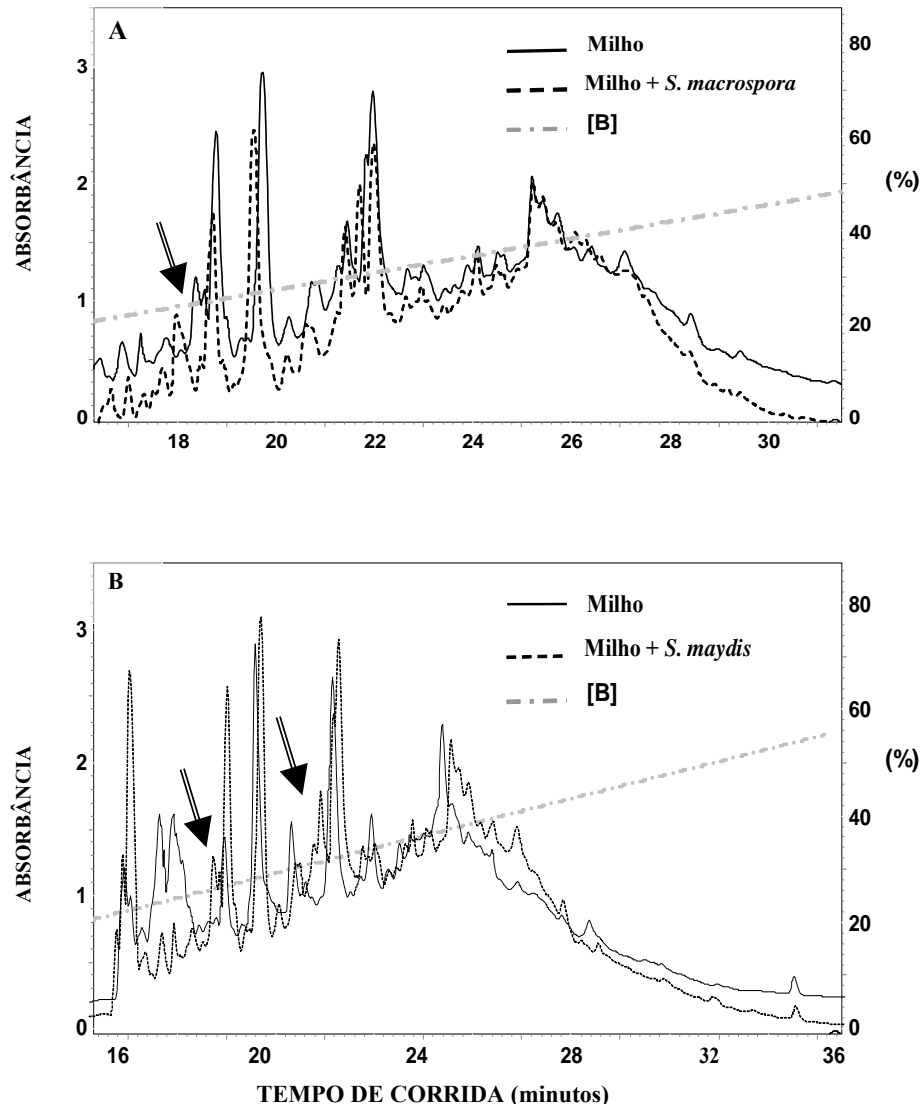


FIGURA 3: Cromatograma do extrato bruto de proteínas, digerido com tripsina, de milho, de milho + *S. macrospora* (A) e milho + *S. maydis* (B) em HPLC. Intensidade de absorbância do detector UV igual a 216 nm e [B] gradiente linear de acetonitrila (0,1 % ac. trifluoracético) em porcentagem (%). UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.2 Resultados do teste de sanidade de sementes

Não foi observada incidência de *S. maydis* e nem *S. macrospora*, pelo teste sanidade de sementes de milho, nos lotes controle, sem inoculação e sem incubação (Milho) e com incubação por 72 horas (Milho_72h), exceto a repetição 3 do lote Milho_72h, que apresentou 1,3% de incidência de *S. maydis* (Figura 4B). Verificou-se também a incidência de *S. maydis* (Figuras 5A e 5B) e *S. macrospora* (Figura 6A e 6B) em todos os lotes de sementes inoculadas por RH, nos tempos de 48 e 72 horas de incubação. Em todos os lotes de sementes foi constatada a presença de *F. verticillioides* (Figuras 4A, 4B, 5A, 5B, 6A e 6B).

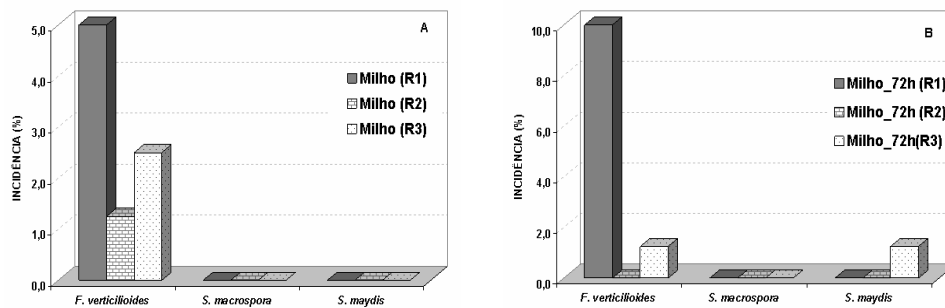


FIGURA 4: Resultado do teste de sanidade de sementes de milho (A) sem inoculação e sem incubação; (B) sem inoculação e incubadas em restrição hídrica por 72 horas (Milho_72h). Repetições 1, 2 e 3 (R₁, R₂ e R₃).UFLA, Lavras, MG, 2006.

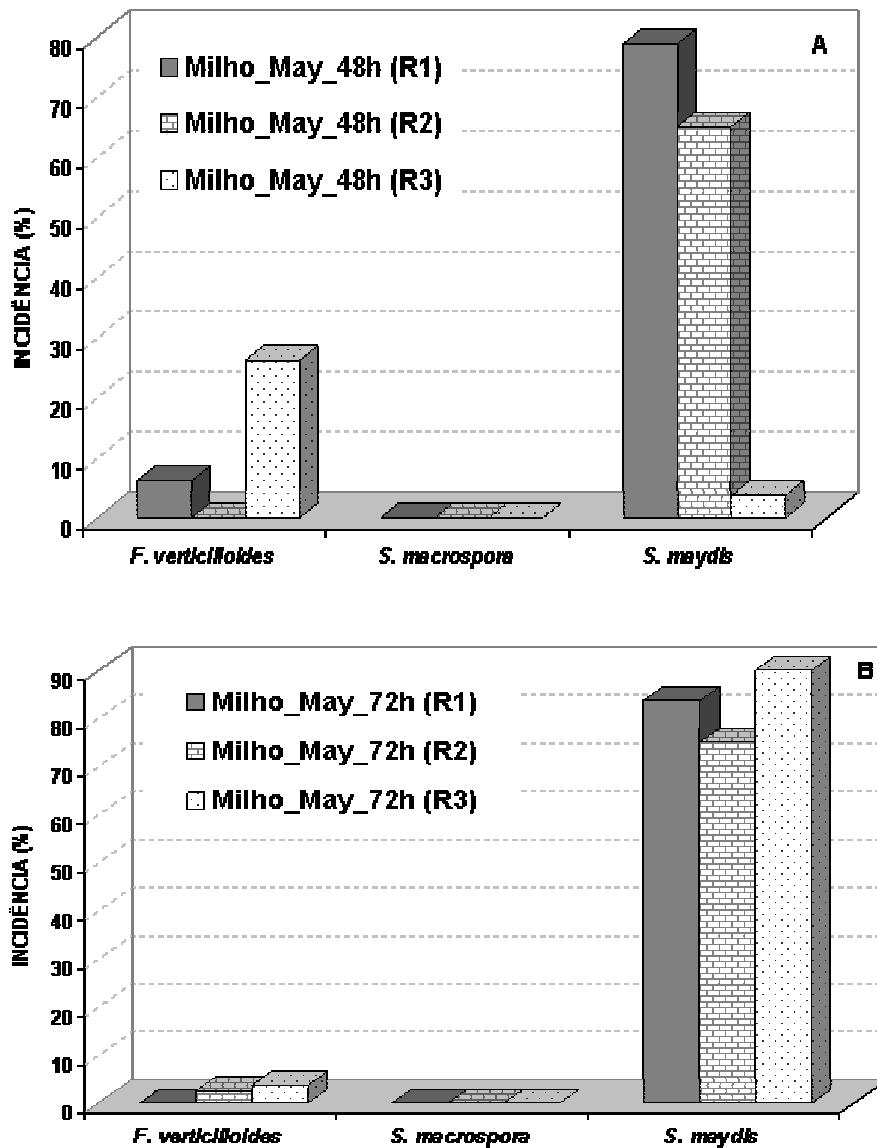


FIGURA 5: Resultado do teste de sanidade de sementes de milho incubadas em substrato de papel (A) Milho_May_48h: inoculadas em restrição hídrica com *S. maydis* e incubadas por 48 horas; (B) Milho_May_72h: inoculadas em RH com *S. maydis* por 72 horas. Repetições 1, 2 e 3 (R₁, R₂ e R₃).UFLA, Lavras, MG, 2006.

