



BRUNO DA COSTA PANIAGO

**PARÂMETROS AGRONÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA
ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AOS FUNGOS
CAUSADORES DE GRÃOS ARDIDOS DE HÍBRIDOS DE
MILHO**

**LAVRAS-MG
2018**

BRUNO DA COSTA PANIAGO

**PARÂMETROS AGRONÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA AOS FUNGOS CAUSADORES DE GRÃOS ARDIDOS DE
HÍBRIDOS DE MILHO**

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

Prof. Dr. Édila Vilela Resende Von Pinho
Orientadora

Prof. Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Coorientador

**LAVRAS-MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Paniago, Bruno da Costa.

Parâmetros agronômicos e expressão gênica associados à
resistência aos fungos causadores de grãos ardidos de híbridos de
milho / Bruno da Costa Paniago. - 2018.

114 p.

Orientadora: Édila Resende Von Pinho.

Coorientador: Renzo Garcia Von Pinho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Podridão de grãos. 2. Grãos ardidos. 3. Zea mays. I. Von
Pinho, Édila Resende. II. Von Pinho, Renzo Garcia. III. Título.

BRUNO DA COSTA PANIAGO

**PARÂMETROS AGRONÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADOS À
RESISTÊNCIA AOS FUNGOS CAUSADORES DE GRÃOS ARDIDOS DE
HÍBRIDOS DE MILHO**

**AGRONOMIC PARAMETERS AND GENE EXPRESSION ASSOCIATED WITH
RESISTANCE TO FUNGI CAUSES OF MOLDY GRAINS OF CORN HYBRIDS**

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

APROVADA em 02 de abril de 2018.

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA
Departamento de Química

Dr. Antonio Chalfun Junior UFLA
Departamento de Biologia

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros UFLA
Departamento de Fitopatologia

Dr. Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias UFV
Departamento de Fitotecnia

Prof. Dr. Édila Vilela Resende Von Pinho
Orientadora

Prof. Dr Renzo Garcia Von Pinho
Coorientador

**LAVRAS-MG
2018**

A minha família,

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela saúde e vida.

Ao Ulisses Figueiredo por me apresentar a UFLA e se empenhar na minha candidatura para concorrer a uma vaga no programa de doutorado.

A Dr. Cacilda do Valle por acreditar no meu potencial e me incentivar com os seus sábios conselhos.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Setor de Sementes, pela acolhida e por ser a minha casa nestes últimos anos.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Dimas da KWS sementes pela contribuição técnica no projeto.

Aos colegas do Setor de Sementes, principalmente aos alunos da professora Édila Von Pinho pelas horas árduas de ajuda no campo e no laboratório.

Aos colegas e alguns amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e do Laboratório de Fitopatologia da UFLA.

A professora Heloísa Santos por estar sempre disposta a ajudar.

A professora Édila Von Pinho, pela orientação e paciência.

Aos professores Renzo Von Pinho e Flávio Medeiros pelos ensinamentos e por reconhecerem o mérito do meu trabalho nesta Universidade.

A todos os funcionários do Laboratório de Sementes/UFLA e do Laboratório de Patologia de Sementes pela colaboração com as atividades desenvolvidas.

Aos meus amigos guerreiros: Rubens Diogo, Viviane Abreu, Rafaela Guimarães, Natália Chagas, Thaís Marques e Édila Rezende que não mediram esforços para me ajudar com a execução deste projeto no campo, no laboratório e no decorrer das análises do experimento.

Aos meus pais, Jeronimo Paniago e Dorcilene Paniago que acreditaram em meu sonho e somaram forças para realiza-lo.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo amor incondicional.

Ao meu esposo e companheiro Arthur Fernandes que sempre me ajudou em minhas decisões, me mostrou o lado bom da vida e me faz evoluir diariamente como ser humano.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Nos últimos anos, tem sido observada, em diversas regiões brasileiras, maior incidência de podridões de espiga e do colmo de milho causada por fungos como *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*. Isso tem causado perdas de produtividade e qualidade de grãos. Os objetivos nesta proposta foram: avaliar a produtividade e qualidade sanitária de grãos de híbridos de milho, com diferentes níveis de resistência aos patógenos que causam podridões de grãos; analisar a expressão de genes associados à resistência a podridão de grãos. Espigas de quatro híbridos de milho sendo dois resistentes a grãos ardidos AG7088, P4285 e dois susceptíveis RB9077 e DKB390 foram inoculadas com os fungos *Fusarium verticillioides*, e *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis* associados, mais o tratamento controle com inoculação natural. Os grãos foram colhidos em duas épocas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x3x2 sendo 4 híbridos, 3 tratamentos de inoculação e 2 épocas de colheita. Foram avaliadas a produtividade de grãos, além de outros parâmetros relacionados à qualidade sanitária dos grãos. Foi avaliada a expressão de proteínas resistentes ao calor por meio da técnica de eletroforese. A expressão de genes associados à resistência dos grãos a podridão foi avaliada por meio da técnica de RT-qPCR. Maior produtividade de grãos foi observada para o híbrido RB9077, híbrido classificado como susceptível aos fungos que causam grãos ardidos. Houve maior infecção dos grãos de milho pelo fungo *S. maydis* nos híbridos considerados de baixa resistência, DKB390 e RB9077. Maior expressão das proteínas resistentes ao calor foi observada nos grãos do híbrido resistente P4285. Não houve expressão de proteínas resistentes ao calor nos grãos dos híbridos quando inoculados com os fungos associados. Por meio da análise de transcritos verificou-se maior expressão do gene LOX8 em grãos do híbrido classificado como resistente aos fungos que causam a podridão de grãos, P4285 em comparação com a observada em grãos do híbrido DKB390, classificado como susceptível.

Palavras-chave: Podridão de grãos, Grãos ardidos, *Zea mays*.

ABSTRACT

In recent years, there has been a higher incidence of spike rot and corn stalk in several Brazilian regions caused by fungi such as *Fusarium verticillioides* and *Stenocarpella maydis*. This has caused losses of productivity and grain quality. The objectives of this proposal were: to evaluate the productivity and sanitary quality of corn hybrids, with different levels of resistance to pathogens that cause grain rot; to analyze the expression of genes associated with resistance to grain rot. Spikes of four maize hybrids being two resistant to AG7088, P4285 and two susceptible RB9077 and DKB390 were artificially inoculated with the fungi *Fusarium verticillioides*, and *F. verticillioides* and *Stenocarpella maydis*, plus the control treatment with natural inoculation. The grains were harvested in two seasons. The experimental design was a completely randomized 4x3x2 factorial scheme, 4 hybrids, 3 inoculation treatments and 2 harvest seasons. The grain yield was evaluated, as well as other parameters related to the sanitary quality of the grains. The expression of heat-resistant proteins was evaluated using the electrophoresis technique. The expression of genes associated with resistance of grains to rot was evaluated using the qPCR RT technique. Greater grain yield was observed for hybrid RB9077, a hybrid classified as susceptible to fungi that cause moldy grains. There was a higher infection of the maize grains by the *S. maydis* fungus in the hybrids considered of low resistance, DKB390 and RB9077. Higher expression of the heat-resistant proteins was observed in the grains of the resistant hybrid P4285. There was no expression of heat-resistant proteins in the grains of the hybrids when inoculated with the associated fungi. By means of the analysis of transcripts, the LOX8 gene were more expressed in grains of the hybrid classified as resistant to the fungi that cause grain rot, P4285 compared to that observed in grains of the DKB390 hybrid classified as susceptible.

Keywords: Rot of grains, moldy grains, *Zea mays*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biosíntese de ácido jasmônico.....	30
Figura 2 - Padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor em gel SDS PAGE em grãos de híbridos de milho. DKB390: híbrido susceptível; P4285: híbrido resistente; C: controle; Fv: <i>Fusarium verticillioides</i> ; FS: <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Stenocarpella maydis</i>).	88
Gráfico 1 - Dados médios de temperatura, precipitação pluviométrica mensal e umidade relativa do ar em Lavras, MG, out/2016 a jul/2017. Dados obtidos no setor de agrometeorologia da UFLA. A primeira época de colheita das espigas foi em março e a segunda época em maio.....	64
Gráfico 2 - Quantificação Relativa do gene PRC (Proteínas Resistentes ao Calor) UFLA, Lavras/MG 2018. Fonte: Do autor (2018).....	91
Gráfico 3 - Quantificação Relativa do gene GATase 1 (tipo 1 de glutamina amidotransferase) UFLA, Lavras/MG 2018. Fonte: Do autor (2018).	92
Gráfico 4 - Quantificação Relativa do Gene HMA (<i>Heavy-metal-associated</i> – Domínio associado a metal pesado) UFLA, Lavras/MG 2018. Fonte: Do autor (2018).....	94
Gráfico 5 - Quantificação Relativa do gene Gene HLH (Helix-loop-Helix) UFLA, Lavras/MG 2018. Fonte: Do Autor (2018).....	97
Gráfico 6 - Quantificação Relativa do gene LOX 8 (Enzima Linolenato lipoxigenase; Biossíntese de ácido jasmônico) UFLA, Lavras/MG 2018. Fonte: Do autor (2018).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Híbridos de milho resistentes e susceptíveis a podridão de grãos selecionados para os testes de campo e para as análises moleculares.....	48
Tabela 2 - Médias de Produtividade de Grãos (PG) em quilos/hectare (kg.ha-1) e em sacos/hectare (sc.ha-1) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).....	52
Tabela 3 - Médias de Peso de Mil Grãos (PMG) em gramas de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).....	54
Tabela 4- Doenças foliares detectadas (%) em plantas de milho durante a safra 2016/17. Fatores híbridos e doenças foliares Mancha Branca (MB), Cercosporiose (CE), e Ferrugem polissora (FP). Híbridos resistentes AG7088, P4285 e susceptíveis RB9077 e DKB390 a grãos ardidos.....	56
Tabela 5 - Severidade de podridão de espiga (SPE) em porcentagem (%), de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. (março/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).....	58
Tabela 6 - Severidade de podridão de espiga (SPE) em porcentagem (%) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).	58
Tabela 7 - Severidade de podridão de espiga (SPE) em porcentagem (%) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).	59
Tabela 8 - Porcentagem de Espigas com Sintomas de Podridão (PESP) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e segunda colheita (maio/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).....	60
Tabela 9 - Porcentagem de Grãos Ardidos (PGA) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e segunda colheita (maio/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).	61
Tabela 10 - Severidade de infecção de grãos por <i>Fusarium verticillioides</i> . Teste de sanidade <i>Blotter test</i> em quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).	65
Tabela 11 - Severidade de infecção de grãos por <i>Fusarium verticillioides</i> . Teste de sanidade <i>Blotter test</i> . em quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Segunda colheita com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).	66
Tabela 12 - Severidade de infecção de grãos por <i>Stenocarpella maydis</i> . Teste de sanidade <i>Blotter test</i> em quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e segunda colheita (maio/2017) com inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> (Fv) e <i>Stenocarpella maydis</i> (Sm) e sem inoculação, controle (C).....	67

Tabela 13 - Híbridos de milho resistentes e susceptíveis à podridão de grãos selecionados para os testes de campo e para as análises moleculares.....	79
Tabela 14 - Pares de <i>primers</i> desenhados a partir das sequências gênicas depositadas no banco de dados Mayze GDB e NCBI relacionadas com a defesa da planta contra o ataque de fungos causadores de podridões de grãos.....	84
Tabela 15 - Resumo das análises de variância dos resultados fisiológicos dos grãos com a observação de incidência e severidade dos fungos <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Stenocarpella maydis</i> em dois tempos de colheita.....	112
Tabela 16 - Resumo das análises de variância do teste de sanidade <i>Blotter test</i>	113

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Importância econômica do milho	16
2.2	Sementes como fonte de disseminação de patógenos	17
2.3	Características morfológicas e taxonômicas de <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Stenocarpella maydis</i>	18
2.4	Doenças causadas por <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Stenocarpella maydis</i>	20
2.4.1	Podridão Rosada da Espiga	21
2.4.2	Podridão Branca da Espiga	21
2.5	Micotoxinas.....	22
2.6	Mecanismos de resistência a estresse biótico.....	23
2.7	Proteômica.....	27
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
	CAPÍTULO 1	44
	ABSTRACT	45
1	INTRODUÇÃO	46
2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1	Características agronômicas avaliadas	49
2.2	Procedimento estatístico.....	51
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	CAPÍTULO 2	75
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAIS E MÉTODOS	79
2.1	Desenho e seleção dos <i>primers</i>	82
2.2	Análises da expressão relativa de transcritos por meio da PCR em tempo real.....	83
2.3	Extração e purificação do RNA dos grãos de milho	85
2.4	Transcrição reversa para síntese do cDNA	85
2.5	Teste de eficiência dos <i>primers</i> através da qPCR	86
2.6	Expressão relativa	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87

3.1	Expressão de proteínas resistentes ao calor	87
3.2	Análises dos Transcritos	90
3.3	Expressão Relativa dos Transcritos	90
	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
	ANEXO A	109
	ANEXO B	110
	ANEXO C	111
	ANEXO D	112
	ANEXO E	113

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil se mantém entre os principais produtores mundiais de milho em grãos. Têm sido observadas produtividades de grãos crescentes associadas às tecnologias disponibilizadas aos agricultores por meio do insumo semente. A área de cultivo do milho foi de 17.346,5 mil hectares, com produção de aproximadamente 93.835,7 mil toneladas de grãos e produtividade média de 5,4 mil quilos por hectare (CONAB, 2017). Além da produtividade a importância da qualidade sanitária dos grãos também tem sido crescente para atender as demandas das indústrias.

Nos últimos anos no Brasil, tem sido observada importante incidência de fungos causadores de grãos ardidos na cultura do milho, sendo os principais *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*, causadores de podridão de colmo e espiga. O grau de danos causados por estes patógenos depende de fatores bióticos, como a intensidade da infecção ou da infestação por fungos antes da colheita e de patógenos existentes nos restos culturais, de fatores abióticos, como os danos mecânicos causados principalmente durante a colheita, secagem e beneficiamento, e também das condições do armazenamento (PINTO, 1998).

O gênero *Fusarium* pode ser encontrado nos restos culturais, nas mais diversas regiões geográficas do mundo, especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais. Esse fungo é capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos, podendo colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios que são disseminados pelo ar ou pela água. A disseminação do patógeno pode ocorrer através da água de irrigação e uso de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado pelo fitopatógeno (DAVIS et al. 2006).

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 ou grãos, fora do período de cultivo, na forma de micélio (McGEE, 1988; CASA 1997).

A incidência destes fungos nos grãos normalmente ocorre pela infecção natural da espiga no campo, favorecida por clima úmido e quente na fase de polinização e mau empalhamento. Danos externos causados por insetos servem de porta de entrada para o patógeno. O excesso de chuvas após a maturidade fisiológica, o manejo da lâmina de água de irrigação e o manejo dos restos de cultura também interferem na incidência destes fungos em sementes e grãos (SHURTLEFF, 1992; AGRIOS, 1997; PINTO, 1998)

Os fungos causadores de podridão de espigas e de grãos ardidos atuam de forma deletéria na qualidade dos grãos. São aceitáveis os valores máximos de 2% de grãos ardidos

para a exportação e de 6% para a comercialização no mercado interno (MENEGAZZO, 2001).

Após a infecção dos grãos pelos fitopatógenos, pode haver a produção em altas concentrações de micotoxinas por *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*. Quando estes compostos tóxicos são produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (MOSS, 1991).

Portanto, o entendimento dos mecanismos de defesa e resistência da planta de milho contra *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis* constitui um fator importante para que os melhoristas possam desenvolver estratégias de seleção mais eficientes visando obter genótipos superiores e com alto nível de resistência a esta doença. Esses mecanismos são multicomponentes e apresentam uma complexidade funcional, espacial e temporal, atuando de maneira coordenada (PASCHOLATI e LEITE, 1995). O reconhecimento de sinais exógenos, provenientes do patógeno, pelo hospedeiro resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal envolvendo um grande número de genes, os quais serão induzidos ou fortemente expressos (WALTERS et al. 2007).

Conforme Durrant e Dong (2004), a resistência sistêmica adquirida (RSA), caracteriza-se pela expressão de genes relacionados com a produção de proteínas PR (relacionadas com a patogênese), consideradas como importantes fatores na resistência de plantas a diversas classes de fitopatógenos, incluindo fungos, bactérias, vírus e oomicetos

Entre essas enzimas, estão as lipoxigenases, as peroxidases, a fenilalanina amônia-liase, as β -1,3-glucanases e as quitinases (BAYSAL et al. 2003).

Neste contexto, o entendimento da expressão de genes ligados à qualidade sanitária de sementes é fundamental para o desenvolvimento de novas cultivares com tecnologias que garantam a produção e a comercialização de grãos que atendam à característica de qualidade sanitária.

Objetivo Geral

Avaliar a produção, os sintomas de podridão em espigas e em grãos de híbridos de milho com diferentes níveis de resistência aos fungos que causam grãos ardidos e avaliar a expressão gênica em grãos quanto à resistência a grãos ardidos.

Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de grãos, os sintomas de podridão de espigas e grãos em híbridos de milho;
- Analisar a expressão de proteínas resistentes ao calor em grãos de híbridos de milho;
- Avaliar pelo teste de sanidade (*blotter test*) a incidência e severidade dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* em grãos híbridos de milho;
- Avaliar a expressão gênica em grãos de híbrido de milho associada à característica de grãos ardidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica do milho

O Brasil ocupa o terceiro lugar na produção mundial de milho, atrás dos Estados Unidos, que detêm 40% da produção mundial, seguido pela China. O milho é o principal cereal produzido no Brasil, cultivado em uma área com mais de 17.346,5 mil hectares, com produção de aproximadamente 93.835,7 mil toneladas de grãos e produtividade média de 5,4 mil quilos por hectare (CONAB, 2017). As exportações de fevereiro a maio de 2017 totalizaram um volume de 1,2 milhão de toneladas, restando 24,8 milhões de toneladas como estimativa para embarques até janeiro de 2018. O Brasil, que tem sido o segundo exportador global atrás dos EUA, atingiram 26 milhões de toneladas de grãos de milho, alta de mais de 50 por cento em relação às safras 2015/2016, quando o país lidou com uma severa quebra de safra.

Segundo os dados mundiais do 11º levantamento do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), a previsão realizada para a produção mundial de grãos de milho para a safra 2017/18 foi de 1,042 bilhões de toneladas. O volume estimado para o consumo global foi de 1,074 bilhões de toneladas, o que corresponde a um recorde. Já para os estoques mundiais do cereal houve redução de 14,1% em relação à última safra, sendo estimados em 199,2 milhões de toneladas. Quanto às exportações, os embarques foram estimados em 155,9 milhões de toneladas. O resultado de exportações representa uma queda de 2,4 % em relação a safra 2016/17 (FIESP, 2018).

No Brasil tem sido observado aumento da produtividade de grãos de milho, em função da crescente adoção de tecnologias nesta cultura, pelos agricultores. Estas tecnologias estão associadas à utilização de híbridos com maior potencial produtivo de grãos com alta qualidade e tratos culturais recomendados à cultura.

No entanto, além de altas produtividades tem sido observada crescente demanda por grãos com boa qualidade sanitária. Sabe-se que alguns fungos a exemplos de *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*, que produzem micotoxinas, podem comprometer a qualidade de grãos o que pode até mesmo inviabilizar a comercialização destes para a indústria.

2.2 Sementes como fonte de disseminação de patógenos

Um dos meios mais eficientes de disseminação de patógenos a grandes distâncias e de sua introdução em novas áreas de cultivo de milho é a semente. Esses patógenos incluem os fungos, as bactérias e os vírus (PINTO, 1998).

O grau de danos causados pelos patógenos depende de fatores bióticos, como a intensidade da infecção ou da infestação por fungos antes da colheita e de patógenos existentes nos restos culturais, de fatores abióticos, como os danos mecânicos causados principalmente durante a colheita, secagem e beneficiamento, e também das condições do armazenamento (PINTO, 1998).

Sendo assim, as sementes de modo geral podem abrigar e transportar microrganismos ou agentes patogênicos de todos os grupos taxonômicos, causadores e não causadores de doenças. Do ponto de vista ecológico, esses agentes podem ser agrupados em organismos de campo, onde predominam espécies fitopatogênicas, e organismos de armazenamento, com pequeno número de espécies que deterioram os grãos nesta fase (BRASIL, 2009).

Os fungos englobam o maior número de espécies associadas a grãos, seguidos pelas bactérias, com um número expressivo de representantes e os vírus e nematóides, em menor número. É comum a maioria dos fungos fitopatogênicos ser transmitidos pelos grãos (BRASIL, 2009).

Dentre as doenças que afetam a produção e qualidade de sementes e grãos de milho destacam-se as podridões de espiga, as quais estão associadas à incidência de grãos ardidos (PINTO, 2005; CASELA et al., 2006).

Em milho é considerado como ardido o grão fermentado em mais de $\frac{1}{4}$ de sua área total. Para a mensuração visual da área atingida é considerado grão fermentado ou ardido, o grão alterado em sua cor ou visivelmente fermentado em toda área do germe e mais quaisquer partes do endosperma. O conceito fermentado até $\frac{1}{4}$ considera o grão que apresentar pontos de coloração escura, de qualquer tamanho, desde que sejam visíveis a olho nu, em até $\frac{1}{4}$ da área do grão (MAPA, 1996).

As perdas relacionadas aos grãos ardidos podem ser quantitativas (grãos de menor peso) e qualitativas (relacionadas com a qualidade nutricional dos grãos) (PINTO, 2007). As perdas qualitativas associadas aos grãos ardidos são motivo de desvalorização do produto (MENDES, 2009).

A ocorrência de grãos ardidos constitui um dos principais problemas de qualidade sanitária do milho, devido à possibilidade dos fungos como *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* produzirem compostos tóxicos, denominados de micotoxinas, tais como

aflotoxinas, fumonisinas, entre outras. Quando estes compostos tóxicos são produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (MOSS, 1991).

2.3 Características morfológicas e taxonômicas de *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*

Os principais agentes da doença em termos de podridão no colmo e na espiga são: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinônimo *F. moniliforme* Sheldon, telemórfico *Gibberella moniliformis* Wineland), *Fusarium graminearum* (Schw), *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. Zeae* (Schw.) Lev.] e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle in Bull.]. Esses fungos reduzem o rendimento das culturas e depreciam a qualidade do produto devido à produção de toxinas (EDDINS, 1930; PROZESKY et al. 1994; MUNKVOLD e DESJARDINS, 1997; DORRANCE et al. 1998; ROSSOUW et al. 2002a; GUTIERREZ, 2008) e são encontrados em resíduos de plantas em quase todos os campos de milho após a colheita (WHITE, 1999).

O gênero *Fusarium* pode ser encontrado nos restos culturais, nas mais diversas regiões geográficas do mundo, especialmente em locais de climas tropicais e subtropicais. Esse fungo é capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos, podendo colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios que são disseminados pelo ar ou pela água. A disseminação do patógeno pode ocorrer através da água de irrigação e uso de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado pelo fitopatógeno (DAVIS et al. 2006).

Esse gênero exibe alto grau de diversidade em relação aos atributos morfológicos, fisiológicos e ecológicos e não é surpreendente que representantes desse gênero ocorram na maioria dos nichos ecológicos nas mais diversas regiões geográficas do mundo (BURGESS et al. 1997). Admite-se que, desde 1900, aproximadamente 1.000 espécies de *Fusarium* foram descritas, a maioria pelo exame das suas estruturas (esporodóquios), diretamente nos hospedeiros ou substratos naturais, o que levou que muitas dessas espécies fossem sinônimas, tendo em vista a importante variabilidade do *Fusarium* em diferentes ambientes e substratos (BURGESS et al., 1994).

Por meio de estudos tem sido observado que o patógeno *F. verticillioides* é o fungo mais frequente em grãos de milho recém colhidos, com níveis de contaminação de até 100%. No Brasil, algumas espécies do gênero *Fusarium* foram isoladas de grãos de milho e outras partes das plantas procedentes de vários Estados brasileiros, com predominância do *F.*

verticillioides. (ASEVEDO et al. 1994; POZZI et al. 1995; ORSI et al. 2000; SILVA et al. 2001; RIBEIRO et al. 2005; NERBASS et al. 2008).

É sabido que *F. verticillioides* tem a capacidade de transmitir-se para as espigas de forma sistêmica a partir de sementes (WILKE et al., 2007).

Os hospedeiros mais comuns de *F. verticillioides* são *Zea mays* e o *Sorghum* sp e para a identificação das estruturas fúngicas deve-se observar: micélio esbranquiçado, levemente pigmentado de púrpura, ou branco-alaranjado; colônias bem desenvolvidas sobre as sementes, às vezes com aparência floculosa. Por vezes, o crescimento micelial é acompanhado pela formação de pionodes (massa mucosa) de tamanho e superfícies irregulares, coloração laranja a vermelho púrpura. Sob alta resolução, cadeias de microconídios simples, ou ramificadas, longas ou curtas; às vezes com pequenas agregações de microconídios são visualizadas. Cadeias de microconídios são mais frequentes em colônias pouco desenvolvidas. Macroconídios, quando formados em pionodes, são fusiformes, afilados, parede delicada, tamanho 25-60 × 2,5-4,0 µm e com 3-7 septos. Microconídios, mais frequentes em cadeias, são hialinos, unicelulares, em geral com a base achatada, tamanho 5-12 × 1,5-2,5µm (BRASIL, 2009).

Os agentes causadores da podridão do colmo e espigas de milho, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, 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 um septo (SUTTON e 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 e WATERSTON, 1966; SUTTON, 1980). *Zea mays* é o hospedeiro mais comum para as duas espécies de *Stenocarpella* (BRASIL, 2009).

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 E WATERSTON, 1966; FARR et al. 1989). No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de mancha foliar em milho, causada pelo fungo *S. macrospora*, foi realizado por Johann (1935), no estado de São Paulo e o segundo foi na Bahia por Ram et al (1973).

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 ou grãos, 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 e WHITE, 1988; REIS e 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.

2.4 Doenças causadas por *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*

Ultimamente, devido às moléstias patogênicas terem se tornado uma importante ameaça aos campos de produção, na maioria dos programas de melhoramento tem-se investido na busca de genótipos com alta produtividade e elevada resistência em condições de campo.

As sementes e grãos de milho estão sujeitos a danos por fungos no campo de produção, durante o período de armazenamento e pelos fungos presentes no solo. As sementes ou grãos podem ser infestadas ou infectadas por estes patógenos, sendo que, na infestação, os fungos se localizam externamente, em sua na superfície, enquanto que na infecção eles se localizam nos tecidos internos: endosperma e embrião (PINTO, 1998).

A incidência destes fungos nos grãos normalmente ocorre pela infecção natural da espiga no campo, favorecida por clima úmido e quente na fase de polinização e mau empalhamento. Danos externos causados por insetos servem de porta de entrada para o patógeno. O excesso de chuvas após a maturidade fisiológica, o manejo da lâmina de água de irrigação e o manejo dos restos de cultura também interferem na incidência destes fungos em sementes e grãos (SHURTLEFF, 1992; AGRIOS, 1997; PINTO, 1998)

As condições ambientais são a junção de fatores previsíveis e imprevisíveis que têm elevada influência na interação patógeno x hospedeiro, em que, quando a umidade relativa e a

temperatura atmosférica do ar e do solo, a altitude da área e a intensidade pluviométrica são favoráveis ao desenvolvimento dos fitopatógenos, a intensidade da severidade das doenças da cultura será elevada (BORÉM; MIRANDA, 2013).

2.4.1 Podridão Rosada da Espiga

A podridão rosada da espiga é causada por *Fusarium verticillioides* e apresenta elevado número de plantas hospedeiras alternativas, sendo, por isso, considerados parasitas não especializados. As condições ambientais que favorecem o desenvolvimento do fungo são temperaturas em torno de 30⁰ C e altitudes abaixo de 700 m (SILVA e SCHIPANSKI, 2006).

A infecção pode se iniciar pelo topo ou por qualquer outra parte da espiga, mas sempre é associada a alguma injúria (insetos, pássaros e roedores) (PEREIRA, 1997). Com o desenvolvimento da doença, uma massa cotonosa avermelhada pode recobrir os grãos infectados ou a área da palha atingida. Quando a infecção ocorre através do pedúnculo da espiga, todos os grãos podem ser infectados, mas a infecção só se desenvolverá naqueles que apresentarem alguma injúria no pericarpo. O desenvolvimento desses fungos nas espigas é paralisado quando o teor de umidade dos grãos atinge 18 a 19% (REIS, CASA, 2004). Embora esses fungos sejam frequentemente isolados das sementes, essas não são a principal fonte de inóculo. Como esses fungos possuem a fase saprofítica ativa, clamidósporos sobrevivem e se multiplicam nos restos de cultura de milho, sendo essa a fonte principal de inóculo (PINTO et. al. 2005).

A podridão de espigas causada pelos fungos *F. verticillioides*, no milho, em função da amplitude geográfica de ocorrência deste patógeno e da baixa tolerância na comercialização dos grãos infectados, é considerada a doença que causa maior impacto econômico nesse cereal em todo o mundo (VAN EGMOND et al. 2007; REID et al. 2009) e com o aumento das temperaturas médias globais registradas nos últimos anos, espera-se que os danos dessas doenças sejam potencializados, sobretudo em regiões com climas amenos (MESTERÁZY et al. 2012).

2.4.2 Podridão Branca da Espiga

A podridão branca da espiga é causada pelos fungos *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* (WHITE, 1999). As espigas infectadas apresentam os grãos de cor marrom, de baixo peso e com crescimento micelial branco entre as fileiras de grãos. No interior da espiga ou nas palhas das espigas infectadas, há a presença de numerosos picnídios, que são as estruturas de frutificação do patógeno. Uma característica peculiar entre as duas espécies de *Stenocarpella* é que apenas a *S. macrospora* ataca as folhas do milho

(MARASAS, VAN DER WESTHUIZEN, 1979). A precisa distinção entre estas espécies só é possível mediante análises microscópicas.

A alta umidade e temperaturas acima de 25°C favorecem a liberação dos conídios dos picnídios produzidos no colmo. Esses conídios são transportados pelo vento, chuva e por insetos, até a base dos colmos, folhas e espigas (SILVA e SCHIPANKI, 2006). Os esporos ou conídeos desses fungos sobrevivem em clamidósporos, estruturas de resistência, nos restos de cultura, além de nas sementes na forma de esporos e de micélio dormente, sendo essas as fontes primárias de inóculo para a infecção das espigas (McGEE, 1988). A infecção pode se iniciar em qualquer uma das extremidades das espigas. Entretanto, as espigas mal empalhadas ou com palhas frouxas ou que não se dobras após a maturidade fisiológica são as mais suscetíveis. A alta precipitação pluviométrica na época da maturação dos grãos favorece o aparecimento dessa doença. A evolução da podridão praticamente cessa quando o teor de água dos grãos atinge 21 a 22% (PINTO et. al. 2005).

2.5 Micotoxinas

Um dos entraves para a exportação e na cotação de preços é a qualidade dos grãos produzidos. Os fungos causadores de podridão de espigas e de grãos ardidos atuam de forma deletéria na qualidade dos grãos. São aceitáveis os valores máximos de 2% de grãos ardidos para a exportação e de 6% para a comercialização no mercado interno (MENEGAZZO, 2001).

O milho é um dos cereais mais predispostos à contaminação por fungos toxigênicos e ao acúmulo de micotoxinas nos grãos (HERMANNNS et al. 2006).

A infecção dos grãos de milho por fungos toxigênicos pode ocorrer tanto no campo quanto no armazenamento. Assim, as práticas culturais adotadas pelos produtores têm efeito direto, ou indireto, favorecendo, ou não, a infecção dos grãos por fungos toxigênicos e o acúmulo de micotoxinas (MARQUES et al. 2009; PALACIN et al. 2006).

Estes fungos trazem importantes prejuízos, como perda da produção e qualidade dos grãos, além de poderem produzir micotoxinas, que são substâncias que causam efeitos tóxicos agudos ou crônicos em animais e humanos (SILVA et al. 2008).

As micotoxinas são metabólitos tóxicos resultantes do metabolismo secundários de uma variedade de fungos, especialmente os pertencentes aos gêneros *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Stenocarpella ssp.*, e *Penicillium spp.*. Esta contaminação pode tornar os grãos impróprios para o consumo, resultando em perdas econômicas e elevados riscos à saúde (HERMANNNS et al. 2006; PASTER; BULLERMAN, 1988).

Dentre as micotoxinas existentes, as fumonisinas produzidas pelo fungo *Fusarium spp.* foram inicialmente descritas e caracterizadas na década de oitenta (Bezuidenhout et al. 1988; Gelderblom et al. 1988).

As fumonisinas são moléculas estruturalmente relacionadas e, até o ano de 2002, dezesseis foram isoladas e caracterizadas: Fumonisina B₁ (FB₁), FB₂, FB₃, FB₄, A₁, A₂, A₃, AK₁, C₁, C₃, C₄, P₁, P₂, P₃, PH_{1a}, PH_{1b} (MUSSEER e PLATTNER, 1997; AH-SEO e WON LEE, 1999).

Do grupo de fumonisinas, a B₁ (FB₁) é a substância mais abundante e mais tóxica, representando cerca de 70% da contaminação total dos alimentos e rações (SYDENHAM et al. 1991; THIEL et al. 1991; MALLMANN et al. 2001). A primeira descrição sobre a ocorrência natural de FB₁ foi realizada por Sydenham et al. (1990) a partir de grãos de milho mofados colhidos em uma área em Transkei, Sul da África, que apresentava alta incidência de câncer de esôfago em humanos.

As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em equinos (LEME) (MARASAS et al. 1988), edema pulmonar e hidrotórax em suínos (HARRINSON et al. 1990), hepatotoxicidade e hepatocarcinogenicidade em ratos (GELDERBLOM et al. 1991), provável câncer de esôfago em humanos (SYDENHAM et al. 1990) e leucoencefalomalácia em coelhos (BUCCI et al. 1996).

A prevenção contra a infecção dos grãos ou sementes de milho por fungos promotores de grãos ardidos deve levar em consideração um conjunto de medidas: a) não colher espigas de plantas tombadas; b) realização de rotação de culturas com espécies de plantas não suscetíveis; c) interrupção do monocultivo do milho; d) promoção do controle das plantas daninhas hospedeiras dos fungos do gênero *Fusarium*; e) uso de sementes de alta qualidade sanitária; f) não utilizar altas densidades de plantio; g) utilização de cultivares de milho com espigas que dobram para baixo após a maturidade fisiológica dos grãos; h) não colher espigas atacadas por insetos, pássaros e roedores e; i) utilização de cultivares de milho mais resistente aos fungos (PINTO, 2005).

De maneira geral, a resistência é a mais indicada dentre as estratégias de manejo sustentável frente à ação infecciosa dos organismos fitopatogênicos que acometem danos à cultura do milho, bem como às demais culturas de interesse agrônômico.