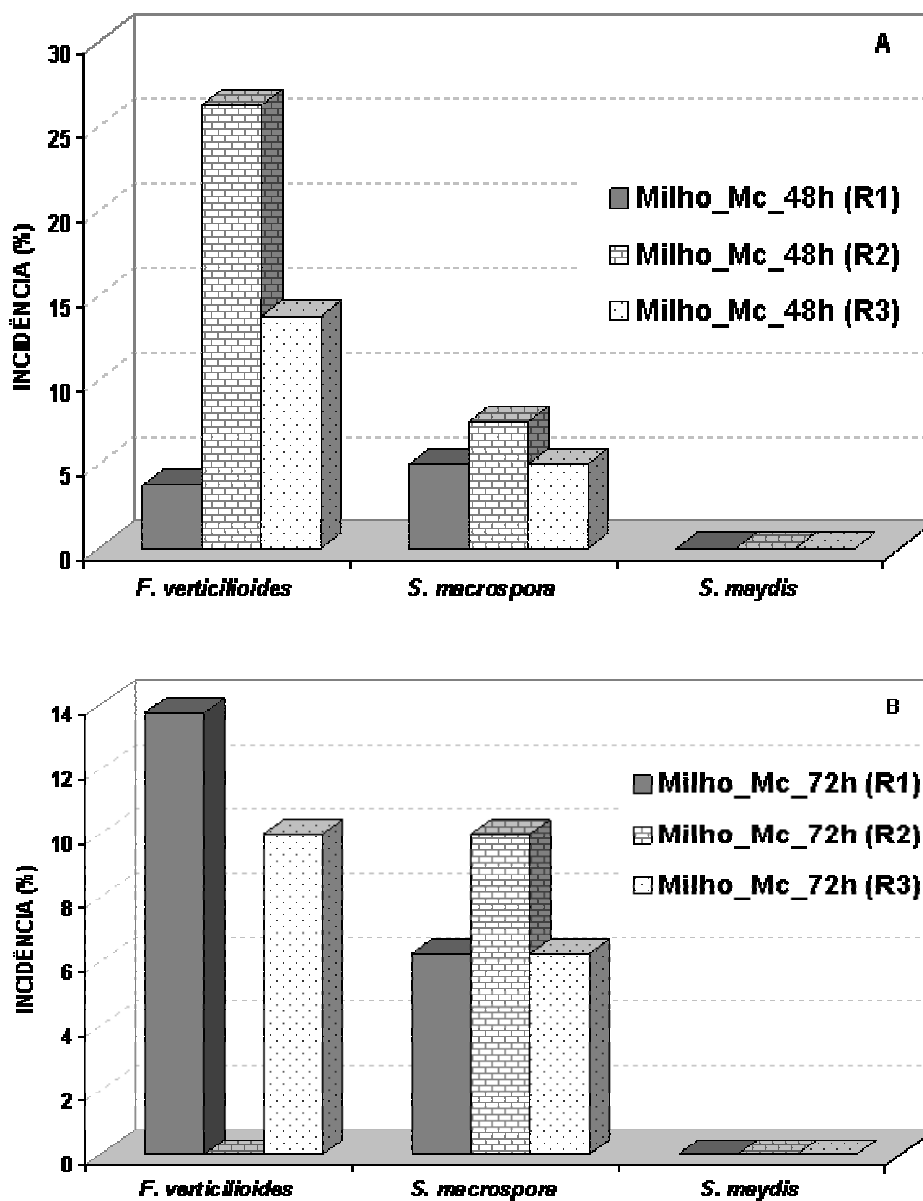


FIGURA 6: Resultado do teste de sanidade de sementes de milho incubadas em substrato de papel (A) Milho_Mc_48h: inoculadas em restrição hídrica com *S. macrospora* por 48 horas; (B) Milho_Mc_72h: inoculadas em RH com *S. macrospora* por 72 horas. Repetições 1, 2 e 3 (R₁, R₂ e R₃). UFLA, Lavras, MG, 2006.

5.3 Análise dos resultados obtidos por espectrometria de massa

A análise, por CapLC, do extrato protéico total das amostras digeridas com tripsina resultou nos cromatogramas (Figuras 7A, 7B, 8A, 8B, 9A e 9B) dos quais foram gerados, por espectrometria de massa, os espectros MS dos íons de maior intensidade, em intervalos de 10 minutos.

O perfil protéico triptico reflete a resposta dinâmica e a complexidade das amostras avaliadas entre os diferentes tratamentos. Efetuou-se a análise discriminante (AD) dos espectros MS dos íons de maior intensidade, obtidos no intervalo de corrida cromatográfica de 0 a 10 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina de sementes de milho controle (com e sem incubação) (Figuras 10A e 10B) e todos os demais tratamentos de sementes inoculadas com *S. maydis* e incubadas durante 48 horas (Milho_May_48h) e 72 horas (Milho_May_72h), sementes inoculadas com *S. macrospora* e incubadas durante 48 horas (Milho_Mc_48h) e 72 horas (Milho_Mc_72h), além das amostras de micélio de culturas puras de *S. maydis*, de *S. macrospora* e de *F. verticillioides*. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos formados, pela combinação dos pontos obtidos no intervalo de corrida de 0 a 10 minutos, com amplitude de 1x1x1 (*width x height x minimum height*) (Figura 11).

Mas, pela AD realizada para as mesmas variáveis, no intervalo de corrida de 10 a 20 minutos (Figura 12), observou-se que houve a formação de 7 grupos distintos, com nível de confiança de 99,07% de probabilidade. Portanto, houve separação de grupos distintos com base nos perfis de peptídeos tripticos obtidos das sementes de milho controle, das sementes inoculadas com *S. maydis* e incubadas por 48 horas e 72 horas, das sementes inoculadas com *S. macrospora* e incubadas durante 48 horas e 72 horas.

Entretanto, os dados apresentados (Figura 12) relativos à AD realizada no intervalo de corrida de 10- 20 minutos revelam que não houve diferença

estatística significativa entre os grupos de perfis de peptídeos trípticos dos isolados de *F. verticillioides* e das sementes de milho controle (Milho_72h), nem entre o grupo dos perfis de de peptídeos trípticos de *S. maydis* e *S. macrospora* (Tabela 7A, Figura 12).

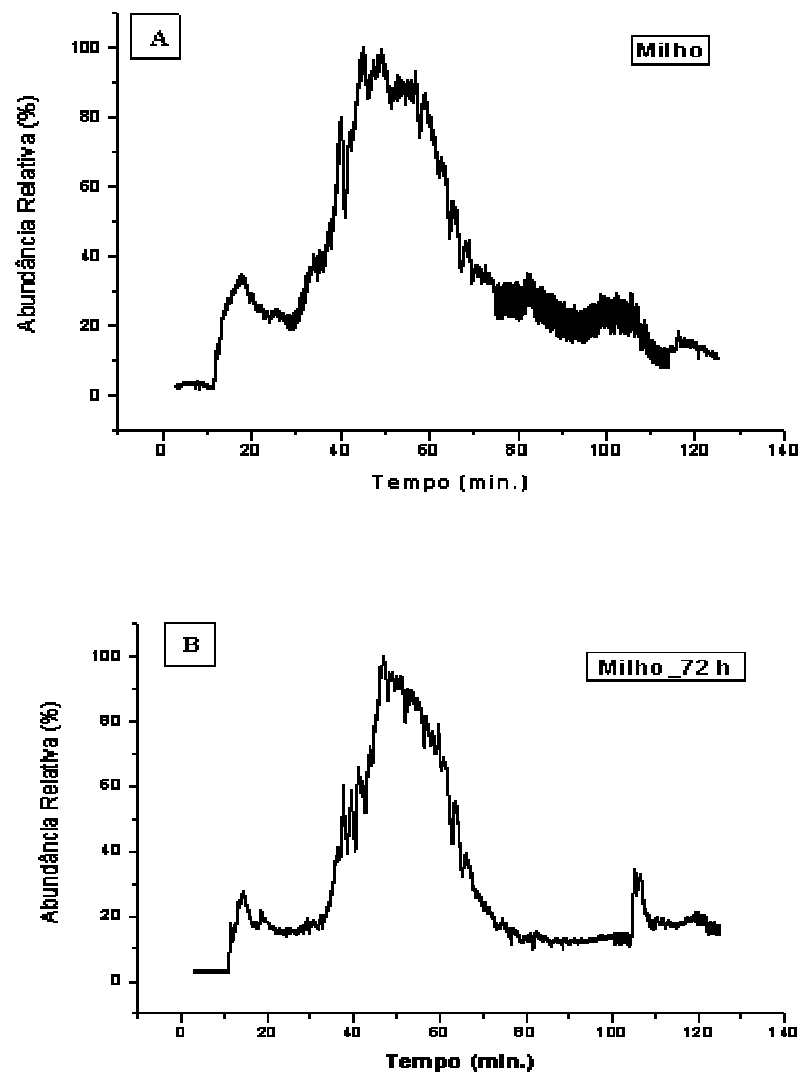


FIGURA 7: Cromatograma do extrato protéico total de sementes de milho (A) sem inoculação e sem incubação e (B) sem inoculação e incubadas durante 72 horas, digerido com tripsina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