2.6 Mecanismos de resistência a estresse biótico

O entendimento dos mecanismos de defesa e resistência da planta de milho contra *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis* constitui um fator importante para que os melhoristas

possam desenvolver estratégias de seleção mais eficientes visando obter genótipos superiores e com alto nível de resistência a esta doença. Esses mecanismos são multicomponentes e apresentam uma complexidade funcional, espacial e temporal, atuando de maneira coordenada (PASCHOLATI e LEITE, 1995). O reconhecimento de sinais exógenos, provenientes do patógeno, pelo hospedeiro resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal envolvendo um grande número de genes, os quais serão induzidos ou fortemente expressos (WALTERS et al. 2007).

A resistência é definida como a habilidade de alguns acessos de uma espécie de planta sabidamente hospedeira de um patógeno de suprimir, reduzir ou retardar as injúrias e danos causados por este patógeno. A resistência é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, onde efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno em potencial com o hospedeiro. Mostra-se como um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (PASCHOLATTI e LEITE, 1995).

O termo raça fisiológica vem sendo utilizado para descrever os patógenos da mesma espécie, morfologicamente semelhantes e com mesma virulência. Patógenos de distintas raças fisiológicas apresentam diferentes níveis de virulência (KIMATI et al, 1997).

Segundo Bueno et al. (2001) as raças fisiológicas são identificadas ou diferenciadas pela reação que causam num grupo selecionado do hospedeiro cujos componentes são denominados variedades diferenciadoras. Em geral existem apenas dois tipos de reação: resistência e susceptibilidade. É muito importante para o melhorista conhecer as raças fisiológicas das principais doenças na cultura que ele está trabalhando. O aparecimento ou introdução de novas raças de um patógeno pode “quebrar” a resistência de uma cultivar a determinada doença.

A resistência pode ser classificada de acordo com sua efetividade contra raças do patógeno. Segundo Van Der Plank (1963), existem resistências que são efetivas contra algumas raças do patógeno e resistências que são efetivas contra todas as raças. No primeiro caso, temos a resistência vertical ou qualitativa, ao passo que no segundo caso temos a resistência horizontal ou quantitativa. O controle genético, na maioria dos casos, a resistência qualitativa é do tipo monogênica enquanto a resistência quantitativa é do tipo poligênica. Durabilidade, de forma geral, a resistência qualitativa é de curta duração, pois os patógenos têm capacidade de quebrá-la, quando aparecem ou são introduzidas novas raças para as quais as cultivares não tem resistência. Já a resistência quantitativa parece ser mais durável, pois ela

se mantém mesmo com o aparecimento de novas raças do patógeno (BESPALHOK, et al 2007).

A resistência qualitativa, por ser efetiva apenas contra algumas raças do patógeno, age no sentido de reduzir a quantidade de inóculo inicial, fazendo com que o início da epidemia seja atrasado. Já a resistência quantitativa, reduz a taxa de desenvolvimento da doença, sem afetar significativamente o inóculo inicial (KIMATI et al, 1997).

A resistência quantitativa está presente em maior ou menor grau em todas as espécies de hospedeiros. Os genes que determinam este tipo de resistência não são específicos, mas sim genes que normalmente existem em plantas saudáveis, regulando os processos fisiológicos normais. A resistência quantitativa tende a ser perdida quando as culturas são melhoradas para resistência qualitativa, ou quando elas são melhoradas sobre proteção de agroquímicos. Conseqüentemente, a maioria das cultivares modernas tem uma resistência quantitativa consideravelmente menor que as cultivares de 1900s (BESPALHOK, et al 2007).

Em muitos casos, a resistência é determinada por poucos genes que apresentam herança simples. No entanto, essa não é a regra. A resistência é na maioria das vezes poligênica ou de caráter quantitativo, envolvendo uma série de genes, com efeitos diferenciados, associados a um pronunciado efeito ambiente, o que leva a uma variação fenotípica contínua na reação do hospedeiro (ALZATE-MARIN et al. 2005).

No estudo sobre a variabilidade genética de patógenos e resistência a culturas, Casela (2003) afirma que a resistência genética de plantas a doenças tem sido um dos principais pilares de sustentação da agricultura. Essa estratégia é, ao mesmo tempo, o meio mais eficiente, econômico e seguro, do ponto de vista ambiental, de se controlar doenças de plantas. Durante a interação patógeno-hospedeiro ocorre a ativação do sistema de defesa da planta por vários meios, resultando na produção de substâncias tóxicas aos patógenos, impedindo o estabelecimento destes.

Alguns compostos produzidos pelas plantas possuem ação antimicrobiana, enquanto outros restringem o desenvolvimento de patógenos pela formação de barreiras estruturais (OLIVEIRA et al., 2001).

Durrant e Dong (2004) afirmaram que a resistência sistêmica adquirida (RSA) caracteriza-se pela expressão de genes relacionados com a produção de proteínas PR (relacionadas com a patogênese), consideradas como importantes fatores na resistência de plantas a diversas classes de fitopatógenos, incluindo fungos, bactérias, vírus e oomicetos. Os genes envolvidos nas diferentes rotas de síntese de substâncias de defesa, assim como as

interações entre as rotas envolvendo o ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico/etileno, têm importância significativa no processo de sinalização que leva à RSA.

A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer – NK. Fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata. Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência ubí-qua em micro-organismos, mas que não ocorrem na espécie humana. Moléculas tais como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos, comumente encontradas na superfície de microorganismos, constituem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais a família dos receptores Toll-like (TLRs) (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997). Essa interação é semelhante à complementaridade entre antígeno e anticorpo ou entre antígeno e receptor de linfócitos T (TCR), mas, nesse caso, não há diversidade nem capacidade adaptativa para a geração de novos receptores ou reconhecimento de novos padrões moleculares que não aqueles já programados no código genético.

Entre os vários RRP's envolvidos em opsonização, ativação de complemento e fagocitose, os TLRs se destacam por seu papel central na ligação a patógenos e iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (DCs). Atualmente, 11 diferentes TLRs já foram identificados, alguns localizados na membrana celular, outros no interior das células (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002). Outros receptores presentes em fagócitos, com importante papel na resposta imune, são aqueles para frações do complemento, citocinas, interleucinas e imunoglobulinas (tipo Fc γ R) (ABBAS e LICHTMAN, 2003).

Segundo Alzate-Marin et al. (2005), no manejo integrado de doenças e pragas, uma das estratégias preconizadas é o uso de cultivares resistentes. Estas normalmente são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência de fontes exóticas e, muitas vezes,

não adaptadas, para cultivares elite. Essa estratégia vem sendo usada com sucesso, em programas de melhoramento, há várias décadas. Devido à co-evolução entre hospedeiro e patógeno e o conseqüente surgimento de novas raças, as cultivares resistentes necessitam ser continuamente desenvolvidas. Essa é uma situação que faz parte da dinâmica da interação planta-patógeno e que precisa ser compreendida pelo melhorista.

A comparação entre perfis contrastantes como genótipos sob condições diferentes de estresse, por meio da análise da expressão gênica, pode auxiliar na identificação dos genes responsáveis pelo mecanismo biológico em estudo (MEYERES et al. 2004).

2.7 Proteômica

Sendo um produto direto da expressão de genes, as proteínas exibem um considerável polimorfismo, que se baseia no fato de que esses produtos são codificados por diferentes sequências de nucleotídeos. Assim, os perfis eletroforéticos das proteínas possuem uma base genética e são herdáveis (MURPHY et al. 1990).

Tem-se sugerido que as proteínas LEA (*"Late Embryogeneses Accumulated"*), ou em português, Proteínas Abundantes na Embriogenese Tardia, podem ligar íons e água, podendo ainda estar associadas aos açúcares, controlando a taxa de perda de água e mantendo, assim, a viabilidade das sementes ortodoxas no estado seco (WALTERS et al. 1997; PAMMENTER e BERJAK, 1999). Por sua natureza hidrofóbica, essas proteínas são capazes de inibir a denaturação de macromoléculas e estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse, incluindo estresse hídrico severo (BLACKMAN et al. 1995; CLOSE, 1997).

A maioria delas pertence à família das "hidrofilinas", um grupo de proteínas altamente hidrofílicas, intrinsecamente desestruturadas (IUP - *intrinsically unstructured proteins*), caracterizadas por uma composição de aminoácidos enriquecidas em glicina e outros pequenos resíduos que favorecem uma conformação flexível em soluções aquosas (MCCUBIN et. al. 1985; GARAY-ARROYO et. al. 2000). Embora essas características físico-químicas sejam generalizadas para a maioria das proteínas resistentes ao calor, PRC, as diferenças em suas sequências de aminoácidos revelam em pelo menos sete grupos (BATTAGLIA et al. 2008; HUNDERTMARK e HINCHA, 2008).

Muitos autores têm descrito sobre a indução de síntese de proteínas PRC em tecidos vegetativos de várias espécies de plantas sob condições de déficit de água impostas pelo meio ambiente ou acumuladas como parte de um programa de desenvolvimento em estruturas ou estádios tolerantes à dessecação (BATTAGLIA et al. 2008; SHIH et. al. 2008). Propriedades físico-químicas dessas proteínas podem servir como força motriz para selecionar proteínas

capazes de preservar e manter funções celulares durante o ciclo de vida dos organismos a partir dos efeitos deletérios causados por mudanças na disponibilidade de água (GARAY-ARROYO et al. 2000; OLVERA-CARRILLO et al. 2010). Embora alguns mecanismos tenham sido propostos, é muito pouco conhecido sobre como eles desempenham suas funções. Portanto, a estabilidade, propriedades físicas e abundância em organismos que toleram a desidratação sugerem um importante papel de PRC em tolerância à dessecação (BLACKMAN et al. 1991). O papel de proteínas em tolerância à dessecação deve-se à sua habilidade para atrair moléculas de água, mantendo o ambiente local enriquecido de água ou de alguma forma até substituindo a água (BEWLEY e BLACK, 1985).

A dessecação de sementes ou grãos em desenvolvimento é caracterizada pelo acúmulo de um grupo particular de mRNAs e proteínas PRC relacionadas. Os mRNA de proteínas PRC aparecem em tecidos embrionários, no começo da dessecação, e tornam-se as mais prevalentes de mRNA no estado seco (BAKER et al. 1988; GALAU et al. 1991).

Mendes et al. 2012 investigaram a influência de proteínas PRC, presentes em grãos de milho, sobre a resistência de grãos aos fungos que causam grãos ardidos. A ideia surgiu a partir dos resultados obtidos por Bezerra (1996) que selecionou cultivares resistentes de feijão-de-corda a condições de estresse e associação com proteínas resistentes ao calor.

Em geral, o sistema de defesa das plantas está associado ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese e a outros processos de defesa como explosão oxidativa, acúmulo de fitoalexinas, lignificação e enrijecimento de parede (DURRANT e DONG, 2004).

No entanto, as proteínas relacionadas à patogênese são detectadas devido ao seu acúmulo em plantas submetidas à ação de algum estresse biótico e não necessariamente por sua ação antipatogênica. As proteínas relacionadas à patogênese estão envolvidas na produção de metabolitos primários e secundários. Dentre elas, destacam-se as β -1,3-glucanases e as quitinases que são responsáveis pela degradação dos principais constituintes da parede celular, quitina e β -1,3-glucana, da maioria dos fungos (VAN LOON et al. 1994).

A indução de proteínas pode estar relacionada à patogênese por infecções ou por agentes químicos ou ambientais. As alterações nas atividades dessas enzimas-chave permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (MACAGNAN et al. 2008). Entre essas enzimas, estão as lipoxigenases, as peroxidases, a fenilalanina amônia-liase, as β -1,3-glucanases e as quitinases (BAYSAL et al. 2003).

As peroxidases oxidam substratos orgânicos por meio da eliminação do peróxido de hidrogênio, espécie reativa de oxigênio e acceptora de elétrons. Além disso, essas enzimas participam do crescimento e do desenvolvimento vegetais, da destoxificação celular e de

mecanismos de defesa como lignificação, cicatrização de ferimentos e oxidação de compostos fenólicos (BAYSAL et al. 2003). A peroxidação lipídica também apresenta papel importante no desenvolvimento das plantas e na defesa de uma série de estresses, não só bióticos, mas também abióticos (DOKE et al. 1996).

Estudos realizados com as enzimas lipoxigenases (LOX) também foram utilizados como base para a elaboração desta investigação de expressão gênica em grãos de milho associados a grãos ardidos. Em seguida estão apresentadas algumas informações relacionadas com as enzimas LOX.

Óxido lipídico é uma classe de ácidos graxos polifenólicos derivados de pelo menos seis vias de multienzimas, chamadas coletivamente de lipoxigenases (LOX). Em plantas as LOX-9 e LOX-13 catalisam reações de incorporação de oxigênio em ácidos graxos livres nas posições 9 e 13, respectivamente, na cadeia carbônica (FEUSSNER e WASTERNAK, 2002). As lipoxigenases catalisam a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, o que origina compostos voláteis e o regulador traumatina, entre outros, envolvidos no crescimento, na maturação, na senescência e em respostas de defesa das plantas (BAYSAL e DEMIRDOVEN, 2007).

As plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares como um mecanismo de resposta, e muitas dessas alterações podem estar diretamente relacionadas com defesa e proteção (DE WIT, 2007). A cascata de sinalização envolve entre outras moléculas, o ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), o ácido jasmônico (AJ) e seu metil ester, metil jasmonato (MeJa) e o etileno (ET), como principais compostos capazes de induzir a expressão de muitos genes relacionados à defesa por meio de rotas diferentes (PERVIEUX et al., 2004; CAO et al., 2011).

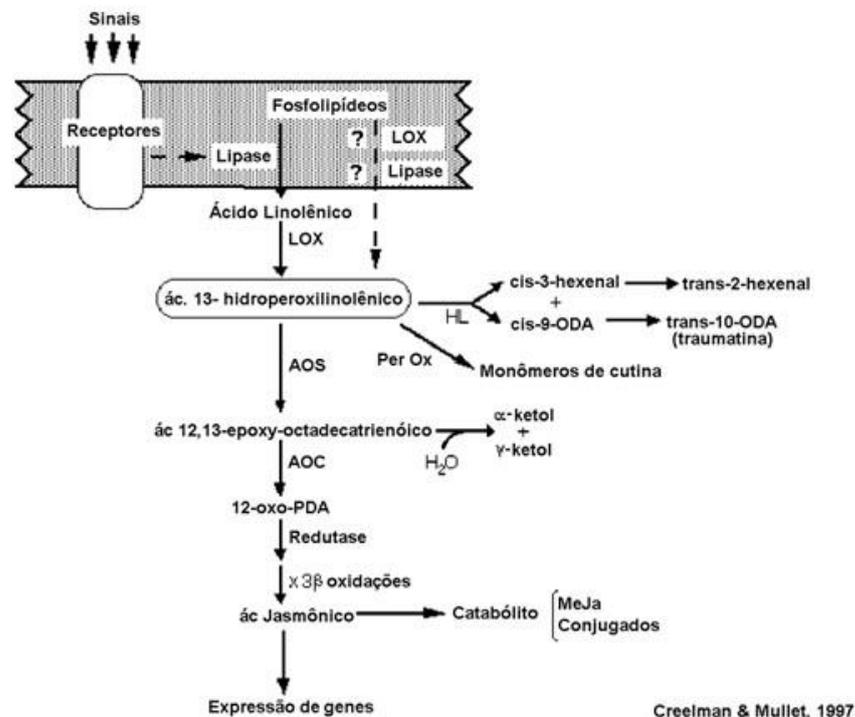
Sabe-se que uma rota metabólica de defesa vegetal muito importante na defesa contra estresses bióticos, é denominada rota octadecanoide, a qual culmina com a produção do ácido jasmônico, um fitohormona relacionado ao estresse vegetal que ativa muitas respostas de defesa (Soares e Machado, 2007). Os níveis deste ácido aumentam rapidamente em resposta ao dano causado por diferentes herbívoros, desencadeando a formação de muitos tipos de defesa vegetal, além dos inibidores de proteases, incluindo terpenos e alcaloides. São reguladores conhecidos de inúmeros processos fisiológicos em plantas, e desempenham papel importante na regulação da expressão de genes de defesa vegetal (Droge, 2002).

O ácido jasmônico é uma classe de substâncias do crescimento vegetal, tendo sido isolado pela primeira vez em 1962 do óleo essencial de *Jasminum grandiflorum* L. e de *Rosmarinus officinalis* L. (Demole et al., 1962). Os jasmonatos foram encontrados em mais

de 200 espécies de plantas, representando 150 famílias, incluindo samambaias, fungos e musgos, sugerindo estarem distribuídos em todo o reino Plantae (Sembdner e Parthier, 1993). São compostos produzidos nas plantas após injúrias ou tratamentos com elicitores (Athayde Sobrinho et al., 2005), apresentando funções hormonais e de defesa contra insetos e patógenos.

Quimicamente os jasmonatos são derivados de compostos baseados em ciclopentanona. Sua biossíntese começa com a liberação do ácido linolênico que é convertido em ácido 13-hidroperoxilinolênico, uma reação catalisada pela enzima 13- LOX (13-lipoxigenase). A seguir, as enzimas AOS (aleno óxido sintase) e AOC (aleno óxido ciclase) produzem ácido 12-oxo-fitodienóico (Weber, 2002). Após a ação da enzima PR (12-oxo-fitodienóico ácido redutase) e três passos de β -oxidação, o AJ é formado. Finalmente, a enzima JAMT (ácido metil jasmonato transferase) faz a conversão para MeJA – metil jasmonato (Creelman e Mullet, 1997) (FIGURA 1).

Figura 1- Biosíntese de ácido jasmônico.



Fonte: CREELMAN e MULLET (1997)

A via dos octadecanóides é composta por quatro classes de compostos com estruturas diferentes e, provavelmente, dotados de capacidade de sinalização. São elas: (1) ácidos gordos acíclicos, entre eles o linolênico; (2) ácidos gordos ciclopentanóides com dezoito carbonos,

sendo o OPDA o primeiro composto ativo da via, nessa classe; (3) ácidos gordos ciclopentanoides com doze carbonos como epiJA; e (4) aminoácidos conjugados de intermediários da cascata. Além da conjugação de aminoácidos, ácido jasmônico e outros intermediários podem sofrer outras modificações químicas, como metilação, hidroxilação e esterificação. Os novos compostos formados possuem atividade em processos fisiológicos regulados por jasmonatos (WASTERNAK, 2007).

As plantas produzem duas formas de ácido jasmônico denominados de solúvel e volátil. O solúvel que é usado como defesa direta para herbívoro, ativando genes para produção da fenilalanina amônia-liase que catalisa substâncias especiais, inclusive inibidores de proteína que diminuem benefícios para o herbívoro. E na forma de um sinal volátil pelo metil jasmonato (MeJA) (O'Donnell et al. 2003).

A relação entre o gene ZmLOX3 milho, que codifica para a enzima 9-LOX, e a resistência a alguns patógenos necrotróficos foi estudada por GAO et al. (2009). Os autores testaram a hipótese de que os óxidos lipídicos produzidos pela rota das 9-LOX no milho são requeridos por fungos, como por exemplo, *Aspergillus flavus*, *A. nidulans* e *Fusarium verticillioides* para produzir esporos e micotoxinas e conseqüentemente colonizar os hospedeiros. Para isso, estes autores obtiveram mutantes de milho para o gene ZmLOX3, os quais foram gerados por meio da inserção de um transposon que reduziu o nível do principal oxido lipídico produzido na rota da LOX-9. As plantas mutantes foram mais susceptíveis à podridão do colmo causada por *F. verticillioides* e a helmintosporiose e antracnose causada por *Colletotrichum graminicola*.

Christensen et al. (2014) aprofundaram os estudos das enzimas lipoxigenases presentes em sementes de milho quanto à defesa da planta contra patógenos. Nesta pesquisa, os autores caracterizaram um novo gene 9-LOX ZmLOX12. Este gene é predominantemente expresso em mesocótilos em que é fortemente induzidos em resposta a infecção por *Fusarium verticillioides*. Este estudo demonstrou que esta única enzima específica monocotiledônea-9-LOX desempenha um papel fundamental na defesa contra *F. verticillioides* em diversos tecidos de milho e fornece a evidência genética de que ácido jasmônico (AJ) é a principal defesa hormonal contra este patógeno.

Os caracteres nível de resistência a *Fusarium* sp. e baixo teor de micotoxinas do tipo fumonisina foram correlacionadas positivamente (ROBERTSON et al. 2006; LANUBILE et al. 2010; MUKANGA et al. 2010; MARTIN, et al. 2012; HEFNY et al. 2012). Robertson et al. (2006) constataram correlações genótípicas e fenotípicas de alta magnitude entre estas características, 0,87 e 0,64, respectivamente, em plantas inoculadas com *F. verticillioides*.

Hung e Holland (2012) observaram também altas correlações significativas entre estas duas características, sendo 0,87 para híbridos e 0,93 para linhagens. Estes resultados sugerem que é possível obter ganhos para baixo teor de micotoxinas, selecionando genótipos resistentes à infecção. Fontes de resistências podem ser encontradas em linhagens e híbridos e também em germoplasmas mais rústicos. Entretanto, não há evidências da existência de genótipos totalmente resistentes. Esta estratégia é benéfica ao programa de melhoramento, uma vez que, a análise do teor de micotoxina é demorada e seu custo dispendioso. Sendo assim, Martin et al. (2012) concluíram que a análise do teor de micotoxina não é necessária, uma vez que esta característica correlacionou significativamente com a características de sintomas visuais nos grãos causados por *F. graminearum*.

O primeiro passo em programas de melhoramento para esta característica é realizar um *screening* dos genótipos disponíveis quanto à reação do fungo, com o intuito de selecionar genes de resistência. É necessário que as plantas que serão avaliadas sejam inoculadas em quantidades iguais de inóculo e que esta inoculação seja realizada no mesmo estadio fisiológico para todas as plantas, a fim de proporcionar condições semelhantes de infecção para que a seleção seja eficiente (SCHAAFSMA et al. 1997).

Aspectos biotecnológicos, principalmente sobre *F. verticillioides*, a exemplo as respostas à infecção do patógeno em milho, têm sido bem elucidados através de transcriptômica, porém ainda faltam informações dos processos de reconhecimento do fungo pelas plantas. Para preencher essas lacunas, os avanços relacionados às tecnologias genômicas, como os estudos de associação genômica ampla, GWAS, poderiam auxiliar o entendimento sobre essa complexa característica de resistência (ZHU et al. 2008).

Além disso, como a resistência a *F. verticillioides* é quantitativa, alguns autores afirmam que a melhor abordagem para a reprodução molecular é a seleção genômica, em substituição à MAS (Seleção Assistida por Marcadores). A reprodução assistida por resistência genômica para resistência quantitativa exigirá perfis de marcadores de todo o genoma para todo o conjunto de linhas de criação, modelos de predição e metodologia de seleção, implementadas para traços complexos clássicos, como o rendimento (POLAND e RUTKOSKI, 2017).

Uma questão crítica é a da exploração de genes candidatos para a resistência. O sequenciamento de RNA, RNAseq, é uma abordagem desenvolvida para analisar o perfil de transcriptoma, tem sido de grande valor na melhoria, validação e refinação de modelos de genes e poder auxiliar na identificação de novos genes que não foram previamente anotados. Uma nova abordagem para identificar genes candidatos e QTL (*Quantitative Trait*

Loci) para resistência é representada pela investigação de metabolomas de plantas após infecção por patógenos. Esforços crescentes têm sido dirigidos para a investigação de informações genômicas relacionadas a informação metabólica (fenotípica) (BUESCHL et al., 2014).

Keurentjes et al. (2006) mostraram o potencial da metabolômica não segmentada para revelar QTL na planta modelo *Arabidopsis*. Os autores descreveram a análise genética da variação natural na composição de metabólitos em *Arabidopsis thaliana* em vez de focar em metabólitos específicos. Observaram número crescente de metabólitos atribuído a caminhos metabólicos específicos que são os produtos de reações enzimáticas que dependem da regulação do genoma. Além disso, o perfil metabólico corresponde ao estado bioquímico do organismo que é uma expressão fenotípica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6^a ed. Nova York: Saunders, 2003.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. New York: Academic, 1997. 635 p.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. C. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; VILELA DE RESENDE, M. L.; ROMEIRO, R. S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, vol. 13, p. 51-80.
- AZEVEDO, I. G. et al. Mycoflora and aflatoxigeni species of *Aspergillus spp* isolated from stored maize **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.46-50, 1994.
- BATTAGLIA M. et al. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 48, n. 1, p. 6-24, 2008
- BAYSAL, O.; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, Oxford, v.52, n. 6, p.747-753, 2003
- BAYSAL, T.; DEMIRDOVEN, A. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 4, p. 491-496, 2007.
- BESPALHOK, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Melhoria para resistência a doenças. In: _____ **Melhoramento de Plantas**. P. 11-18. Disponível em: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%2016.pdf> (2007). Acesso em agosto de 2017.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994.
- BEZERRA, M. A. **Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) com diferentes graus de resistência à seca**. 1996. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- BEZUIDENHOUT, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, London, v. 11, p. 743-745, 1988.
- BLACKMAN, M. J. et al. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 29-33, 1991.

BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 630-638, 1995.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6^a. ed. Viçosa: Editora UFV, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, 2009. 200 p.

BUCCI, T. J.; HANSEN, D. K.; LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxins**, New York, v. 4, n. 1, p. 51-52, 1996.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. In: _____ **Melhoramento de Plantas**. Lavras: Editora UFLA, 2001. p.182- 201.

BUESCHL C. et al. A novel stable isotope labelling assisted workflow for improved untargeted LC–HRMS based metabolomics research. **Metabolomics**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 754–769, 2014.

BURGESS, L. W. et al. **Laboratory manual for *Fusarium* research**, 3rd ed., Sydney: University of Sydney, 1994.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BACKHOUSE, D. Biodiversity and population studies on *Fusarium*. In: LOGRIECO, A. et al. **Biodiversity of toxigenic *Fusarium* species**. Sydowia, 1997, p. 1-11.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 91–94, 2003.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B.W. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeriopsis sapinea*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n. 1, p. 354-362, 2001.

CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. The roles of ABA in plant-pathogen interaction. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 124, n. 4, p. 489-499, 2011;

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

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

CASELA, C. R. **Variabilidade genética de patógenos e resistência a culturas**. VIII Seminário Nacional do Milho Safrinha. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas. 2003.

- CHRISTENSEN, S. A. et al. The Novel Monocot-Specific 9-Lipoxygenase ZmLOX12 Is Required to Mount an Effective Jasmonate-Mediated Defense Against *Fusarium verticillioides* in Maize. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, . v. 27, n. 11, p. 1263–1276, 2014.
- CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, n. 2, p. 291-296, 1997.
- COETZER, J. A. W. et al. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 55, p. 197-203, 1988.
- CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. SAFRA 2016/17. v. 4, n. 9, 2017.
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.
- DAVIS, R. M. et al. Fusarium wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 90, n. 6, p. 692-703, 2006.
- DE WIT, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007
- DEMOLE, E.; LEDERER, E.; MERCIER, D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 45, n. 2, p. 675-685, 1962.
- 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. **Studies in Mycology**, [s. l.], v. 45, p.129– 140, 2000.
- DOKE, N. et al. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant biodefence – a review. **Gene**,[s. l.], v. 179, n. 1, p.45-51, 1996.
- DORRANCE, A. E.; HINKELMANN, K. H.; WARREN, H. L. Diallel analysis of Diploida ear rot resistance in maize. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 699-703, 1998.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 47- 95, 2002.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185–209, 2004.
- EDDINS, A. H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 20, n. 5, p. 439-448, 1930.
- FARR, D.F. et al. **Fungi on plants and plants products in the United States**. Saint Paul: APS PRESS, 1989.

- FERREIRA, E. N. et al. Evaluation of quantitative RT-PCR using nonamplified and amplified RNA. **Diagnostic Molecular Pathology**, New York, v. 19, n. 1, p. 45-53, 2010.
- FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 275-297, 2002.
- FIESP, Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. 11º levantamento USDA, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, da safra 2017/18 - março/18. Departamento do Agronegócio - **DEAGRO/FIESP**. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20180309150127-boletimmilhomarco2018/> Acesso em: 04 de abril de 2018.
- GALAU, G. A.; JAKOBSEN, K. S.; HUGHES, D. W. The controls of late dicot embryogenesis and early germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.81, n. 2, p. 280-288, 1991.
- GAO X. et al. Disruption of a maize 9 lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxins fumonisin. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 8, p. 922-933, 2007.
- GAO, X. et al. Inactivation of the Lipoxygenase *ZmLOX3* Increases Susceptibility of Maize to *Aspergillus* spp. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 2, p. 222-231, 2009.
- GARAY-ARROYO A. et al. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, p. 5668-5674, 2000.
- GELDERBLOM, W. C. A. et al. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.
- GELDERBLOM, W. C. A. et al. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v.12, n. 7, p. 1247-1251, 1991.
- GUTIÉRREZ, H. I. **Mapeamento de QTLs para resistência a grãos ardidos causados por diplodia (Stenocarpella Sp.) em milho (Zea Mays L.)**. 2008. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- HARRISON, L. R. et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁ a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, Columbia, v. 2, n. 3, p. 217-221, 1990.
- HEFNY, M. et al. Breeding maize for resistance to ear rot caused by *Fusarium moniliforme*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v.15, n. 2, 78-84, 2012.
- HERMANN, G. et al. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 7-10, 2006.

HUNDERTMARK M; HINCHA, D. K. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 9, n. 118, p. 1-22, 2008.

HUNG, H.; HOLLAND, J. B. Diallel Analysis of Resistance to *Fusarium* Ear Rot and Fumonisin Contamination in Maize. **Crop Science Society of America**, Madison, v. 52, n. 5, p. 2173-2181, 2012.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immunity recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JOHANN, H. Diplodia macrospora on corn in Brazil. **Plant Disease Reporter**, v. 19, n. 9-10, 1935.

KEURENTJES; J. J. B. et al. The genetics of plant metabolism. **Nature Genetics**, New York, v. 38, p. 842-849, 2006.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

LANUBILE, A; LUCA, P.; ADRIANO, M. Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 16, p. 1398-1406, 2010.

MACAGNAN, D. et al. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacauero expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p.34-37, 2008.

MALLMANN, C. A. et al. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from Southern Brazil. **Arquivos do Instituto. Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 41-45, p. 41-45. 2001.

BRASIL. Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. **Diário oficial da União**, Brasília, n. 72, 1996

MARASAS, W. F. O.; VAN DER WESTHUIZEN, G. C. A. Diplodia macrospora: the cause of leaf blight and cob rot of maize (*Zea mays*) in South Africa. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 11, n. 2, p. 61-64, 1979.

MARQUES, O. J. et al. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009.

MARTIN, M. et al. Comparative quantitative trait loci mapping for gibberella ear rot resistance and reduced deoxynivalenol contamination across connected maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 52, n.1, p.32-43, 2012.

MCCUBIN, W. D.; KAY, C. M.; LANE, B. G. Hydrodynamics and optical properties of the wheat E_m protein. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 63, n. 8, 2011.

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

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY JR, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, London, v. 388; p. 394-397, 1997.

MENDES, M. C. et al. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8 n. 2 p. 275-292, 2012

MENDES, M. C. Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a grãos ardidos em híbridos de milho. 2009. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MENEGAZZO, R. et al. Amostragem e monitoramento de micotoxinas em matérias-primas para rações. In: SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 2., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: SAG-Mercosul, 2001. p.161-171.

MESTERHAZY, A.; LEMMENS, M.; REID, L. M. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize – a review. **Plant Breeding**, Westport., v.131, n. 1, p. 1-19, 2012.

MEYERS, B. C.; GALBRAITH, D. W.; NELSON, T.; AGRAWA, V. Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 2, p. 637-652, 2004.

MOSS, M. O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United States. **Animal Science**, Penicuik, v.27, p. 3941- 3949, 1991.

MUKANGA, M. et al. A survey of pre-harvest ear rot diseases of maize and associated mycotoxins in south and central Zambia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 3, p. 213-221, 2010.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? **Plant Diseases**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.

MURPHY, R. W.; SITES JR., J. W.; BUTH, D. G. Proteins I: isozyme electroforesis. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C. **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 45-126.

MUSSER, S. M.; PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 45, n. 4, p. 1169-1173, 1997.

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

- O'DONNELL, P. J. et al. Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1181-1189, 2003.
- OLIVEIRA, J. T. A. et al. Atividades peroxidásica e β -1,3 glucanásica elicítadas por agente bióticos causadores de doenças e pelo estresse hídrico em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. In : Reunião Nacional de pesquisa de Caupi, 5, 2001, Teresina: RENAC, 2001, pp. 19-23.
- OLVERA-CARRILLO, Y. et al. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 154, n. 1, p. 373-390, 2010
- ORSI, R. B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of stored products research**, Oxford, v.36, n. 1, p. 75-87, 2000.
- PALACIN, J. J. F. et al. Determinação das isoterms de equilíbrio higroscópico de milho (*Zea mays* L.) nas espigas. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 197-205, 2006.
- PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 9, n. 1, p. 13-37, 1999.
- PASCHOLATTI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO., KIMATI, H., AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3^a ed. São Paulo: Agronômica Ceres. cap. 22, p. 417-453. 1995.
- PASTER, N.; BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 257-265, 1988.
- PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronomica Ceres, 1997. v.2, cao. 52, p. 500-515.
- PERVIEUX, I. et al. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, n. 6, p. 331-341, 2004.
- PINTO, N. F. J. de A. Reação de cultivares com relação à produção de grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Comunicado técnico, 144).
- PINTO, N. F. J. de A.; **Grãos Ardidos em Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo , 2005. (Circular Técnica 66).
- PINTO, N. F. J. de A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1998. (Circular Técnica, 29)
- POLAND, J.; RUTKOSKI, J. Advances and challenges in genomic selection for disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 54, p. 79-98, 2017

POZZI, C. R. et al. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interation, abiotic factors and mycotoxins occurence. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

PROZESKY, L. et al. Perinatal mortality in lambs of ewes exposed to cultures of *Diplodia maydis* (= *Stenocarpella maydis*) during gestation. A study of the central-nervous-system lesions. **Journal of Veterinary Research**, Indore, v. 61, p. 247-253, 1994.

RAM, A.; RAM, C.; ROCHA, H. M. A new disease of maize in Bahia, Brazil, with special reference to its causal organism. **Turrialba**, [s. l.], v. 23, p. 227-230, 1973.

REID, L. M. et al. Increased resistance to *Ustilago zaeae* and *Fusarium verticillioides* in maize inbred lines bred for *Fusarium graminearum* resistance. **Euphytica**, Wageningen, v.165, p. 567-578, 2009.

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

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Graphel, 2004. v.2, p. 20-47.

RIBEIRO, N. A. et al. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n. 5, p. 1003- 1009, 2005.

ROBERTSON, L. A. et al. Heritabilities and correlations of fusarium ear rot resistance and fumonisin contamination resistance in two maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 1, p. 353-361, 2006.