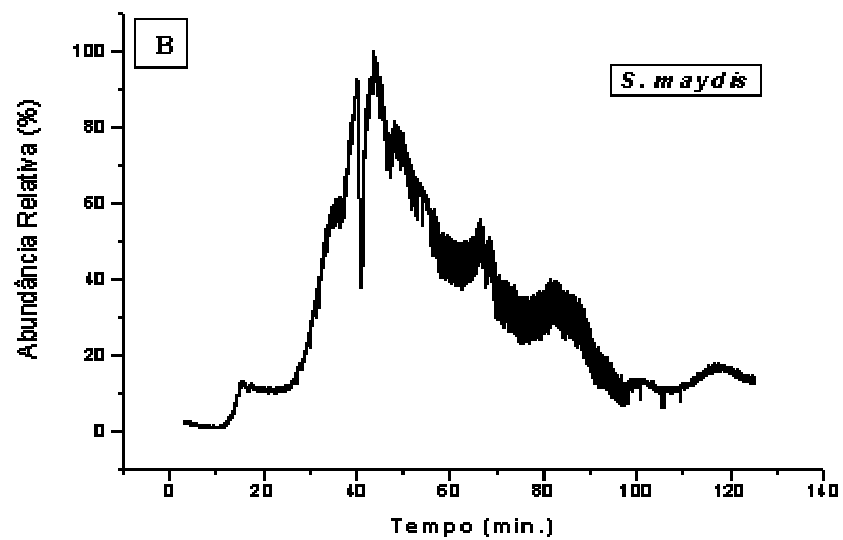
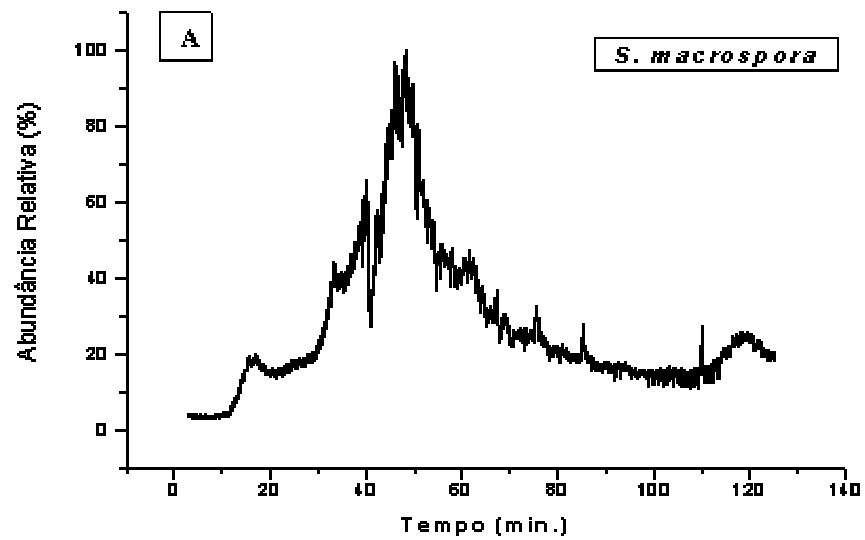


FIGURA 8: Cromatograma do extrato protéico total de micélio de (A) *S. macrospora* e (B) *S. maydis*, digerido com tripsina. UFLA, Lavras, MG, 2006.

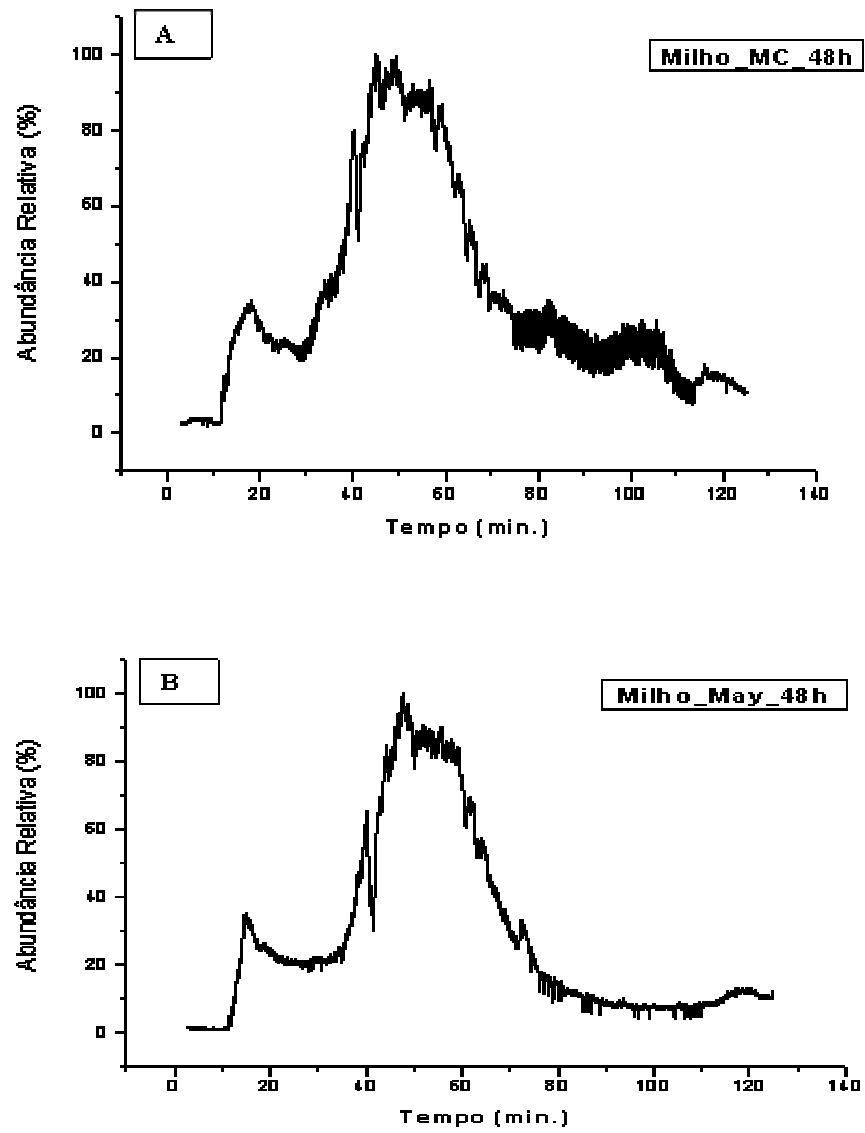


FIGURA 9: Cromatograma do extrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho inoculadas com (A) *S. macrospora* e (B) *S. maydis*, com tempo de inoculação de 48horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

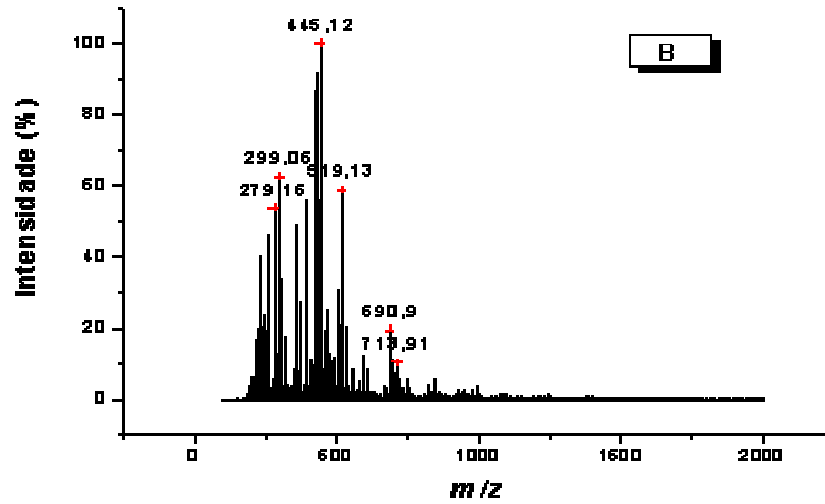
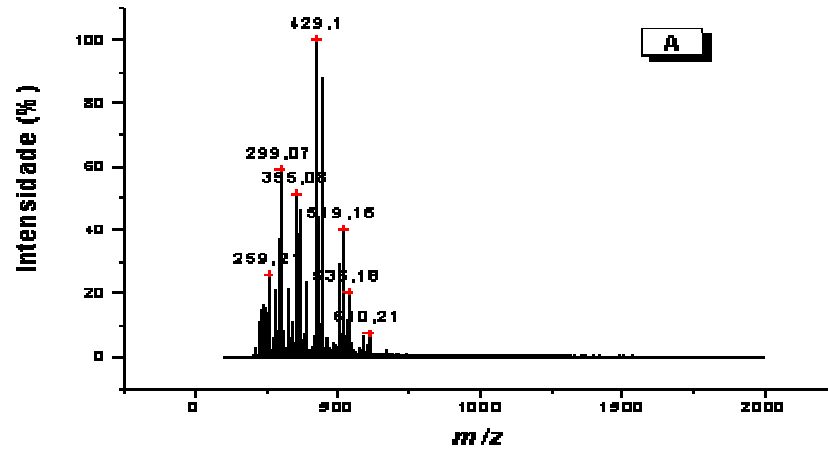


FIGURA 10: Espectro MS dos íons de maior intensidade, obtidos no intervalo de corrida cromatográfica de 0 a 10 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho (A) sem inoculação e sem incubação e (B) sem inoculação e com tempo de incubação de 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

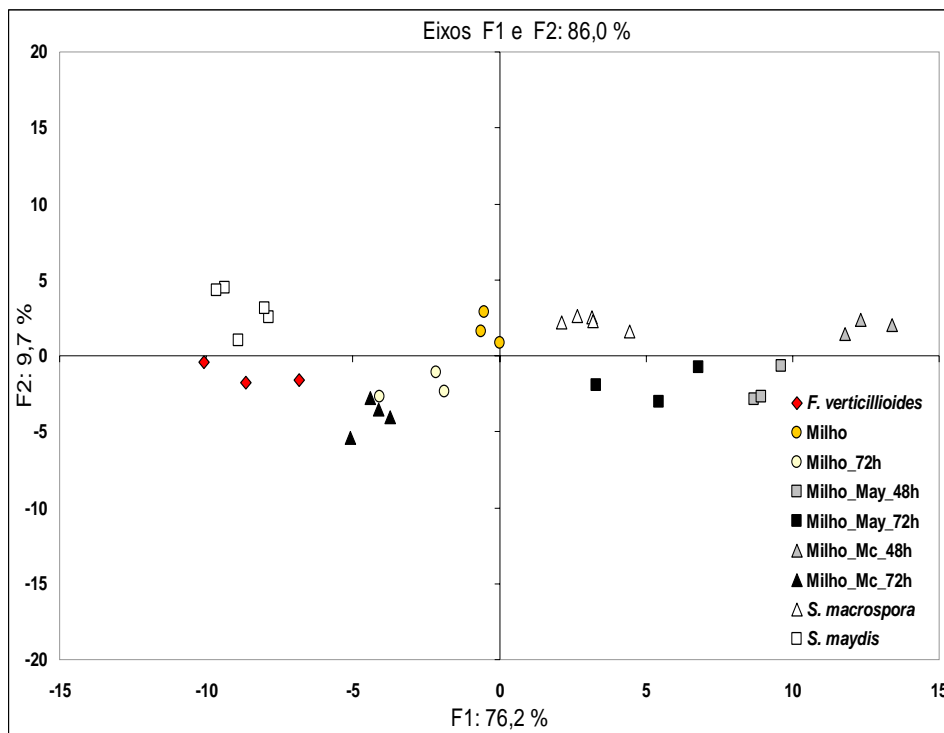


FIGURA 11: Análise discriminante (AD), contendo 20 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 0 a 10 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina. Para sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho), sem inoculação e incubadas por 72 horas (Milho_72h), do micélio de *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, de sementes de milho inoculadas com *S. macrospora* (Milho_Mc_48h e Milho_Mc_72h) e com *S. maydis* (Milho_May_48h e Milho_May_72h), incubadas por 48 horas e 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