ROSSOUW , J. D.; VAN RENSBURG, J. B. J.; VAN DEVENTER, C. S. Breeding for resistance to ear rot of maize, caused by *Stenocarpella maydis* (Berk) Sutton. 1. Evaluation of selection criteria. **South African Journal of Plant and Soil**, Pretoria, v. 19, n. 4, p. 182-187, 2002.

SACCARDO, P. A. **Sylloge Fungorum, Omnium Hucuque cognitorum**. Michigan: Edwards Brothers, 1944.

SCHAAF SMA, A. W.; NICOL, R. W.; REID, L. M.. Evaluating commercial maize hybrids for resistance to *Gibberella* ear rot. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 8, p. 737-746, 1997.

SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 569-589, 1993.

SEO, J., LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n. 3, p.1331-1334, 1999.

SHIH, M.; HOEKSTRA, F. A.; HSING, Y. C. Late Embryogenesis Abundant Proteins. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 48, p. 211-255, 2008.

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

SILVA, C. S. et al. Valores nutricionais de milhos de diferentes qualidades para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 5, p. 883-889, 2008.

SILVA, J. B. et al. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 and fumonisin B1 during storage of brazilian sorghum. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 4352-4356, 2000.

SILVA, O. C. da; SCHIPANSKI, C. A. **Manual de identificação e manejo das doenças do milho**. Castro: Fundação ABC, 2006.

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

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**,[s. l.], v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

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).

SYDENHAM, E.W. et al. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1 a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v.38, n. 1, p. 285-290, 1990.

THIEL, P.G. et al. Levels of fumonisins B1 and B2 in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v.39, n. 1, p.109-111, 1991.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food. Perspectives in a global and European context. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 1, p. 147-157, 2007.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**. Athens, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994.

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

VANDERPLANK, J. E. **Plant Disiases: Epidemics and Control**. New York: Academic Press, 1963.

WALTERS, C., RIED, J. L.; WALKER-SIMMONS, M. K. Heat-soluble proteins extracted from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 7, n. 2, p. 125–134, 1997.

WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection.** Oxford: Blackwell, 2007.

WASTERACK, C. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development, **Annals of Botany**, London, v. 100, n. 1, p. 681-697, 2007.

WILKE, A. L.; BRONSON, C. R. Seed Transmission of *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Different Temperature Regimes, **Plant disease**, Saint Paul, v. 91, n. 9, p. 1109-115, 2007.

WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 217- 224, 2002.

WHITE, D. G. **Compendium of Corn Diseases.** 3rd ed. Saint. Paul: American Phytopathological Society Press; 1999.

ZHU, C. et al. Status and prospects of association mapping in plants. **Plant Genome.** v. 1, n. 1, p. 5-20, 2008.

CAPÍTULO 1

PARÂMETROS AGRONÔMICOS E QUALIDADE SANITÁRIA DE GRÃOS DE MILHO SUBMETIDOS A INOCULAÇÕES COM *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*

RESUMO

A produtividade e a qualidade de sementes e grãos de milho podem ser influenciadas pela ocorrência de fungos que causam podridões, cuja intensidade pode ser afetada também por fatores ambientais e genéticos. Dessa forma, o objetivo neste estudo foi avaliar a produtividade e a qualidade sanitária de grãos de milho de genótipos submetidos às inoculações com *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*. Foram utilizados quatro híbridos comerciais de milho com diferentes níveis de resistência a podridão de grãos conhecida como grãos ardidos. Foram realizadas inoculações de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* associados, além do tratamento controle, sem inoculação. A colheita dos grãos foi realizada em duas épocas, a primeira em março e a segunda em maio. Foram avaliadas produtividade, peso de mil grãos, incidência de doenças foliares, incidência de patógenos nas espigas e grãos e a análise sanitária por meio do *Blotter Test*. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 x 3 x 2), sendo quatro híbridos, três tipos de inoculações e duas épocas de colheita. As análises de variância foram realizadas por meio do software SISVAR. Para o híbrido RB9077 maior produtividade de grãos foi observada, enquanto isso foi observado maior peso de mil grãos para o híbrido P4285. As doenças foliares detectadas foram à mancha branca e cercosporiose. Os sintomas de grãos ardidos foram observados em todos os híbridos avaliados, independentemente do tipo de inoculação. Houve maior infecção dos grãos de milho pelo fungo *S. maydis* nos híbridos DKB390 e RB9077, classificados como susceptíveis a essas doenças. Não houve incidência de *S. maydis* nos grãos dos híbridos DKB390, P4285 e RB9077 sob condições de inoculação natural e com inoculação de *F. verticillioides* quando avaliados pelo *Blotter test*.

Palavras-chave: grãos ardidos; podridão de espigas; *Blotter test*; *Zea mays*

ABSTRACT

The productivity and quality of corn seeds and grains can be influenced by the occurrence of fungi that cause rot, whose intensity can be affected by environmental and genetic factors. Thus, the objective of this study was to evaluate the productivity and sanitary quality of corn grains of genotypes submitted to inoculations with *Fusarium verticillioides* and *Stenocarpella maydis*. Four commercial hybrids of corn with different levels of resistance to grain rot known as moldy grains were used. inoculations of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium verticillioides* and *Stenocarpella maydis* associated, were carried out, besides the control treatment, without inoculation. Grain harvesting was carried out in two seasons. The productivity, weight of a thousand grains, incidence of foliar diseases, incidence of pathogens in the ears and grains, and sanitary analysis were evaluated through Blotter Test. A completely randomized design was used in a factorial scheme (4 x 3 x 2), four hybrids, three types of inoculations and two harvest periods. Analyzes of variance were performed using the SISVAR software. For the hybrid RB9077 higher grain yield was observed and the greater weight of a thousand grains was verified for the hybrid P4285 was the one that obtained the best weight performance of thousand grains. The leaf diseases detected were white spot and cercosporiosis. Moldy grain symptoms were observed in all evaluated hybrids, regardless of the type of inoculation. There was a higher infection of the maize grains by *S. maydis* fungi in the hybrids classified as susceptible to these diseases DKB390 and RB9077. There was no incidence of *S. maydis* in the grains of hybrids DKB390, P4285 and RB9077 under natural inoculation conditions and with inoculation of *F. verticillioides*.

Keywords: moldy grains; ear rot; Blotter test; *Zea mays*.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas destinadas à alimentação humana e animal devido à sua composição química e alto valor nutritivo. Além de suas aplicações alimentícias, esse cereal é utilizado como matéria-prima na indústria para a produção de diversos tipos de produtos. Atualmente, o milho é cultivado em diferentes regiões do país, em uma área com mais de 17.346,5 mil hectares, com produção de aproximadamente 93.835,7 mil toneladas de grãos e produtividade média de 5,4 mil quilos por hectare (CONAB, 2017).

Aumentos de produtividade de grãos têm sido observados em função de tecnologias avançadas disponibilizadas para os agricultores. Dentre estas tecnologias merecem ser destacadas: a disponibilidade de híbridos adaptados às diferentes regiões do país, a disponibilidade de sementes com alta qualidade, tecnologias relacionadas aos tratamentos culturais, dentre outras.

Apesar do avanço em tecnologias, existem os fatores limitantes ao aumento da produtividade, como por exemplo, as doenças foliares que podem variar de ano para ano e de região para região, mas não é possível afirmar que alguma delas tenha maior importância em relação às demais. Tem sido comum a incidência de doenças que afetam tanto a produção quanto qualidade de sementes e grãos de milho com destaque para aquelas que causam podridões de espigas e as quais estão associadas à incidência de grãos ardidos.

Santin et al. (2004) avaliaram o efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos e constataram que a permanência prolongada das espigas de milho na planta, após a maturidade fisiológica dos grãos influenciou na redução da incidência de *Fusarium verticillioides*, seguindo a redução do teor de água presente nos grãos. Por outro lado, os autores observaram que houve aumento da incidência de *F. graminearum* e de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, quando os grãos foram colhidos com teor de água menor.

Os fungos que estão associados aos grãos ardidos, principalmente quando colonizam a espiga na fase de enchimento de grãos, podem estar associados a produção de micotoxinas, incluindo as fumonisinas que são mais comuns (WORDELL FILHO e SPAGNOLLO, 2013).

Vários fatores podem afetar a incidência de grãos ardidos em híbridos de milho, incluindo a resistência genética, os regimes de precipitação pluviométrica de cada localidade, danos de insetos às espigas, nutrição, dentre outros (COSTA et al. 2010).

Em estudos tem sido observado que diferenças na incidência de grãos ardidos estão relacionadas às características tais como: a suscetibilidade a pragas e doenças dos híbridos, às

densidades de plantas e à precipitação pluviométrica durante o enchimento de grãos (CASA et al. 2007; MARCONDES, 2012).

No trabalho desenvolvido por Mário; Gozuen e Juliatti (2017), foi observada variação quanto à resistência dos híbridos de milho em relação a presença de grãos ardidos. Para *Stenocarpella spp.* os valores de incidência de podridão de grãos mostraram distribuição contínua, indicando a possibilidade de que esta resistência seja condicionada por mais de um fator. Múltiplos aspectos genéticos são responsáveis pela resistência à podridão de grãos quando a podridão é causada por *Stenocarpella spp.* (OLATINWO et al. 1999, GUTIEREZ, 2008).

A presença de grãos ardidos pode inviabilizar a comercialização de grãos de milho. Sabe-se que a interação genótipos e ambientes tem sido reportada como importante fator que influencia a incidência de grãos ardidos. Assim, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito dos fungos causadores de grãos ardidos no rendimento e na qualidade sanitária de grãos de milho em diferentes híbridos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,8 m. Esta região apresenta clima tipo Cwb (clima temperado marítimo/clima tropical de altitude - regiões serranas) da classificação de Köppen (1900). A temperatura média anual é de 19,4°C, a pluviosidade se distribui, principalmente de outubro a abril, com valores médios anuais de 1529,7 mm.

Foram utilizados quatro híbridos comerciais de milho com diferentes níveis de resistência à podridão de grãos conhecida como grãos ardidos (PINTO, 2005; CASELA et al. 2006). As informações relativas à resistência dos materiais a grãos ardidos foram passadas por profissionais que trabalham na área (TABELA 1).

Esses híbridos possuem recomendações técnicas de época de semeadura, população de plantas, manejo e adubação (<http://www.pioneersementes.com.br/milho/central-de-produtos/produtos/p4285yhr>; http://www.sementesagrocere.com.br/pages/Produto.aspx?p=AG_7088; <https://www.dekalb.com.br/pt-br/nossos-produtos/hibridos-milho/verao/DKB-390.html>).

Tabela 1 - Híbridos de milho resistentes e susceptíveis a podridão de grãos selecionados para os testes de campo e para as análises moleculares.

Resistentes			Susceptíveis		
ID	Híbrido	Empresa	ID	Híbrido	Empresa
R1	AG 7088 Pro2	Agrocerec	S1	RB 9077 Pro	Riber KWS
R2	P 4285 YH	Pioneer	S2	DKB 390 Pro2	Monsanto

ID: identificação; R1: resistente 1; R2: resistente 2; S1: suscetível 1; S2 suscetível 2; AG: Agrocerec; P: Pioneer; RB: Riber; DKB: Dekalb; YH: Optimum® Intrasect®; Pro: resistente a lagartas; Pro 2: resistente a todos os tipos de lagartas e ao glifosato.

A semeadura foi realizada manualmente em novembro de 2016 em 40 linhas espaçadas de 0,6 m. A adubação de plantio foi de 400 Kg ha⁻¹ da formulação comercial 8-28-16. A adubação de cobertura foi realizada com a aplicação de 300 kg ha⁻¹ da formulação comercial 30-00-20 entre os estádios V4 e V5. Foi realizado o controle químico de plantas daninhas com a aplicação de 3 L/ha do herbicida Atrazina® (Nortox) seletivo de ação sistêmica pertencente ao grupo químico triazina, atuando como pré e pós-emergência precoce mais 180 mL/ha de Tembotriona Soberan® (Bayer) seletivo e sistêmico com concentração de 420 g/L. O controle de insetos pragas foi realizado com uma aplicação de 120 mL/ha de Espinosade Tracer® (Dow AgroSciences Industrial Ltda) inseticida não sistêmico de origem biológica do grupo químico das espinosinas e 80 mL/ha de Nomolt® 150 que é um inseticida a base de Teflubenzurom com ação de regulação de crescimento inibindo a síntese bioquímica da quitina, que é o principal componente do exoesqueleto ou cutícula do inseto. Os demais tratamentos culturais foram realizados conforme recomendação agrônômica para a cultura.

Para o processo de inoculação, foi usado o isolado de *Fusarium verticillioides* F425 com origem de genótipos de milho cultivados na cidade de Sinope, estado de Mato Grosso, sendo criopreservado na Micoteca da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas - MG. O isolado de *Stenocarpella maydis* Sm290 não tem origem definida e foi cedido pela Micoteca da UFLA. Primeiramente foi preparado o meio de cultura BDA (Batata-dextrose-agar) conforme protocolo (ANEXO A) para a replicação dos fungos *F. verticillioides* e o meio Aveia ágar – *Oatmeal Agar* (AO) para os fungos *S. maydis* (ANEXO B). Logo em seguida os isolados foram repicados em capela de fluxo e colocados em placas de petri para a produção dos conídios e picnídios. As placas contendo os meios e os fungos repicados foram incubadas em câmaras do tipo BOD com temperatura ajustada para ±27 °C e fotoperíodo de 12 horas. O desenvolvimento dos fungos ocorreu durante 14 dias para os fungos *Fusarium verticillioides* e 20 dias para *S. maydis*.

Os conídios de *F. verticillioides* e de *S. maydis* foram suspensos em água destilada e a contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer, obedecendo à quantidade ideal

de inóculos. A concentração da suspensão dos fungos *F. verticillioides* foi de 1×10^5 conídios mL^{-1} e para *S. maydis* foi de 1×10^6 conídios mL^{-1} . Foram aplicados 5 mL, de ambos, nos estilos estigmas das espigas através de seringa e agulha. A inoculação de *F. verticillioides* foi realizada 15 dias após todas as plantas das parcelas úteis terem emitido o estilo-estigmas (Bensch et al. 1992; Reid e Mather 1996; Clements et al. 2003). Cinco dias após a inoculação com *F. verticillioides* foi realizada a inoculação de *S. maydis*, ou seja, 20 dias após todas as plantas das linhas úteis emitiram o estilo-estigma.

Para cada híbrido, foram inoculadas oito linhas com *Fusarium verticillioides*, oito linhas com os dois fungos associados *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* e oito linhas sem inoculação, controle. Todas as inoculações foram realizadas sempre no final do dia, quando a temperatura se encontrava mais baixa.

2.1 Características agronômicas avaliadas

Para avaliar a incidência e severidade de doenças foliares, três plantas de cada linha foram avaliadas em três períodos diferentes antes das colheitas. A primeira avaliação foi realizada aos 90 dias após a emergência das plantas, conforme indicado por Brito et al. (2008). Para isso, foi feita avaliação visual da área foliar afetada pela doença, com o auxílio de escala diagramática, variando de 1 a 3, sendo 1 = 0% de sintomas; 2 = até 50% de sintomas; 3 com mais de 50% de sintomas na folha analisada.

As espigas de milho foram colhidas manualmente, em duas épocas diferentes, a primeira em março e a segunda em maio, simulando as diferentes épocas de colheitas realizadas pelos produtores. A primeira colheita de espigas foi realizada 47 dias após a inoculação dos patógenos em quatro das oito linhas de cada parcela para cada híbrido quando os grãos se encontravam com 36% de teor de água. A segunda colheita de espigas das linhas remanescentes foi realizada 90 dias após a inoculação dos patógenos quando os grãos estavam com 18 a 20% de teor de água.

As espigas de milho das duas colheitas foram acondicionadas em secadores de gaveta com temperatura de 35°C até atingir 13% de umidade. Após a secagem, os grãos foram beneficiados manualmente, amostras compostas contendo 1000 gramas de grãos de cada tratamento foram coletadas e encaminhadas para o Laboratório Central de Sementes onde foram armazenadas em câmara fria com temperatura de 10 °C para análises posteriores.

Para a determinação da produtividade de grãos (PG) por hectare, foi realizada a colheita manual das espigas de cada linha. As espigas foram debulhadas, os grãos pesados e o

teor de água dos grãos determinados. Os dados de produtividade de grãos foram corrigidos para o teor de água de 13% e expressos em quilos por hectare (kg ha^{-1}).

Para a determinação do peso de mil grãos (PMG), para cada amostra obtida nas duas colheitas foram separadas oito subamostras de 100 grãos e estas foram pesadas.

A incidência de podridão de espiga (IPE) foi avaliada com base em três métodos: a) severidade de podridão de espiga (SPE), b) porcentagem de espigas com sintomas de podridão (PESP) e c) porcentagem de grãos ardidos (PGA). Para avaliar índice de severidade de podridão de espiga foi utilizado uma escala de classificação diagramática proposta por Reid et al. (2002). O valor desta escala varia de 1 a 7 e inclui as seguintes categorias percentuais: incidência de podridão de espiga: 1 (0 %); 2 (1-3 %); 3 (4-10 %); 4 (11-25 %); 5 (26-50 %); 6 (51-75 %); e 7 (76-100 %). O PESP foi calculado com o número de espigas que apresentaram os sintomas característicos da doença em relação ao número total de espigas no campo. A PGA foi avaliada conforme o procedimento proposto na portaria nº11, de 12/04/96 (Brasil, 1996). O método consistiu na separação visual e na determinação da porcentagem de grãos com sintomas de descoloração em mais de um quarto da sua superfície total, a partir de uma amostra de 400 g de grãos, por tratamento.

Os grãos foram acondicionados na câmara fria do Laboratório Central de Sementes e mantidos em temperatura de 10 °C. Posteriormente, no Laboratório de Patologia de Sementes, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, foram instalados dois experimentos, para avaliação da qualidade sanitária por meio do *Blotter test*. Para a realização destes testes, foram utilizadas amostras dos grãos de cada tratamento que estavam armazenados na câmara fria há 30 dias.

De cada amostra, provenientes de plantas inoculadas e não inoculadas foram obtidas uma amostra com 225 grãos, as quais foram dispostas em nove placas de petri acrílicas, contendo três folhas de papel de filtro embebidas com meio BDA (Batata Dextrose Ágar). Em cada placa, foram dispostos vinte e cinco grãos equidistantes. Estas placas permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas e, após este período, foram acondicionadas por mais 24 horas a -20 °C e, em seguida, incubadas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas, conforme método descrito por Mario e Reis (2001).

Nas avaliações da sanidade dos grãos foram consideradas a severidade de grãos sintomáticos com estruturas fúngicas de *F. verticillioides* e *S. maydis*. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4x3, sendo as variáveis os quatro híbridos e os três tratamentos de inoculação, sendo a inoculação com *F. verticillioides*, inoculação associada utilizando dois fungos *F. verticillioides* e *S. maydis* e o tratamento

controle sem inoculação. Todos os tratamentos foram conduzidos até o 15º dia. Após cinco dias de incubação foram avaliadas a severidade de *F. verticillioides*, e no 15º dia após incubação foi avaliada a severidade dos fungos *S. maydis*.

Para a avaliação de severidade foi estabelecida adicionalmente uma escala de notas, baseada no percentual da superfície de cada grão recoberto por estruturas típicas dos fungos. Para isto, foi utilizada uma lupa e um microscópio estereoscópico. A escala de notas adotada foi à seguinte: (0) grão sadio; (1) até 25% do grão recoberto por estruturas fúngicas; (2) até 50% do grão recoberto por estruturas fúngicas; (3) mais de 50% do grão recoberto por estruturas fúngicas (Mário, Reis e Juliatti, 2011). Para a determinação da severidade de infecção por grão, foi utilizada a metodologia de análise de severidade proposta por McKinney (1923):

$$SI/S = \frac{\sum (f \times n)}{F \times N} \times 100$$

em que:

(SI/S): severidade de inóculo por grão observado; (f): nota da escala atribuída ao grão observado; (n): número de grãos que receberam a nota (f); (F): nota máxima da escala, e (N): número total de grãos avaliados por repetição.

2.2 Procedimento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x3x2 sendo 4 híbridos, 3 tratamentos de inoculação e 2 épocas de colheita de espigas. A parcela foi composta por oito linhas, cada linha com 3,6 m², para cada tratamento, sendo quatro linhas para a primeira época de colheita e quatro linhas para a segunda época. A inoculação dos patógenos foi realizada nas espigas de 30 plantas por linha. As análises de variância foram realizadas por meio do software SISVAR (Sistema de Análise de Variâncias) (FERREIRA, 2002) e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade. Quando necessário, foram realizadas as transformações dos dados (ANEXO D, ANEXO E).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável produtividade de grãos (PG) na primeira e segunda colheita de espigas houve interação significativa entre híbridos e inoculações ($P \leq 0,05$). Maiores valores de produtividade, na primeira e segunda colheita foram observadas para o híbrido RB9077, cerca de 11 toneladas por hectare (ton/ha) e 9 ton/ha, respectivamente. Para os demais híbridos, nestas mesmas condições, não houve diferença estatística (TABELA 2).

Tabela 2 - Médias de Produtividade de Grãos (PG) em quilos/hectare (kg.ha-1) e em sacos/hectare (sc.ha-1) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 1	INOCULAÇÃO		
	C	Fv	FvSm
Híbrido			
AG7088	7333,38 Ba	5200,70 Bb	4542,02 Bb
DKB390	7148,53 Ba	7659,91 Aa	7676,07 Aa
P4285	6778,34 Ba	5796,58 Ba	3700,75 Bb
RB9077	11004,62 Aa	7465,74 Ab	7418,98 Ab
COLHEITA 2	INOCULAÇÃO		
	C	Fv	FvSm
Híbrido			
AG7088	6367,83 Da	6657,27 Ba	4951,13 Cb
DKB390	8707,40 Ba	6903,14 Bb	8703,23 Aa
P4285	7560,75 Ca	6156,85 Bb	3970,27 Dc
RB9077	9785,38 Aa	7724,74 Ab	7505,95 Bb

*Médias maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT.

Fonte: Do autor (2018).

Para os híbridos DKB390 e RB9077, foram observadas produtividades superiores às dos híbridos AG7088 e P4285, em condições de inoculação com o patógeno *Fusarium verticillioides* (Fv) e quando foram utilizados os dois fungos associados *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* (FvSm) nas duas épocas de colheita. Isso mostra que mesmo na presença destes patógenos houve maiores valores de produtividade dos híbridos DKB390 e RB9077 em relação aos demais híbridos avaliados, provavelmente devido à falta de controle químico com fungicidas neste experimento.

Para a primeira colheita, quando se analisa o comportamento de cada híbrido quando inoculados com os fungos em relação ao tratamento controle (C), foi verificado que para os

híbridos AG7088 e RB9077 houve menor produtividade quando as plantas foram inoculadas com *F. verticillioides* (Fv) e quando foram inoculadas em FvSm. Já para o híbrido P4285 houve redução de produtividade somente quando a inoculação foi realizada com os dois patógenos na primeira e segunda colheita.

Ressalta-se que a produtividade de grãos, do híbrido DKB390, classificado como susceptível, quando a colheita foi realizada na primeira época, não foi influenciada quando houve a inoculação dos fungos. No entanto, para o híbrido RB9077, também classificado como susceptível observou-se redução mais significativa da produtividade, quando inoculado, cerca de 32% de redução.

Na segunda época de colheita, quando foram inoculados *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis* associados (FvSm), maior produtividade foi observada para o DKB390 e a menor para o P4285 com diferença de 54 % (TABELA 2). Quando se analisa o comportamento de cada híbrido na presença dos fungos inoculados em relação ao tratamento controle (C), em todos os materiais verificou-se redução da produtividade na presença dos fungos inoculados, exceto para o híbrido AG7088 quando inoculado com *F. verticillioides* e para o DKB390 na presença conjunta dos dois fungos. Já para o híbrido AG7088 houve redução da produtividade de grãos somente na presença dos patógenos associados (FvSm). Já para o híbrido DKB390, na segunda colheita, houve menor produtividade quando da inoculação com o patógeno *F. verticillioides* (Fv). Já para o híbrido RB9077 houve redução da produtividade quando das inoculações, independentemente dos patógenos.

Assim, foi observado para o híbrido susceptível, RB9077, altas produtividades, nas duas colheitas, no tratamento controle, confirmando as informações técnicas da empresa produtora detentora do material quanto ao excelente potencial produtivo de grãos profundos e pesados (RIBER KWS sementes, 2016). Por outro lado, no híbrido classificado como resistente, P4285, houve menor rendimento, na segunda colheita quando submetido à inoculação associada dos patógenos (FvSm). Certamente, evidencia-se que o controle químico com fungicidas é um importante aliado ao potencial genético deste híbrido. Segundo Brito et al. (2012), o controle de doenças foliares do milho por meio da aplicação de fungicidas também contribui para a redução na incidência de grãos ardidos ampliando a resistência das plantas aos patógenos.

Entretanto, quando não inoculados, para os híbridos RB9077 e P4285 houve maior rendimento, assim como para o híbrido DKB390 foi observada maior produtividade quando as plantas foram inoculadas com os fungos associados, FvSm, valores estes bem acima da média estimada de 6.374 Kg.ha⁻¹ para o estado de Minas Gerais (CONAB, 2017).

Em relação à produtividade e à porcentagem de grãos ardidos, Mendes (2009) relatou que estas características foram influenciadas pelo tipo de híbrido e pelas safras agrícolas, sendo verificada no plantio direto, e que não há associação entre produtividade de grãos e a porcentagem de grãos ardidos, o que demonstra que as perdas provocadas pela incidência de grãos ardidos são de caráter quantitativo. No entanto, de acordo com os dados que obtivemos, essa perda de produtividade em função da colonização por patógeno acontece quando temos a presença de *Stenocarpella maydis*. Apenas a infecção por *F. verticillioides* não resultou em perda expressiva de produtividade.

Para a variável Peso de Mil Grãos (PMG), houve significância para a interação entre híbridos e inoculações ($P \leq 0,05$). O objetivo de determinar o peso de mil grãos de uma amostra é para obter informações do tamanho dos grãos, assim como de seu estado de maturidade e de sanidade (BRASIL, 2009).

Na primeira colheita o melhor desempenho para o peso de mil grãos foi dos híbridos conhecidos como resistentes AG7088 e P4285 quando inoculados com *F. verticillioides* e no para o tratamento controle (C) (TABELA 3).

Tabela 3 - Médias de Peso de Mil Grãos (PMG) em gramas de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 1		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	306,49 Aa	283,06 Ab	192,27 Bc
DKB390	231,76 Ca	239,87 Ba	218,37 Ab
P4285	299,80 Aa	277,66 Ab	153,92 Cc
RB9077	278,33 Ba	251,05 Bb	231,45 Ac
COLHEITA 2		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	299,67 Cb	318,33 Ba	220,00 Bc
DKB390	267,33 Da	232,00 Cb	197,00 Cc
P4285	370,00 Aa	336,33 Ab	184,00 Dc
RB9077	333,33 Ba	313,33 Bb	242,00 Ac

*Médias maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT.

Fonte: Do autor (2018)

Para os híbridos DKB390 e RB9077 foram observados os maiores valores para o peso de mil grãos quando as plantas foram inoculadas com os dois fungos associados (FvSm) e não houve diferença significativa entre os mesmos. No entanto, no tratamento controle foram observados os menores valores de peso de mil grãos (PMG) para estes híbridos.

O mercado interno aceita grãos ardidos na massa até o nível de 6% e para exportação, não mais que 2 a 3% (PINTO et al. 2007). Nestes níveis de grãos ardidos, ainda vai prevalecer o potencial genético/produtivo do híbrido, sabe-se que o DKB390 e o RB9077 são muito produtivos em relação aos demais que tem maior resistência a grãos ardidos, sendo estes dois híbridos utilizados frequentemente pelos agricultores. Para obter o efeito deletério dos fungos no peso dos grãos e na produtividade, o que era esperado nestes híbridos, necessitaria estar no nível acima de 12 a 15%, principalmente no tratamento inoculado. No entanto, mesmo com a inoculação deve existir a influência climática como, por exemplo, déficit de água no florescimento e precipitação pluvial na colheita com dias nublados aliados aos níveis baixos de nitrogênio. Se não houver estas condições, não haverá níveis de dano econômico expressivo como observados nos resultados, e daí manifesta a característica de potencial genético dos híbridos.

Quando se analisa o comportamento de cada híbrido na presença dos fungos inoculados em relação ao tratamento controle (C), para todos os híbridos AG7088, DKB390, P4285 e RB9077 houve redução de peso de mil grãos quando foi realizada a inoculação associada (FvSm) e também quando comparados aos valores observados ao tratamento inoculado com *F. verticillioides*. Nos tratamentos em que a inoculação foi realizada, o híbrido DKB390 teve comportamento similar quando inoculado apenas com *F. verticillioides* em comparação com o tratamento controle, enquanto que no híbrido RB9077 os valores foram estatisticamente diferentes nos três tratamentos.

Com estes resultados é possível afirmar que houve influência dos patógenos *F. verticillioides* e *S. maydis*, quando inoculados na mesma espiga, no peso de mil grãos.

Na segunda colheita, para todos os híbridos houve redução do peso de mil grãos principalmente quando a inoculação foi realizada com os dois patógenos FvSm, quando comparados aos valores observados no tratamento controle (TABELA 3). Para o híbrido P4285, observou-se o maior peso de mil grãos com 370 g seguido do RB9077 com 333g no tratamento controle. Quando as plantas foram inoculadas apenas com *F. verticillioides* houve redução significativa do peso de mil grãos para estes híbridos.

Comparando as duas épocas de colheita, para o híbrido resistente P4285 obteve-se maiores valores de peso de mil grãos. Assim pode-se inferir principalmente que a inoculação

associada dos patógenos causadores de podridões de grãos, propiciou a redução do peso de mil grãos, o que na maioria dos tratamentos também reduziu a produtividade de grãos.

A relação da severidade entre os dois fungos *S. maydis* e *F. verticillioides* será demonstrada mais adiante por meio dos resultados do teste de sanidade (*Blotter test*). Mesmo assim, vale a pena fazer uma conexão dos resultados de PMG com o teste de sanidade para inferir que provavelmente, os valores expressivos de severidade de grãos ardidos obtidos em grãos de híbridos da categoria resistente podem ser atribuídos à pressão de inóculos aplicados diretamente no estilo estigma das espigas, podendo romper as barreiras físicas e bioquímicas de defesa da planta contra a infecção destes patógenos e pelo fato de não ter sido realizado o controle químico com fungicidas. Freitas et al. (2009) avaliaram o peso de mil grãos em híbridos no sudoeste de Goiás e o maior peso de mil grãos foi observado no híbrido AG7010 não diferindo, outrossim, do híbrido Cargill 306. Horn et al. (2006), afirmam sobre a existência da variabilidade genética entre híbridos, conferindo-lhes rusticidade e potenciais produtivos distintos.

Certamente, o potencial genético, as condições climáticas, a ausência de aplicação de fungicidas e as condições de estresse causadas pela infecção dos fungos nas espigas dos híbridos avaliados pode ter influenciado na produtividade de grãos.

Outro fator importante são as doenças foliares detectadas nos híbridos na presente pesquisa que estão entre as principais doenças da cultura do milho. Foram observados sintomas nas folhas das seguintes doenças, Mancha Branca causada pelo complexo de fungos *Phaeospharia maydis*, *Phyllosticta* sp. e *P. ananás*, Cercosporiose ocasionada pela infecção dos fungos *Cercospora zea-maydis* e a Ferrugem Polissora causada pelos fungos *Puccinia polysora* (TABELA 4).

Tabela 4 - Doenças foliares detectadas (%) em plantas de milho durante a safra 2016/17. Fatores híbridos e doenças foliares Mancha Branca (MB), Cercosporiose (CE), e Ferrugem polissora (FP). Híbridos resistentes AG7088, P4285 e susceptíveis RB9077 e DKB390 a grãos ardidos.

HÍBRIDO	DOENÇA			Média
	MB	CE	FP	
AG7088	50,0	56,7	33,3	46,7
P4285	52,7	50,0	0,0	34,2
RB9077	50,0	50,0	0,0	33,3
DKB390	50,0	52,0	33,3	45,1
Média	50,7	52,2	16,7	

Fonte: Do autor (2018)

Dentre as três doenças observadas durante as avaliações no campo, os sintomas de mancha branca e a cercosporiose foram predominantes com pouco mais de 50% das folhas

analisadas em todos os híbridos e tratamentos. Para a Ferrugem polissora houve incidência nos híbridos AG7088 e DKB390. Os híbridos P4285 e RB9077 foram resistentes quanto à infecção destes fungos.

Em relação às doenças que afetam a produtividade e qualidade de grãos de milho destacam-se as podridões de espiga, as quais estão associadas à incidência de grãos ardidos (PINTO, 2005; CASELA et al., 2006). A redução de produtividade se dá pela alta severidade da doença nas folhas, diminuindo a área fotossintetizante. Os danos também ocorrem pela consequente redução nos níveis de resistência, por sua vez, favorecendo podridões de colmo e espigas levando ao tombamento das plantas (Juliatti e Brandão, 2000).

Uma das informações adquiridas das empresas de produção de sementes de híbridos de milho foi a observação na frequência de sintomas foliares e de colmos de doenças como a podridão branca causada pelo fungo *S. maydis* nestes híbridos, entretanto, mesmo com sintomas desta doença na planta, geralmente, não há incidência ou severidade de grãos ardidos.

Para a variável severidade de podridão de espiga, na primeira época de colheita das espigas, Tabela 5, não houve diferença estatística dos valores observados entre os grãos dos híbridos no tratamento controle, porém, no tratamento Fv com inoculação das plantas com *F. verticillioides*, maior incidência de podridão de espigas foi observada no híbrido RB9077. No tratamento com a inoculação associada dos patógenos *F. verticillioides* e *S. maydis* (FvSm) observou-se 100% de podridão de espigas para os híbridos RB9077 e P4285, diferenciando estatisticamente dos demais. Provavelmente, devido ao teor de água ser mais alto, 36 % nos grãos colhidos na primeira época de colheita, houve alta colonização com menor severidade de infecção dos fungos de campo nos grãos.

Foram observados sintomas de grãos ardidos ou podridão em todos os híbridos avaliados, independente da característica do híbrido ou tipo de inoculação. Em evidência, a inoculação FvSm foi a que propiciou maiores porcentagens de espigas doentes para todos os híbridos avaliados. Neste tratamento, no AG7088 foi observada menor incidência de podridão (TABELA 5).

Tabela 5 - Severidade de podridão de espiga (SPE) em porcentagem (%), de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. (março/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 1	INOCULAÇÃO		
	Híbrido	C	Fv
AG7088	1,90 Ac	8,41 Bb	78,57 Ca
DKB390	4,28 Ac	10,79 Bb	85,71 Ba
P4285	3,49 Ab	8,09 Bb	100,00 Aa
RB9077	5,23 Ac	31,26 Ab	100,00 Aa

*Médias maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT

Fonte: Do autor (2018)

Na segunda época de colheita das espigas, a proporção de podridão de espigas para o híbrido RB9077 foi estatisticamente diferente dos demais híbridos com 41,7 % das espigas com sintomas de podridão. Vale salientar que os dados de sintomas de podridão de espigas para os demais híbridos não foram estatisticamente diferentes (TABELA 6).