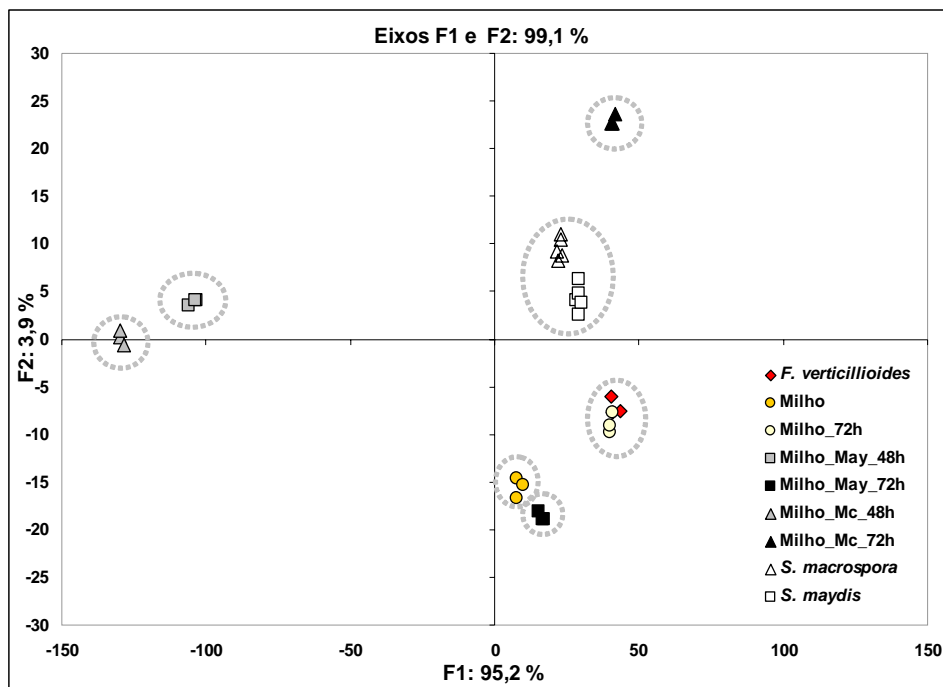


FIGURA 12: Análise discriminante (AD), contendo 21 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 10 a 20 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina. Para sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho), sem inoculação e incubadas por 72 horas (Milho_72h), do micélio de *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, de sementes de milho inoculadas com *S. macrospora* (Milho_Mc_48h e Milho_Mc_72h) e com *S. maydis* (Milho_May_48h e Milho_May_72h), incubadas por 48 horas e 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Da mesma forma, os espectros MS dos íons de maior intensidade, obtidos no intervalo de corrida cromatográfica de 20 a 30 minutos, do extrato protéico total de sementes de milho sem inoculação e sem incubação e sem inoculação com incubação por 72 horas, digerido com tripsina (Figuras 13A e 13B), bem como os demais tratamentos, foram submetidos à análise discriminante. Observou-se a formação de oito grupos distintos ($F_{\text{observado}} = 2,259$ menor do que $F_{\text{crítico}} = 1,828$, o valor de F foi calculado de acordo com a aproximação de Rao ($P < 0,05$) (Tabela 8A e Figura 14). Não houve diferença estatística significativa, apenas entre os grupos de variáveis sementes de milho sem inoculação, incubadas por 72 horas (Milho_72h) e o extrato protéico de *F. verticillioides* (Tabela 8A).

No tempo de corrida de 30 a 40 minutos, a diferença entre os grupos centróides foi estatisticamente significativa, com 83,49 % de probabilidade ($F_{\text{observado}} = 1,614$ menor do que $F_{\text{crítico}} = 1,600$, calculado de acordo com a aproximação de Rao, $P < 0,05$) e houve a formação de quatro grupos, que correspondem a sementes de milho inoculadas no tempo de 48 horas, com *S. macrospora* e *S. maydis*, mais extrato protéico de *S. macrospora*; todos os demais tratamentos formaram um único grupo (Tabela 9A e Figura 15).

Por meio do método de investigação e análise do perfil protéico, empregando-se a espectrometria de massa, associada aos métodos de análise estatística multivariada, obtêm-se perspectivas inovadoras e promissoras, na diagnose de doenças de plantas, tanto em sementes como em partes vegetativas.

Em estudos realizados por Slota et al. (2003), em análise de ordenação de dados em grupos, obtidos de espectrômetro de massa, observou que os resultados dependem da precisa semelhança dos peptídeos de acordo com sua m/z e não da comparação da altura dos picos no espectro. Esse autor considerou necessário apenas a ordenação relativa da altura dos picos dentro do espectro estudado.

A determinação da abundância relativa do nível de proteínas em um organismo ou tecido, submetido às diferentes condições fisiológicas ou ambientais, segundo Ferguson & Smith (2003), é essencial para o estudo do processo da doença e a resposta celular ao stress.

Nesse sentido, no presente estudo, observou-se que a abundância relativa de peptídeos também pode ser utilizada na detecção de fitopatógenos em sementes, sendo esse o primeiro estudo de diagnose de fungos em sementes de milho utilizando-se o espectrômetro de massa.

Além disso, Gingras et al. (2005) relatam que as proteínas freqüentemente funcionam com componentes de um amplo complexo, para exercer uma função específica e a formação desses complexos pode ser regulada. Por exemplo, eventos de sinalização intracelular freqüentemente requerem proteína transiente e ou interação proteína-proteína para propagação. A proteína se liga a uma seqüência específica de DNA, RNA ou metabólitos e regulam e modulam uma função celular específica. Então, segundo esses autores, caracterizar um complexo de proteínas oferece um grande entendimento na função das proteínas.

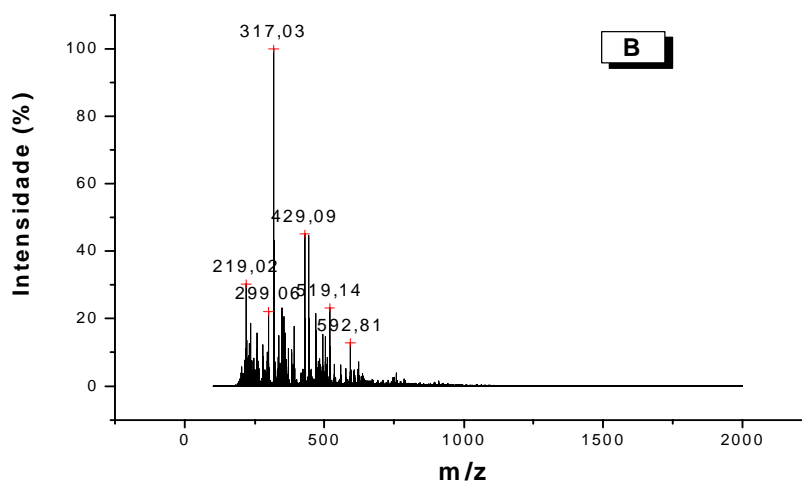
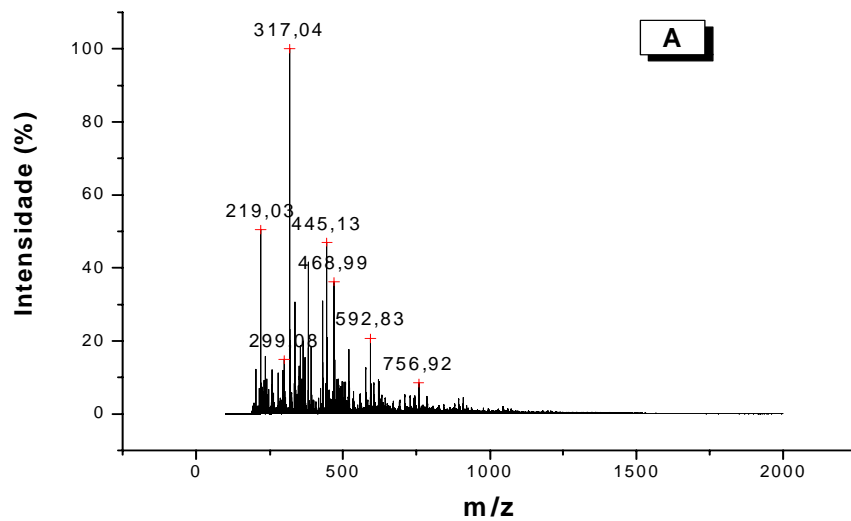


FIGURA 13: Espectro MS dos íons de maior intensidade, obtidos no intervalo de corrida cromatográfica de 20 a 30 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho (A) sem inoculação e sem incubação e (B) sem inoculação e com tempo de incubação de 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