Tabela 6 - Severidade de podridão de espiga (SPE) em porcentagem (%) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 2	MÉDIAS
Híbrido	%
AG7088	30,79 B
DKB390	32,01 B
P4285	31,58 B
RB9077	41,74 A

*Médias seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT.

Fonte: Do autor (2018)

Ainda em relação à segunda colheita, a infecção das espigas pelos patógenos foi maior quando foi realizada a inoculação das plantas com os dois fungos *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis* (TABELA 7).

No tratamento controle, os sintomas de podridão foram baixos com 5,3 %. No entanto, quando as plantas foram inoculadas principalmente com os dois fungos houve mais incidência de podridão de espigas, 85 %. Em geral, para o híbrido AG7088, classificado como resistente observou-se o menor índice de podridão de espigas nas duas colheitas e maior valor foi

verificado no híbrido RB9077, classificado como susceptível. No entanto, para o híbrido P4285 classificado como resistente também foi observada maior incidência de podridão.

Tabela 7 - Severidade de podridão de espiga (SPE) em porcentagem (%) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Segunda colheita (maio/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 2	MÉDIAS
INOCULAÇÃO	%
Controle – C	5,35 B
<i>Fusarium verticillioides</i> – Fv	11,38 B
<i>F. verticillioides</i> + <i>Stenocarpella maydis</i> - FvSm	85,35 A

*Médias seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT.

Fonte: Do autor (2018)

Reis et al. (2004) relatam que as espigas são mais suscetíveis ao ataque de *Fusarium* spp. dois dias após a exposição dos estigmas e, num menor grau, até 40 dias após. A infecção por *Stenocarpella* spp. ocorre principalmente no período de duas a três semanas após a polinização, em condições ambientais favoráveis. A infecção na espiga por esses fitopatógenos é favorecida por clima úmido na fase de polinização, mau empalhamento e por injúrias causadas por insetos (SHURTLEFF, 1992), condições semelhantes deste presente estudo principalmente devido ao clima úmido na fase de polinização e pelas injúrias causadas pelo processo de inoculação.

Para a variável porcentagem de espigas com sintomas de podridão (PESP) os resultados, na primeira e segunda colheita, foram significativos para a interação híbridos e inoculações ($P \leq 0,05$). O número de espigas com podridão foi maior para o híbrido RB9077 no tratamento Fv com 39% seguido do híbrido P4285 com 26%, para a primeira e segunda colheita, respectivamente. Quando as espigas foram inoculadas com os dois patógenos associados (FvSm) maior número de espigas com sintomas de podridão foi observado para o híbrido P4285 com 100% de sintomas, seguidos pelos AG7088 e RB9077 com 73% e 77% para a primeira colheita. (TABELA 8).

Tabela 8 - Porcentagem de Espigas com Sintomas de Podridão (PESP) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e segunda colheita (maio/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 1		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	1,00 Ac	9,00 Cb	73,00 Ba
DKB390	3,33 Ac	14,33 Cb	43,00 Ca
P4285	3,33 Ac	24,66 Bb	100,00 Aa
RB9077	9,00 Ac	39,00 Ab	77,00 Ba

COLHEITA 2		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	9,00 Ab	3,10 Cc	80,00 Ba
DKB390	1,00 Bc	7,67 Cb	80,00 Ba
P4285	11,00 Ab	14,33 Bb	87,00 Aa
RB9077	11,00 Ac	26,67 Ab	90,00 Aa

*Médias maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT.

Fonte: Do autor (2018).

Para a segunda colheita, a porcentagem de espigas com sintomas de podridão nos híbridos P4285 e RB9077 foi maior em relação aos demais híbridos para todos os tratamentos com diferença estatística entre estes dois híbridos apenas quando houve a inoculação com *F. verticillioides* com valores de 14,3 % e 26,6 % (TABELA 8). Mais uma vez, evidenciou-se que a inoculação associada dos patógenos foi mais agressiva causando maiores danos as espigas com espigas com sintomas de podridão acima de 80 %.

Os sintomas de grãos ardidos ou podridão apareceram em espigas de todos os híbridos avaliados principalmente quando a inoculação das espigas foi realizada com os dois patógenos. Como era esperada, a quantidade de espigas com sintomas foi similar a variável incidência de podridão de espigas. Porém, neste caso houve interação dos híbridos com as inoculações dos patógenos. Tornou-se evidente que a inoculação associada dos patógenos no tratamento FvSm foi mais agressiva causando maior incidência e severidade dos patógenos.

A redução da área foliar devido a outras doenças, como no caso da mancha branca e cercosporiose observadas neste presente estudo, podem também predispor as plantas à infecção de *Stenocarpella* (Dodd, 1980; Smith e White, 1988). Vale a pena ressaltar que em relação a *F. verticillioides*, o patógeno *S. maydis* causa mancha foliar além de grãos ardidos e tem sido detectada com maior frequência e intensidade nas lavouras de milho conduzidas em

monocultura. Além de causar dano pela redução da área foliar da planta as lesões foliares têm contribuído para produção de inóculo para infecção dos colmos e da base da espiga evidenciando um mecanismo de patogenicidade (REIS e CASA, 2000).

Para a variável porcentagem de grãos ardidos (PGA), houve interação entre híbridos e inoculações conforme os resultados das análises de variâncias. Para a primeira colheita, verificou-se no híbrido RB9077 os maiores valores de porcentagem de grãos ardidos no tratamento Fv (TABELA 9).

Tabela 9 - Porcentagem de Grãos Ardidos (PGA) de quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e segunda colheita (maio/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 1		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	0,54 Ac	3,02 Bb	63,82 Ba
DKB390	0,87 Ac	2,66 Bb	32,79 Ca
P4285	1,05 Ab	2,12 Bb	98,16 Aa
RB9077	3,05 Ac	6,45 Ab	64,45 Ba
COLHEITA 2		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	1,47 Ac	4,55 Ab	72,47 Ca
DKB390	1,06 Ab	1,59 Ab	88,70 Ba
P4285	1,90 Ab	1,67 Ab	68,09 Da
RB9077	3,87 Ab	2,70 Ab	94,34 Aa

*Médias maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT. Fonte: Do autor (2018).

Na primeira colheita, para o tratamento FvSm com os patógenos associados, para o híbrido P4285 foi observada alta porcentagem de grãos ardidos, 98 %. Seguidas das observadas para os híbridos RB9077 e AG7088 com 64,4% e 63,8%, respectivamente. Já para o híbrido DKB390, neste tratamento, houve menor porcentagem de grãos ardidos (TABELA 9).

Para a segunda colheita, a interação híbridos e inoculações não foi significativa. Comparando o desempenho dos híbridos em relação às inoculações, verificou-se alta porcentagem de grãos ardidos no tratamento FvSm variando de 68 % a 94 %, reproduzindo os resultados dos testes anteriores (TABELA 9).

Mesmo com altos valores de grãos ardidos para os híbridos resistentes observaram-se menores valores quando foi realizada a inoculação com os fungos *F. verticillioides* e *S.*

maydis. RB9077 foi o híbrido com maiores valores de podridão de grãos na condição de inoculação FvSm com 94 % dos grãos doentes sendo que no tratamento controle o porcentual de grãos ardidos foi de 3,8 %.

Mendes et al. (2012) observaram maior incidência de grãos ardidos para o híbrido DKB390 quando inoculado com *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* em parcelas isoladas. Estes resultados corroboram com a seguinte hipótese, quando as espigas dos híbridos de milho são inoculadas com patógenos, certamente ocorrerá maior porcentagem de grãos ardidos.

Compilando os resultados, os sintomas de grãos ardidos ou podridão apareceram em todos os híbridos testados, independente da característica do híbrido ou tipo de inoculação. A quantidade de espigas com sintomas de podridão da segunda colheita foi similar aos resultados da primeira colheita. O híbrido AG7088 foi o que apresentou maior resistência à infecção dos patógenos. Por outro lado, valores mais altos de infecção dos patógenos foram observados para os híbridos P4285 e RB9077. Ressalta-se que a inoculação associada dos patógenos *F. verticillioides* e *S. maydis* foi mais agressiva causando maiores danos às espigas.

A incidência destes fungos nos grãos normalmente ocorre pela infecção natural da espiga no campo, favorecida por clima úmido e quente na fase de polinização, mau empalhamento e danos externos causados por insetos, o excesso de chuvas após a maturação fisiológica dos grãos, o manejo da lâmina de água de irrigação e o manejo dos restos de cultura (SHURTLEFF, 1992; AGRIOS, 1997; PINTO, 1998).

Resultados com diferenças na incidência de patógenos em relação ao teor de água dos grãos foram analisados por Santin et al. (2004). Os autores avaliaram o efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos e constataram que a permanência prolongada das espigas de milho na planta, após a maturidade fisiológica dos grãos influenciou na redução da incidência de *Fusarium verticillioides*, seguindo a redução do grau de umidade presente nos grãos. Por outro lado, os autores observaram que houve aumento da incidência de *F. graminearum* e de espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, quando os grãos foram colhidos com graus de umidades menores.

A antecipação da colheita pode ser uma prática eficiente na manutenção da qualidade dos grãos (FARIA et al., 2002), podendo reduzir a incidência de grãos ardidos, principalmente em regiões com elevadas precipitações, pois os grãos ficariam menos expostos a condições de alta umidade e à presença do inóculo natural dos patógenos que possam estar presente na área de cultivo. Os grãos foram colhidos na primeira colheita com 36 % de teor de água com a média da umidade relativa do ar de 70 % e na segunda colheita com 18 a 20% de teor de água

nos grãos e 78 % de umidade relativa do ar com redução da precipitação pluviométrica. A evolução da podridão praticamente cessa quando o teor de água dos grãos atinge 21 a 22% (PINTO et. al. 2005). Em hipótese, devido à redução da precipitação pluviométrica, não houve efeito no teor de água dos grãos, pelo contrário, houve redução, provavelmente influenciou diretamente na severidade da infecção dos patógenos. Em ambas as colheitas, os grãos foram secos em secador de espigas a 35 °C até atingirem 13% de teor de água.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a investigação realizada por Spagnollo, Filho e Nesi . (2016) no qual os autores observaram na safra 2012/13 diferença significativa entre híbridos com 48,6% de grãos ardidos para DKB 240H considerado moderadamente resistente a grãos ardidos e 47,3% para o híbrido P30F53H na condição natural de inoculação.

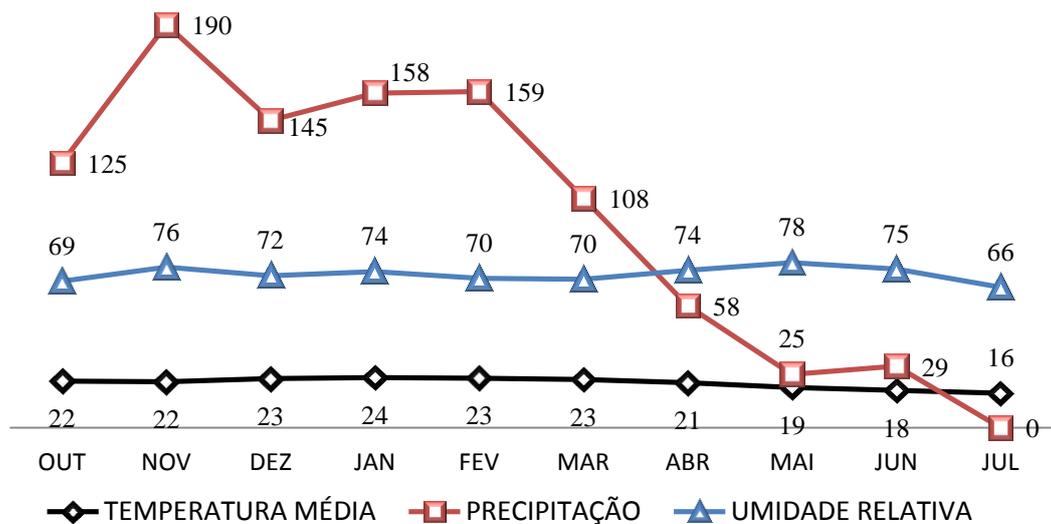
Em estudo conduzido com o intuito de investigar o comportamento de híbridos de milho inoculados com fungos causadores de grãos ardidos em duas safras diferentes, Mendes et al. (2012) obtiveram valores de incidência de fungos entre 2,6 % e 7,0 % na safra 2006/2007, sendo que as médias não diferiram entre si estatisticamente. Já na safra 2007/2008, os valores obtidos variaram de 4,7 % a 33 %, havendo diferenças estatísticas entre os híbridos avaliados. Segundo os autores, a maior incidência do fungo na segunda safra avaliada foi devido à maior intensidade de chuvas no final do ciclo da cultura. A significância da interação híbridos e inoculações e safras, para a incidência de grãos ardidos, permite inferir que há diferenças na reação dos híbridos avaliados quando inoculados com os fungos *F. verticillioides*, *S. maydis* e *S. macrospora* e que isso é varia entre safras agrícolas.

Comparando com o estudo de Mendes et al. (2012), os resultados obtidos nas duas épocas de colheita na mesma safra, não diferiram entre si. Houve interação híbridos e inoculações independentemente da época de colheita. No presente estudo, a temperatura média da primeira época de colheita, em março, para a segunda época, em maio, reduziu de 23 °C para 19 °C. Também houve redução da precipitação pluviométrica de 108 milímetros para 25 milímetros. Enquanto isso a umidade relativa do ar manteve-se entre 70 % e 78 % (GRÁFICO 1).

Portanto, certamente os resultados observados neste estudo dos parâmetros agrônômicos associados à resistência em grãos ardidos de híbridos de milho podem estar associados às condições ambientais. Conforme já mencionado, os dados climáticos obtidos após as inoculações dos patógenos em fevereiro de 2017 até a primeira época de colheita em março com médias de temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa de 23 °C, 133,5 milímetros e 70 %, respectivamente. Enquanto que no intervalo da primeira para a

segunda colheita, em maio, as médias foram de 20 °C, 41,5 milímetros e 76 %, respectivamente podem ter influenciado na incidência e severidade dos fungos causadores de grãos ardidos. (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 - Dados médios de temperatura, precipitação pluviométrica mensal e umidade relativa do ar em Lavras, MG, out/2016 a jul/2017. Dados obtidos no setor de agrometeorologia da UFLA. A primeira época de colheita das espigas foi em março e a segunda época em maio.



Fonte: Do autor (2018).

A influência da temperatura tem sido estudada para *F. verticillioides*, mostrando-se estar adaptado a uma ampla faixa de temperatura (20 a 25 °C) (CASTELLÁ et al. 1999), faixa também observada no período da inoculação até a segunda época de colheita. Como as médias apresentadas são referentes aos dias de cada mês, levou, em hipótese, que em alguns horários do dia a temperatura propiciou a infecção dos patógenos com dias quentes e noites frias.

Casa, Reis e Zambolim (2006) verificaram que a faixa de temperatura entre 23 e 28°C proporcionou maior crescimento do micélio de *S. maydis*, tanto sob luz contínua como sob fotoperíodo de 12 h. As temperaturas entre 28 e 33 °C propiciaram a maior porcentagem de germinação dos conídios de *S. maydis*. Segundo Shurtleff (1992) a infecção natural ocorre principalmente no período de duas a três semanas após a polinização, com clima úmido e temperatura de 28-30 °C. Portanto, após a inoculação das espigas a temperatura foi favorável à infecção e crescimento dos dois fungos.

Os dados do teste de sanidade foram apresentados, separadamente, em três tabelas sendo os resultados das duas primeiras tabelas a avaliação de severidade de *Fusarium verticillioides* (Fv) e a última a avaliação de severidade de *Stenocarpella maydis* (Sm).

Em relação à porcentagem de severidade de *F. verticillioides*, em grãos colhidos na primeira época houve significância para a interação híbridos e inoculações. Entretanto, em grãos colhidos na segunda época não houve significância.

Para o tratamento sem inoculação, houve maior severidade de *F. verticillioides* em grãos do híbrido P4285, colhidos na primeira época. Quando foi realizada a inoculação Fv, não houve diferença dos valores de severidade entre os híbridos avaliados. Quando foi realizada a inoculação das espigas com os dois fungos, FvSm, houve maior severidade de *F. verticillioides* em grãos do híbrido DKB390 e menor em grãos do híbrido P4285 (TABELA 10).

Tabela 10 - Severidade de infecção de grãos por *Fusarium verticillioides*. Teste de sanidade *Blotter test* em quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

HÍBRIDO	INOCULAÇÃO		
	C	Fv	FvSm
AG7088	4,84 Bb	6,61 Aa	4,28 Bb
DKB390	3,71 Bb	5,80 Aa	6,54 Aa
P4285	6,80 Aa	6,86 Aa	1,88 Cb
RB9077	4,67 Ba	6,32 Aa	5,87 Aa

*Médias maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT.

*Transformados pela equação $(X+0,5)^{0,5}$

Fonte: Do autor (2018)

Ao comparar os resultados de severidade de *F. verticillioides* em grãos colhidos na primeira época foram observados valores diferentes entre os híbridos avaliados. Para o híbrido DKB390, menor severidade foi observada quando não houve inoculação dos patógenos nas espigas. Já para o híbrido P4285 menor severidade de *F. verticillioides* foi observada quando houve a inoculação com os dois fungos associados, FvSm. Para o híbrido RB9077 não houve diferença significativa dos dados de severidade, independentemente dos tratamentos de inoculação.