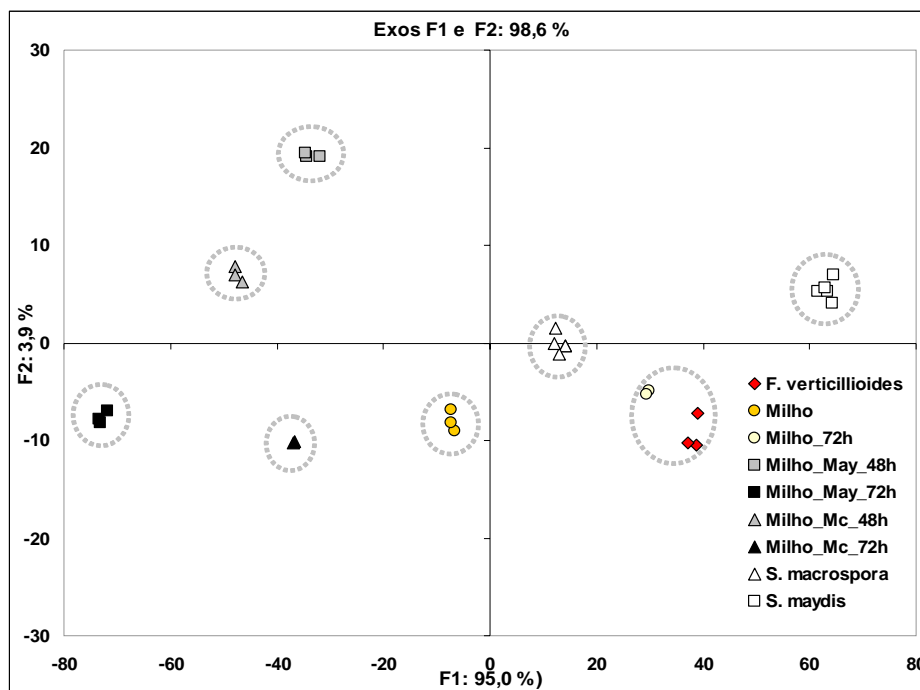


FIGURA 14: Análise discriminante (AD), contendo 21 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 20 a 30 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina. Para sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho), sem inoculação e incubadas por 72 horas (Milho_72h), do micélio de *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, de sementes de milho inoculadas com *S. macrospora* (Milho_Mc_48h e Milho_Mc_72h) e com *S. maydis* (Milho_May_48h e Milho_May_72h), incubadas por 48 horas e 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

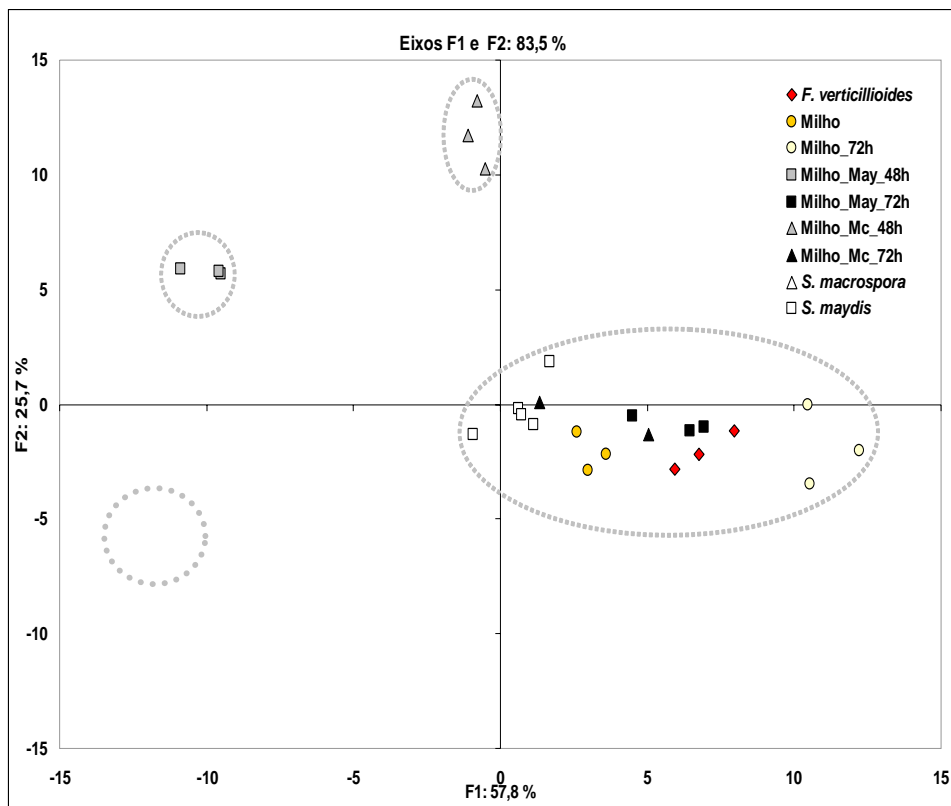


FIGURA 15: Análise discriminante (AD), contendo 21 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 30 a 40 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina. Para sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho), sem inoculação e incubadas por 72 horas (Milho_72h), do micélio de *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, de sementes de milho inoculadas com *S. macrospora* (Milho_Mc_48h e Milho_Mc_72h) e com *S. maydis* (Milho_May_48h e Milho_May_72h), incubadas por 48 horas e 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

O perfil de peptídeos obtidos em ESI, no intervalo de corrida de 40 a 50 minutos do extrato de proteínas totais de sementes de milho sem inoculação, de sementes sem inoculação e com tempo de incubação de 72 horas (Figuras 16A e 16B), de micélio de *S. macrospora*, *S. maydis* e *F. Verticillioides*, de sementes inoculadas com *S. macrospora* incubadas por 48 horas e 72 horas e de sementes inoculadas com *S. maydis* e incubadas durante 48 horas e 72 horas, não houve diferença estatística significativa na formação de grupos, $F_{\text{observado}} = 1,732$ foi menor do que o $F_{\text{critico}} = 1,797$. Entretanto, houve tendência na separação de grupos entre *S. maydis*, sementes inoculadas com *S. maydis*, nos tempos de 48 e 72 horas (Milho_May_48h e Milho_May_72h) e das sementes inoculadas com *S. macrospora* por 48 horas (Milho_MC-48h) e os demais tratamentos formaram um único grupo (Figura 17).

No intervalo de corrida de 50 a 60 minutos observou-se, pela AD, a formação de 7 grupos distintos (Tabela 10A e Figura 18). Entre os tratamentos sementes de milho inoculadas com *S. maydis* e incubadas nos tempos de 48 e 72 horas (Milho_May_48h), (Milho_May_72h) e extrato de *F. verticillioides*, não houve a separação em grupos (Tabela 10A e Figura 18). Finalmente, no intervalo entre 60 e 70 minutos, não houve diferença estatística significativa entre os grupos de variáveis analisadas (Figura 19).

Os intervalos de tempo de corrida cromatográfica que apresentaram os resultados mais promissores para detecção de *S. macrospora* e *S. maydis* foram de 20 a 30 minutos e de 50 a 60 minutos, nas condições estabelecidas neste experimento. Entretanto, com o aprimoramento de técnicas de extração e purificação do extrato protéico total, além da realização do seqüenciamento de marcadores específicos dos fitopatógenos em estudo, o tempo de corrida poderá ser de, no máximo, 20 minutos. Após o estabelecimento e validação desse método de detecção, o tempo de análise será de no máximo 48 horas, desde a recepção da amostra até a emissão do boletim de análise. Contra 7 dias pelo

método de incubação das sementes em BDA (McGee, 2002) e 15 de incubação em papel de filtro (Mário e Reis, 2001).

De maneira geral, nos intervalos de tempo de corrida cromatográfica avaliados, a partir do tempo de 10 minutos, naqueles tratamentos nos quais não foi possível a separação em grupos entre os tratamentos, isso foi devido à supressão de sinal de detecção dos íons menos abundantes, que são responsáveis pelas diferenças, por íons semelhantes entre as referidas amostras, que apresentam maior abundância relativa. Nesse sentido, segundo Slotta et al. (2003), dois peptídeos podem apresentar a mesma relação m/z e ainda serem diferentes.

Outro aspecto a ser considerado é que essas foram as primeiras informações obtidas, relacionadas à detecção de *S. macrospora* e *S. maydis*, utilizando-se um espectrômetro de massa. Então, esforços devem ser realizados no desenvolvimento de métodos de extração de peptídeos e ou marcadores bioquímicos específicos para cada microrganismos desejado. Após o sequenciamento e depósito desses marcadores no banco de dados, ter-se--a informações necessárias, as quais devem ser transformados em conhecimento, para que essa tecnologia possa ser difundida como rotina de detecção e diagnose desses e outros fitopatógenos em sementes e tecido vegetal de milho e também em outras culturas.

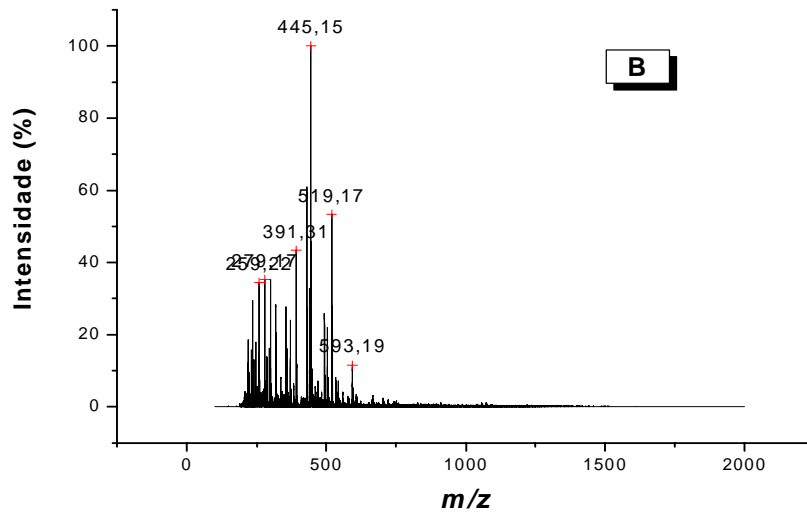
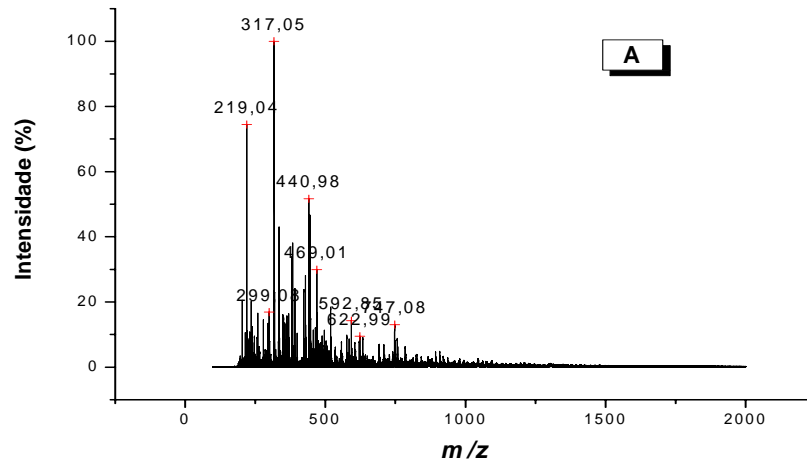


FIGURA 16: Espectro MS dos íons de maior intensidade, obtidos no intervalo de corrida cromatográfica de 40 a 50 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho (A) sem inoculação e sem incubação e (B) sem inoculação e com tempo de incubação de 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

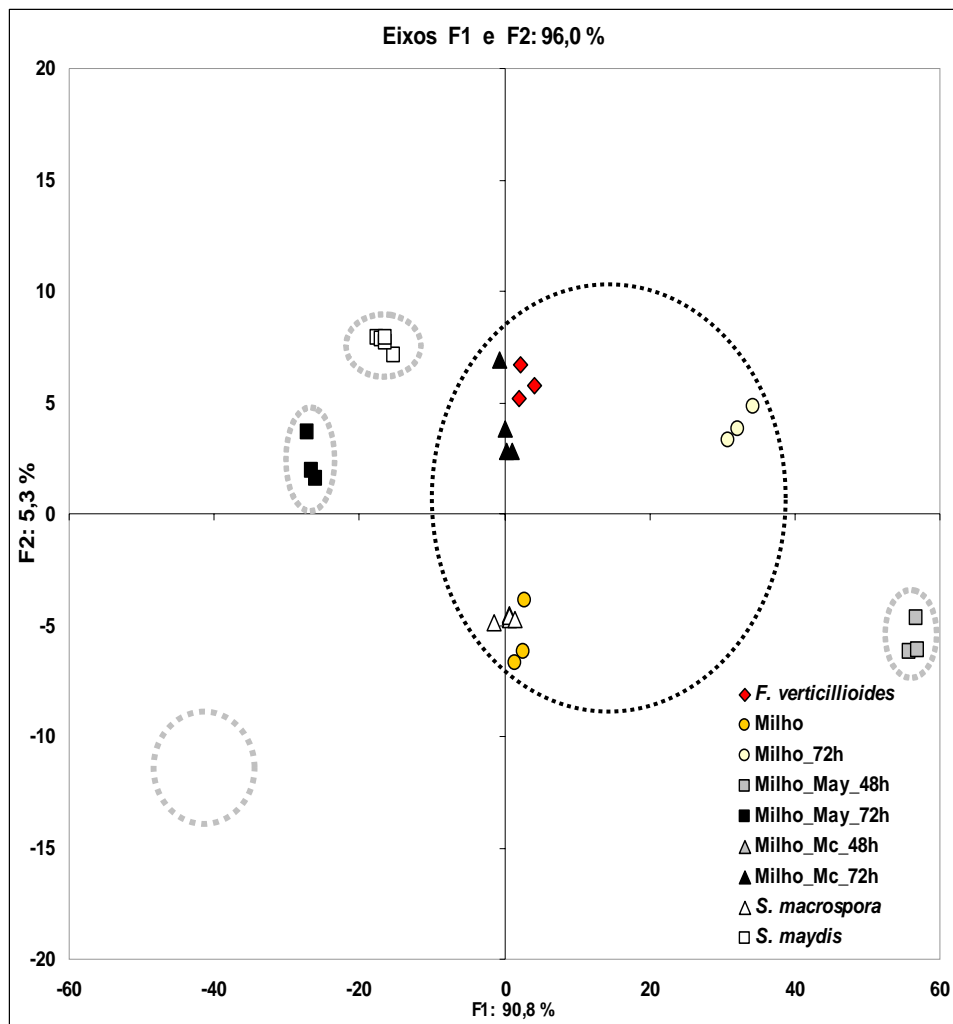


FIGURA 17: Análise discriminante (AD), contendo 23 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 40 a 50 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina. Para sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho), sem inoculação e incubadas por 72 horas (Milho_72h), do micélio de *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, de sementes de milho inoculadas com *S. macrospora* (Milho_Mc_48h e Milho_Mc_72h) e com *S. maydis* (Milho_May_48h e Milho_May_72h), incubadas por 48 horas e 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

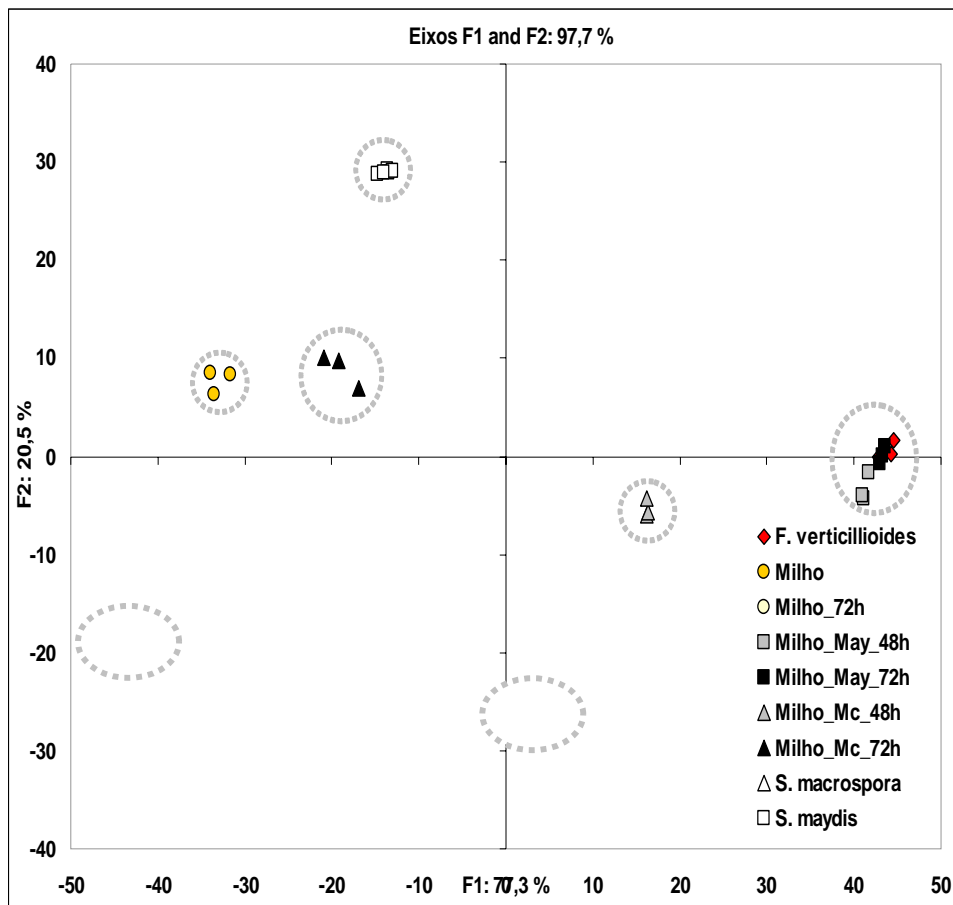


FIGURA 18: Análise discriminante (AD), contendo 23 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 50 a 60 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina. Para sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho), sem inoculação e incubadas por 72 horas (Milho_72h), do micélio de *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, de sementes de milho inoculadas com *S. macrospora* (Milho_Mc_48h e Milho_Mc_72h) e com *S. maydis* (Milho_May_48h e Milho_May_72h), incubadas por 48 horas e 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

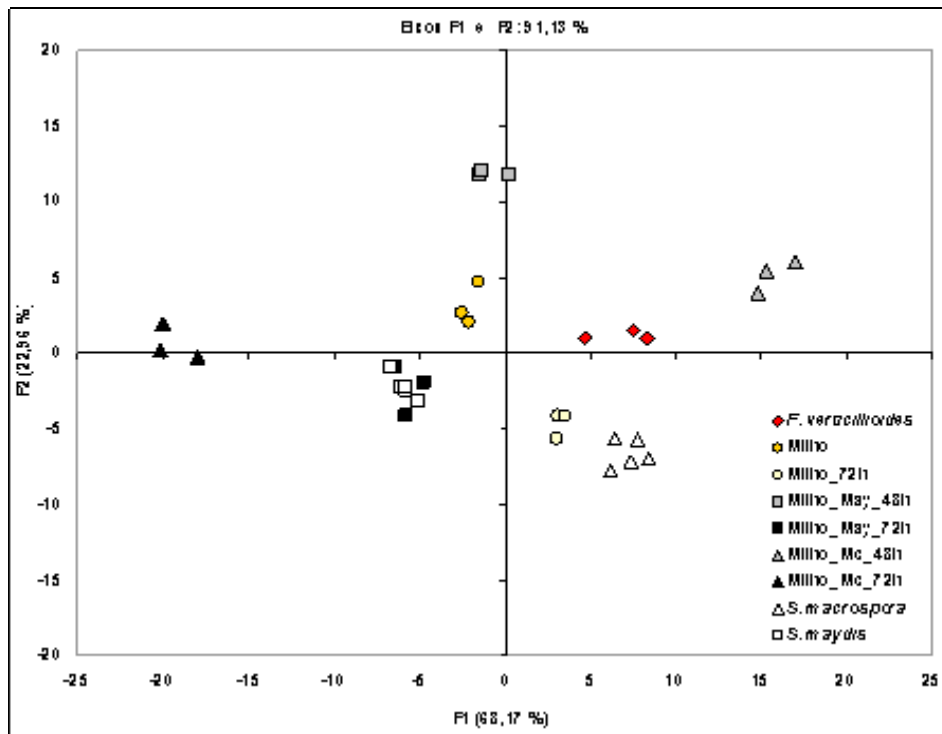


FIGURA 19: Análise discriminante (AD), contendo 21 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 60 a 70 minutos, do extrato protéico total digerido com tripsina, para sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho), sem inoculação e incubadas por 72 horas (Milho_72h), do micélio de *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora*, de sementes de milho inoculadas com *S. macrospora* (Milho_Mc_48h e Milho_Mc_72h) e com *S. maydis* (Milho_May_48h e Milho_May_72h), incubadas por 48 horas e 72 horas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

6 CONCLUSÕES

1. Os fungos *S. maydis* e *S. macrospora* podem ser diferenciados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
2. O método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) empregado não foi eficiente na detecção dos fungos *S. maydis* e *S. macrospora*, em sementes de milho.
3. Os fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* podem ser detectados e diferenciados entre si, a partir da análise dos perfis de peptídeos trípticos analisados por espectrometria de massa.
4. A distinção entre lotes de sementes de milho submetidos ou não à restrição hídrica pode ser realizada pela análise dos perfis de peptídeos trípticos analisados por espectrometria de massa.
5. Os intervalos de tempo de corrida cromatográfica de 20 a 30 e 50 a 60 minutos, foram os que apresentaram melhores perspectivas para a utilização deste método de detecção de *S. maydis* e *S. macrospora* em sementes de milho, por espectrometria de massa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, p.198-207, 2003.

COOPER, B. et al. Investigative proteomics: identification of an unknown plant vírus from infected plants using mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v.14, p.736-741, 2003.

De HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and applications**. Paris: Masson ed., 1996. 340p.

FALLON, A.; BOOTH, R.F.G.; BELL, L. D. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Applications of HPLC in biochemistry**. Glasgow: Elsevier, 1996. 338p.

FERGUSON, P.L.; SMITH, R.D. Proteome analysis by mass spectrometry. **Annu. Ver. Biophys. Struct.**, v.32, p.399-424, 2003.

FINEHOUT, E.J.; LEE, K.H. An introduction to mass spectrometry applications in biological research. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v.32, n.2, p.93-100, 2004.

GINGRAS, A-C.; AEBERSOLD, R.; RAUGHT, B. Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. **Journal Physiol.**, v.563, n.1, p.11-21, 2005.

GUTHERTZ, L.S. et al. Curvilinear-Gradient High-Performance Liquid Chromatography for identification of mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n.7, p.1876-1881, 1993.

HOLLEMEYER, K. et al. Proteolytic peptide patterns as indicators for fungal infections and nonfungal affections of human nails measured by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.338, p.326-331, 2005

KLEIN, P.; KANEHISA, M.; De LISI, C. Prediction of protein function from sequence properties discriminant analysis of a data base. **Biochim. Biophys. Acta**, v.787, p.221-226, 1984.

KOTAKE, A. N.; FUNAE, Y. High-performance liquid chromatography technique for resolving multiple forms of hepatic membrane-bound cytochrome P-450. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.77, n.11, p.6473-6475, 1980.

LIBERA, L.D. High Performance Liquid Chromatography in the analysis and separation of contractile proteins. **Basic Appl. Mycol.**, v. 11, n.3, p.115-118, 2001.

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

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu Rev. Biochem.**, v.70, p.437-473, 2001.

MÁRIO, J.L.; REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. Maydis* em testes de patologia de sementes de milho. v.26, n.3, 2001.

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; BERNARDO, F. Flora fúngica e pesquisa de micotoxinas em alimentos para animais de companhia. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, n.548, p.179-183, 2003.

McGEE, D.C. PDA médium method to detect *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp* on seeds maize (*Zea mays* L.). In: MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOU-FILHO, D.S. **Seed-Borne Fungi: A contribution to routine seed health analysis.** Switzerland, Bassersdorf: International Seed Testing Association (ISTA), 2002a. p.69.

McGEE, D.C. Principles, advantages and limitations of seed health testing methods. In: MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOU-FILHO, D.S. **Seed-Borne Fungi: A contribution to routine seed health analysis.** Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), 2002b. p.2-8.

MEEK, J.L. Prediction of peptide retention times in high-pressure liquid chromatography on the basis of amino acid composition (lipophilicity/separation techniques). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.77, n3, p.1632-1636, 1980.

MORAES, R.J.Q. et. al. Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, n.4, p.483-489, 2003.

NEERGAARD, P. Historical development and current practices in seed health testing. **Proc. Int. Seed Test. Ass.**, v.30, n.1, p.99-118, 1965

OLSEN, J.V.; MANN, M. Improve peptide identification in proteomics by two consecutive stages of mass spectrometric fragmentation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.101, n.37, p.13417-13422, 2004.

PAPADOPOULOU, K. et. al. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.96, n.22, p.12923–12928, 1999.

PERRIÈRE, G.; LOBRY, J.R.; THIOULOUSE, J. Correspondence discriminant analysis: a multivariate method for comparing classes of protein and nucleic acid sequences. **CABIOS**, v.12, n.6, p.519-524, 1996.

RITOV, V.B.; MENSHIKOVA, E.V.; KELLEY, D.E. High-performance liquid chromatography-based methods of enzymatic analysis: electron transport chain activity in mitochondria from human skeletal muscle. **Analytical Biochemistry**, v.333, p.27–38, 2004.

SANCHEZ, D. Preparative chromatography: Silica-based packing materials for PREP HPLC, SFC and SMB. **Analisis Magazine**, v.26, n.7, p.33-37, 1998.

SINGH, D.V.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Seed health testing of maize: Evaluation of testing techniques, with special reference to *Drechslera maydis*. **Seed Sci. & Technol.**, v.2, p.349-365, 1974.

SLOTTA, D.J. et. al. Clustering mass spectrometry data using order statistics. **Proteomics**, v.3, p.1687–1691, 2003.

WINTZINGERODE, F.V. et. al. Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: A tool for rapid bacterial identification. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.99, n.10, p.7039-7044, 2002.

WUNSCHHEL, S.C. et. al. Bacterial Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Inter-Laboratory Comparison. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v.16, p.456–462, 2005.

ANEXOS

TABELA 1A: Resumo da análise de variância da porcentagem de plântulas normais, do índice de severidade de doença (ISD), da incidência de *S. macrospora*, da porcentagem de plantas emergidas aos 14 DAS, da porcentagem de plântulas sobreviventes aos 35 DAS, do índice de velocidade de emergência (IVE), do peso de matéria seca da parte aérea (PMSA) e de raiz (PMSR). UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM							
		S			QM				
		<i>macrospora</i>	Normais	ISD	Emergiram	Sobreviventes	IVE	PMSA	PMSR
Hib.	1	1704,083**	2640,333**	11971,347**	4641,333**	5896,333**	38,056**	54,943**	30,390**
Isol.	5	2210,083**	17641,733**	21551,777**	17345,200**	21271,133**	112,465**	60,085**	63,100**
Tempo	3	1215,417**	11711,667**	21319,493**	32247,222**	24361,111**	181,686**	52,879**	104,701**
Hib.*Isol.	5	313,283**	424,533**	609,879**	821,533**	876,533**	4,972**	0,821 ^{ns}	1,541**
Hib.*Tempo	3	233,194**	777,889**	615,446**	689,111**	609,889**	4,321**	4,665**	2,623**
Isolado*Tempo	15	123,017**	350,133**	815,694**	1320,356**	1090,378**	8,541**	2,287**	4,916**
Hib.*Isol.*Tempo	15	224,261**	175,689**	239,144**	224,778**	218,089**	1,887**	0,618 ^{ns}	0,793**
CV		45,340	30,750**	11,820	17,440	19,030	21,650	29,120	22,160

** Significativo pelo teste de F, $P \leq 0,01$; ns= não significativo. FV= fonte de variação, GL=grau de liberdade, QM= quadrado médio. Hib.= híbrido, Isol.= isolado.

TABELA 2A: Resumo da análise de variância da área abaixo da curva (AAC) da porcentagem da incidência de *S. macrospora*, da porcentagem plântulas normais, do índice de severidade de doença (ISD), da porcentagem de plantas emergidas aos 14 DAS, da porcentagem de plântulas sobreviventes aos 35 DAS e do índice de velocidade de emergência (IVE). UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	Q.M.					
		<i>S. macrospora</i>	Normais	Emergidas	Sobreviventes	ISD	IVE
Híbrido	1	3000000,00**	6750000,00**	578163,00**	798768,00**	23545739,03**	79566,88**
Isolados	5	3513907,20**	31545148,80**	1788903,00**	2246515,20**	35235391,57**	193360,98 **
Híbrido x Isolado	5	675840,00**	735753,60**	108571,80**	114588,00**	1266129,04**	10314,85**
Erro	36	32480,00	188688,00	7655,00	9870,00	112006,47	1681,23
C.V.	-	23,90	13,02	6,44	8,13	7,45	10,37

** Significativo pelo teste de F, $P \leq 0,01$; ns= não significativo. FV= fonte de variação, GL=grau de liberdade, QM= quadrado médio.

TABELA 3A: Resumo da análise de variância da AAC do peso de matéria seca da parte aérea (PMSA) e do peso de matéria seca de raiz (PMSR) . UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM	
		PMSA	PMSR
Híbrido	1	120101,02**	63248,3940 **
Isolados	5	100510,20**	101413,8186 **
Híbrido x isolado	5	1844,27**	3357,1930 **
Erro	36	482,38	863,8560
C.V.	-	9,25	9,55

** Significativo pelo teste de F, $P \leq 0,01$; ns= não significativo. FV= fonte de variação, GL=grau de liberdade, QM= quadrado médio.

TABELA 4A: Resumo da análise de variância para a variável área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM) de *S. macrospora* e do número de picnídios/cm². UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	QM	
		AACCM	No. Picnídios/cm ² SQRT (Y + 0.5)
Isolado	24	7460,2014**	0,2362 **
Temperatura	1	78212,8070**	45,4066 **
Meio de cultura	2	249991,0817**	30,2421 **
Isolado x temperatura	24	6031,0640**	0,2362 **
Isolado x meio cultura	48	1613,5518**	0,2535 **
Temperatura x meio cultura	2	55662,2930**	30,242 **
Isolado x meio x temperatura	48	789,0076**	0,2535 **
Erro	450	162,4418	0,0151
C.V.	-	16,38	12,53

** Significativo, pelo teste de F, $P \leq 0,01$; ns= não significativo. FV= fonte de variação, GL=grau de liberdade, QM= quadrado médio.

TABELA 5A: Resumo da análise de variância para a variável área abaixo da curva do crescimento miceliano (AACCM) de *S. maydis* e do número de picnídios/cm². UFLA, Lavras, MG, 2005.

FV	GL	QM	
		AACCM	No Pic/Cm2 SQRT(Y + 1,0)
Isolado	17	11964,2393 **	14,4086 **
Temperatura	1	434510,6336 **	97,7179 **
Meio cultura	3	542451,9867 **	1361,5721 **
Isolado*temperatura	17	1939,2362 **	12,9315 **
Isolado*meio cultura	51	2142,1744 **	12,9788 **
Temperatura*meio cultura	3	47392,3714 **	43,7651 **
Isolado*temperatura*meio Cultura	51	1206,0669 **	10,3630 **
Resíduo	576	149,3114	0,0847
CV		12,80	8,75

** Significativo, pelo teste de F, $P \leq 0,01$; ns= não significativo. FV= fonte de variação, GL=grau de liberdade, QM= quadrado médio.

TABELA 6A: Resumo da análise de variância para comprimento (L), diâmetro (D) e a razão entre o diâmetro e o comprimento (D/L), para *S. maydis* e *S. macrospora*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FV	GL	QM					
		CONÍDIOS			PICNÍDIOS		
		L _c	D _c	D _c /L _c	L _p	D _p	D _p /L _p
Isolado	21	1244,6**	12,195**	0,0051**	16556,3**	12193,06**	0,00510**
Erro	44	2,56	0,20	0,00009	1819,2	1374,76	0,00009
C.V.	-	4,88	7,28	4,52	10,00	9,85	4,52

**Teste de F, significativo a 1% probabilidade, ns= não significativo. FV= fonte de variação, GL=grau de liberdade, QM= quadrado médio.

TABELA 7A: Distância Mahalanobis entre os 21 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 10 a 20 minutos, do estrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho) e incubadas por 72 horas (Milho_72h), inoculadas com *S. maydis* incubadas por 48 horas (Milho_May_48h) e 72 h (Milho_May_72h), inoculadas com *S. macrospora* incubadas por 48 h (Milho_Mc_48h) e 72 h (Milho_Mc_72h), micélio de *S. maydis*, *S. macrospora* e *F. verticillioides*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	F.							S.
	<i>verticillioides</i>	Milho	Milho_72h	Milho_May_48h	Milho_May_72h	Milho_Mc_48h	Milho_Mc_72h	<i>macrospora</i>
Milho	1324,7*							
Milho_72h	29,3 ^{ns}	1169,2*						
Milho_May_48h	21419,4*	13193,0*	21074,4*					
Milho_May_72h	1007,3*	223,0*	846,2*	15197,3*				
Milho_Mc_48h	29383,1*	19220,*7	28910,5*	757,1*	21691,7*			
Milho_Mc_72h	1088,4*	2607,2*	1143,9*	21635,8*	2383,0*	29618,8*		
<i>S. macrospora</i>	680,1*	894,6*	667,4*	16159,9*	953,2*	23209,5*	606,4*	
<i>S. maydis</i>	333,2*	903,9*	316,5*	17817,2*	795,6*	25176,7*	575,4*	82,6 ^{ns}

Teste Lambda de Wilks DF= 176,0, o valor de $F_{\text{observado}} = 2,747$ maior do que $F_{\text{crítico}} = 1,798$. *O valor de F foi calculado de acordo com a aproximação de Rao, $P \leq 0,05$, significativo e ns= não significativo.

TABELA 8A: Distância Mahalanobis entre os 21 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 20 a 30 minutos, do estrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho) e incubadas por 72 horas (Milho_72h), inoculadas com *S. maydis* incubadas por 48 horas (Milho_May_48h) e 72 horas (Milho_May_72h), inoculadas com *S. macrospora* incubadas por 48 horas (Milho_Mc_48h) e 72 horas (Milho_Mc_72h), micélio de *S. maydis*, *S. macrospora* e *F. verticillioides*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	<i>F.</i> <i>verticillioides</i>	Milho	Milho_72h	Milho_May_48h	Milho_May_72h	Milho_Mc_48h	Milho_Mc_72h	<i>S.</i> <i>macrospora</i>
Milho	2130,6*							
Milho_72h	153,4 ^{ns}	1386,7*						
Milho_May_48h	6023,0*	1470,0*	4634,8*					
Milho_May_72h	12431,3*	4347,8*	10561,2*	2284,8*				
Milho_Mc_48h	7659,5*	1994,1*	6199,6*	473,2*	1020,3*			
Milho_Mc_72h	5693,7*	1045,9*	4590,8*	954,7*	1455,5*	498,2*		
<i>S. macrospora</i>	735,2*	521,1*	333,7*	2585,7*	7492,1*	3771,9*	2659,3*	
<i>S. maydis</i>	873,4*	5157,1*	1267,0*	9599,3*	18725,1*	12355,9*	10361,5*	2563,8*

Teste Lambda de Wilks DF= 160,0, o valor de $F_{\text{observado}} = 2,259$ maior do que $F_{\text{critico}} = 1,828$. *O valor de F foi calculado de acordo com a aproximação de Rao, * $P \leq 0,05$, significativo e ns= não significativo.

TABELA 9A: Distância Mahalanobis entre os 21 fons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 30 a 40 minutos, do estrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho) e incubadas por 72 horas (Milho_72h), inoculadas com *S. maydis* incubadas por 48 horas (Milho_May_48h) e 72 h (Milho_May_72h), inoculadas com *S. macrospora* incubadas por 48 h (Milho_Mc_48h) e 72 horas (Milho_Mc_72h), micélio de *S. maydis*, *S. macrospora* e *F. verticillioides*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	<i>F.</i>								
	<i>verticillioides</i>	Milho	Milho_72h	Milho_May_48h	Milho_May_72h	Milho_Mc_48h	Milho_Mc_72h	<i>S. macrospora</i>	<i>S. maydis</i>
Milho	130,3 ^{ns}								
Milho_72h	63,1 ^{ns}	100,2 ^{ns}							
Milho_May_48h	419,2*	255,5*	520,2*						
Milho_May_72h	72,2 ^{ns}	27,3 ^{ns}	47,4 ^{ns}	313,3*					
Milho_Mc_48h	269,5*	268,2*	343,5*	173,3*	241,0*				
Milho_Mc_72h	39,7 ^{ns}	60,1 ^{ns}	94,8 ^{ns}	253,4*	41,6 ^{ns}	188,3*			
<i>S. macrospora</i>	379,1*	279,2*	541,5*	174,9*	358,2*	432,0*	263,6*		
<i>S. maydis</i>	112,0 ^{ns}	55,8 ^{ns}	130,5 ^{ns}	172,9*	65,9 ^{ns}	191,2*	61,9 ^{ns}	217,0*	

Teste Lambda de Wilks DF= 152,0, o valor de $F_{\text{observado}} = 1,614$ maior do que $F_{\text{crítico}} = 1,600$. *O valor de F foi calculado de acordo com a aproximação de Rao, * $P \leq 0,05$, significativo e ns= não significativo.

TABELA 10A: Distância Mahalanobis entre os 23 íons de maior intensidade dos espectros MS, obtidos no intervalo de corrida de 50 a 60 minutos, do estrato protéico total digerido com tripsina, de sementes de milho sem inoculação e sem incubação (Milho) e incubadas por 72 horas (Milho_72h), inoculadas com *S. maydis* incubadas por 48 horas (Milho_May_48h) e 72 horas (Milho_May_72h), inoculadas com *S. macrospora* incubadas por 48 horas (Milho_Mc_48h) e 72 horas (Milho_Mc_72h), micélio de *S. maydis*, *S. macrospora* e *F. verticillioides*. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	<i>F. verticillioides</i>	Milho	Milho 72h	Milho May 48h	Milho May 72h	Milho Mc 48h	Milho Mc 72h	<i>S. macrospora</i>
Milho	6084,7*							
Milho_72h	2399,6*	2504,3*						
Milho_May_48h	189,4 ^{ns}	5666,0*	2002,2*					
Milho_May_72h	309,8*	6000,0*	2376,2*	145,2 ^{ns}				
Milho_Mc_48h	915,0*	2697,9*	628,3*	741,3*	933,3*			
Milho_Mc_72h	4102,5*	239,7*	1726,8*	3851,0*	4067,2*	1503,0*		
<i>S. macrospora</i>	8175,2*	850,4*	2323,0*	7519,2*	8017,7*	3829,5*	1403,4*	
<i>S. maydis</i>	4228,8*	873,3*	3307,1*	4127,2*	4187,6*	2111,8*	456,2*	3193,1*

Teste Lambda de Wilks DF= 176,0, o valor de $F_{\text{observado}} = 2,907$ maior do que $F_{\text{crítico}} = 1,798$. *O valor de F foi calculado de acordo com a aproximação de Rao, * $P \leq 0,05$, significativo e ns= não significativo.