Já na segunda época de colheita ocorreu significância apenas para o fator inoculação e não houve a interação entre híbridos e inoculações conforme demonstrado na Tabela 17 (ANEXO E). Quando os híbridos foram inoculados com *F. verticillioides*, tratamento Fv, foi observada a maior severidade nos grãos, com média de 6,9 %. Para os demais tratamentos de

inoculação, C e FvSm não houve diferença significativa entre estes, com valores de 6 % e 5,8 %, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11 - Severidade de infecção de grãos por *Fusarium verticillioides*. Teste de sanidade *Blotter test*. em quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Segunda colheita com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 2 (Fv)	INOCULAÇÃO	MÉDIAS
	Controle - C	6,00 B
	<i>Fusarium verticillioides</i> - Fv	6,91 A
	<i>F. verticillioides</i> + <i>Stenocarpella maydis</i> - FvSm	5,86 B

*Médias seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT. *Transformados pela equação $(X+0,5)^{0,5}$.

Fonte: Do autor (2018)

Foi possível observar que os valores de severidade de *Fusarium verticillioides* permaneceram nos níveis de tolerância indicada por agroindústrias e cooperativas de grãos, cuja tolerância máxima é de 6% para a incidência de grãos ardidos em lotes comerciais de milho (PINTO et al. 2007).

Enquanto isso foi observada interação entre híbridos e inoculações conforme a análise de variância referente à severidade do patógeno *Stenocarpella maydis* em grãos colhidos na primeira e segunda época (Tabela 18) (ANEXO D).

Para a primeira colheita não houve severidade de *S. maydis* quando os híbridos foram inoculados apenas com *Fusarium verticillioides* e no tratamento controle, sem inoculação (TABELA 12). Já quando as espigas foram inoculadas com *F. verticillioides* e *S. maydis* associados, houve alta severidade deste patógeno com valores de 84 % a 100 %. Maior severidade do patógeno foi observada em grãos dos híbridos AG7088 e P4285 e menor nos grãos dos híbridos DKB390 e RB9077, sendo estes últimos considerados como susceptíveis.

Tabela 12 - Severidade de infecção de grãos por *Stenocarpella maydis*. Teste de sanidade *Blotter test* em quatro híbridos de milho, safra 2016/17, UFLA. Primeira colheita (março/2017) e segunda colheita (maio/2017) com inoculação de *Fusarium verticillioides* (Fv) e *Stenocarpella maydis* (Sm) e sem inoculação, controle (C).

COLHEITA 1 (Sm)		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	1,33 Ab	0,00 Ab	97,48 Aa
DKB390	0,00 Ab	0,00 Ab	84,89 Ba
P4285	0,00 Ab	0,00 Ab	100,00 Aa
RB9077	0,00 Ab	0,00 Ab	88,00 Ba

COLHEITA 2 (Sm)		INOCULAÇÃO	
Híbrido	C	Fv	FvSm
AG7088	0,44 Bb	4,00 Bb	81,78 Ba
DKB390	0,00 Bb	0,00 Bb	95,11 Aa
P4285	0,00 Bb	0,00 Bb	82,22 Ba
RB9077	0,44Bb	0,00 Bb	98,22 Aa

*Médias maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste SCOTT-KNOTT. Fonte: Do autor (2018).

Quanto à severidade de *Stenocarpella maydis* em grãos colhidos na segunda época não houve diferença significativa nos valores de incidência entre híbridos nos tratamentos com *F. verticillioides* (Fv) e controle (C). Entretanto, na condição de inoculação associada, FvSm, todos os híbridos apresentaram alta severidade do patógeno, sendo que os maiores valores foram observados em grãos dos híbridos DKB390 e RB9077, considerados susceptíveis (TABELA 12).

Portanto, foi observada alta severidade do patógeno nas duas épocas de colheita quando as espigas foram inoculadas com os dois fungos associados (FvSm), o que comprometeria a comercialização destes grãos para a indústria provavelmente devido a redução da qualidade qualitativa e quantitativa destes grãos, principalmente, na qualidade nutricional. Independentemente da época de colheita, os grãos inoculados com os dois fungos ficaram totalmente apodrecidos. Certamente, a infecção do patógeno *S. maydis* foi mais severa devido às condições ambientais e pelo rompimento das barreiras de resistência das plantas pela primeira inoculação com os fungos *F. verticillioides*.

Esta variação nos resultados de severidade nos genótipos analisados foi condizente com os resultados de incidência obtidos por Mário, Gozuen, e Juliatti (2017) para a classificação de híbridos resistentes e susceptíveis. Os autores avaliaram diversos materiais em regiões diferentes do estado de Minas Gerais com a inoculação de espigas de milho

usando os inóculos dos patógenos *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora*. Os resultados da análise conjunta para cada região permitiram a classificação dos híbridos de acordo com a incidência de grãos apodrecidos. No geral, houve variação na resistência dos híbridos por região mostrando um efeito ambiental na expressão da característica. Os autores observaram, por meio da análise conjunta, que na região do Cerrado houve maiores porcentagens de incidência de grãos apodrecidos cujos valores variaram de 9,52 a 13,16%. Neste mesmo estudo, observou-se menor incidência do fungo *S. maydis*, variando de 10 a 13%. Independentemente da região e do meio ambiente, uma prevalência de *S. macrospora* em comparação com *S. maydis*, foi encontrada em amostras de grãos ardidos.

Para *Stenocarpella spp.* os valores de incidência de podridão de grãos mostraram distribuição contínua, indicando a possibilidade de que esta resistência seja condicionada por mais de um fator (MÁRIO; GOZUEN e JULIATTI, 2017). Múltiplos aspectos genéticos são responsáveis pela resistência à podridão de grãos quando a podridão é causada por *Stenocarpella spp.* (OLATINWO et al. 1999, GUTIEREZ, 2008).

Marques et al. (2009) observaram a incidência de *Fusarium spp.* em amostras de grãos de uma lavoura comercial de milho implantada com o híbrido 2B710. Em grãos com 18 % de teor de água houve a incidência de 6 % em condições naturais de inoculação. Nesses casos, a podridão da espigas de *Fusarium* tende a diminuir com a maturidade fisiológica do milho, quando a umidade dos grãos começam a diminuir (BREWBAKER, 2014). Não houve diferença significativa entre as duas épocas de colheita para a severidade do fungo *F. verticillioides*. Independentemente do tratamento a severidade foi constante entre todos os híbridos variando de 3,7 % a 6,9 %. Ressalta-se que para o híbrido P4285 foi observada menor severidade nos grãos da primeira colheita quando inoculado com os dois fungos com valor de 1,8 %. Houve severidade de *F. verticillioides* nos grãos com 36 % e 18 % de teor de água após a maturação fisiológica. Vale lembrar que neste período houve aumento da umidade relativa do ar e redução da precipitação pluviométrica e da temperatura (GRAFICO 1).

Provavelmente, os resultados obtidos com valores expressivos de severidade de grãos ardidos em grãos de híbridos da categoria resistente podem ser atribuídos à pressão de inóculos aplicados diretamente no estilo estigma das espigas, podendo romper as barreiras físicas e bioquímicas de defesa da planta contra a infecção destes patógenos e pelo fato de não ter sido realizado o controle químico com fungicidas. Segundo Brito et al. (2012), o controle de doenças foliares do milho por meio da aplicação de fungicidas também contribui para a redução na incidência de grãos ardidos.

Portanto, por meio do teste de sanidade (*Blotter test*) foi possível diagnosticar e identificar, em laboratório, os fungos que estão incidindo sobre os grãos dos híbridos. Isto permitiu, além de uma melhor avaliação da resistência dos materiais aos fungos causadores de podridões de espigas, estudar a reação a cada espécie de fungo separadamente (MARIO; REIS, 2001).

CONCLUSÕES

Para o híbrido RB9077, classificado como susceptível aos fungos que causam grãos ardidos, foi observada maior produtividade.

Os sintomas de grãos ardidos foram observados em todos os híbridos testados, independentemente das características destes ou tipo de inoculação.

Houve maior infecção dos grãos de milho pelo fungo *S. maydis* nos híbridos considerados de baixa resistência DKB390 e RB9077.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4th ed. New York: Academic, 1997. 635 p.
- ANDRADE, F. et al. Intercepted radiation at flowering and kernel number in maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 1, p. 92-97, 2000.
- BENSCH, M. J.; VAN STADEN, J.; RIJKENBERG, J. H. F. Time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, n. 4, p. 265-269, 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, 2009. 200 p.
- BRASIL. Portaria n. 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. **Diário oficial da União**, Brasília, n. 72, 1996
- BREWBAKER, J. L. Comunicação pessoal. In: Gibberella and Fusarium Ear Rots of Maize in Hawai'i. Department of Plant and Environmental Protection Sciences. **Plant Disease**. Saint Paul, 2014.
- BRITO, A. H. et al. Avaliação da severidade da Cercosporiose e rendimento de grãos em híbridos comerciais de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 7, n. 1, p. 19-31, 2008.
- BRITO, A. H. et al. Controle químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, n. 1, p. 49-59, 2012.
- CASA, R. T. et al. Efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 137-142, 2007.
- CASA, R. T. et al. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos de híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 33, n. 4, p. 353-357, 2007.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. da S.; PINTO, N. F. J. de A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Circular técnica, 83).
- CLEMENTS, M. J. et al. Evaluation of inoculation techniques for Fusarium ear rot and fumonisin contamination of corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 147-153, 2003.
- CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. SAFRA 2016/17. v. 4, n. 9, 2017.
- COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. **Cultivo do milho. Sistemas de Produção**, 2. Versão Eletrônica, 5^a ed, 2009. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.htm>. Acesso: 27/01/2016.
- DODD, J. L. The role of plant stresses in development of corn stalk rots. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 533-537, 1980.

DUARTE, R. P. et al. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 4, p. 112-122, 2009.

FARIA, M. A. V. de R. et al. Qualidade fisiológica de sementes de milho colhidas em diferentes estádios de “linha de leite”. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2002.

FERREIRA, D. F. **SISVAR Sistemas de análises de variância para dados balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Versão 4.3. Lavras: UFLA/DEX, 2002.

FREITAS, M. B. et al. Produtividade e incidência de grãos ardidos em híbridos de milho cultivados no Sudoeste de Goiás. **Agrarian**, [s. l.], v.2, n.4, p.73-81, 2009.

GUTIÉRREZ, H. I. **Mapeamento de QTLs para resistência a grãos ardidos causados por diplodia (Stenocarpella Sp.) em milho (Zea Mays L.)**. 2008. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

HORN, D. et al. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 77-85, 2006.

JULIATTI, F. C.; BRANDÃO, A. M. Cercosporiose em milho (*Cercospora zeae-maydis* Tehon & Daniels) afeta plantios de milho no cerrado brasileiro. Uberlândia: UFU/ Syngenta seeds. 2000. (Boletim técnico informativo).

KÖPPEN, W. **Classificação climática de Köppen-Geiger**. 1900. Disponível em: https://portais.ufg.br/up/68/o/Classifica___o_Clim__tica_Koppen.pdf. Acesso em: 25 de março de 2016.

MADDONI, G. A. et al. Plant population density, row spacing and hybrid effects on maize canopy architecture and light attenuation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p. 183-193, 2001.

MARCONDES, M. M. **Incidência de podridão de colmo e grãos ardidos em híbridos de milho sob diferentes densidades de plantas e épocas de colheita**. 2012. 62 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Centro Oeste, Unicentro, Guarapuava. 2012.

MÁRIO, J. L., GOZUEN, C. F.; JULIATTI, F.C. *Stenocarpella macrospora* and *Stenocarpella maydis* in the cerrado and southern brazil regions. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 33, n. 1, p. 76-87, 2017.

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

MARIO, J. L.; REIS, E. M.; JULIATTI, F. C. Three inoculation methods for screening corn germplasm to white ear rot resistance. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 362-366, 2011

MARQUES, O. J. et al. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum-Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009.

MCKINNEY, R. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 5, p. 195-218, 1923.

MENDES, M. C. et al. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. **Ambiência**, Guarapuava, PR, v. 8 n. 2 p. 275-292, 2012

MENDES, M. C. **Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a grãos ardidos em híbridos de milho**. 2009. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MUNDSTOCK, C. M.; SILVA, P. R. F. **Manejo da cultura do milho para altos rendimentos de grãos**. Porto Alegre: Evangraf, 2005.

OLATINWO, R. et al. Inheritance of resistance to *Stenocarpella macrospora* (Earle) ear rot of maize in the mid-altitude zone of Nigeria. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 6, p. 535-543, 1999.

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

PINTO, N. F. J. de A.; **Grãos Ardidos em Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo , 2005. (Circular Técnica 66).

PINTO, N. F. J. de A.; VARGAS, E. A.; PREIS, R. A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 33, n. 3, p. 304 - 306, 2007.

REID, L. M. et al. Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium subglutinans* inoculated maize ears. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 24, n. 2, p. 162-167, 2002.

REID, L.M.; HAMILTON, R. I. Effects of inoculation position, timing, macroconidial concentration, and irrigation on resistance of maize to *Fusarium graminearum* infection through kernels. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 18, n. 3, 279-285, 1996.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Graphel, 2004. v.2, p. 20-47.

REIS, E. M.; CASA, R.T. Controle de doenças fúngicas na cultura do milho, em plantio direto, no sul do Brasil. In: Borges, G. & Borges, L.D. (Eds.) **Seminário sobre tecnologia de produção e comercialização do milho**. Passo Fundo, RS. Resumo de Palestras. Editora Aldeia Norte, Passo Fundo, RS. 2000. pp. 62-71.

RIBER KWS SEMENTES. **Catálogo 2015/2016**. Disponível em: <http://www.riberkws.com/public/pdf/CatalogoMilho.pdf>. Acesso em: fev 2018.

SANTIN, J. A. et al. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 182-192, 2004.

SHURTLEFF, M. C. Compedium of corn diseases. St. Paul: **American Phytopathological Society**, 1992. 105 p.

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

SPAGNOLLO, E.; WORDELL FILHO, J. A.; NESI, C. N. Produtividade, incidência de podridões de colmo e qualidade de grãos de milho cultivados sob diferentes arranjos espaciais e densidades de plantas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 15, n. 2, p. 109-117, 2016.

WORDELL FILHO, J.A.; SPAGNOLLO, E. Sistema de cultivo e doses de nitrogênio na sanidade e no rendimento do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 199-205, 2013.

CAPÍTULO 2

QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE GENES ASSOCIADOS A MECANISMOS DE DEFESA CONTRA FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO DE GRÃOS EM MILHO

RESUMO

Nos últimos anos tem-se observado uma grande incidência de fungos causadores de “grãos ardidos” na cultura do milho em todo Brasil, sendo o principal deles o *Fusarium verticillioides*. A alternativa mais eficiente e competitiva de controle desta doença consiste na utilização de híbridos de milho resistentes ao patógeno. O objetivo nesta pesquisa foi investigar a expressão de genes associados aos mecanismos de defesa contra os patógenos causadores de podridão de grãos. Dois híbridos comerciais de milho, sendo um resistente e o outro susceptível a podridão de grãos conhecida como grãos ardidos, foram utilizados neste experimento. Quando do florescimento das plantas foram realizadas inoculações de *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* mais o tratamento controle, sem inoculação. A colheita dos grãos foi realizada em duas épocas, a primeira em março e a segunda em maio. As espigas foram colhidas e os grãos homogeneizados e submetidos à análise proteômica e a transcriptômica, sendo essa última por meio da técnica de PCR em tempo real. *Primers* associados aos genes alvos foram testados e selecionados pelo teste de eficiência. Ocorreu maior expressão das proteínas resistentes ao calor em grãos do híbrido resistente P4285. Não houve expressão de proteínas resistentes ao calor nos híbridos quando inoculados com os fungos associados. Pela análise de expressão de transcritos foi observado que os níveis de expressão do gene *LOX 8* em grãos do híbrido resistente P4285 foi maior que no híbrido susceptível DKB390 indicando estes genes como fortes candidatos para seleção de materiais com resistência aos fungos causadores de podridão de grãos.

Palavras chave: grãos ardidos; LEA; qPCR; *Zea mayze*

ABSTRACT

In recent years, a large incidence of fungi causing "moldy grains" has been observed in the maize crop throughout Brazil, the main being *Fusarium verticillioides*. The most efficient and competitive alternative to control this disease is the use of pathogen resistant maize hybrids. The objective of this research was to investigate the expression of genes associated with defense mechanisms against pathogens causing grain rot. Two commercial corn hybrids being one resistant and the other susceptible to grain rot known as moldy grains were used in this experiment. When the plants were flowering, inoculations of *Fusarium verticillioides* and *Stenocarpella maydis* plus control treatment were performed without inoculation. Grain harvesting was carried out at two harvest times. The spikes were harvested and the grains homogenized and submitted to proteomic analysis and transcriptomy, the latter being by means of the real-time PCR technique. Primers associated with target and endogenous genes were tested and selected by the efficiency test. Higher expression of the heat-resistant proteins in grain of the resistant hybrid P4285 occurred. There was no expression of heat-resistant proteins in the hybrids when inoculated with the associated fungi. By expression analysis of transcripts it was observed that the expression levels gene of LOX 8 in grains of the resistant hybrid P4285 was higher than in the susceptible hybrid DKB390 indicating these genes as strong candidates using the selection of materials with resistance to fungi causing grain rot.

Keywords: moldy grains; LEA; qPCR; Zea mayze

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado uma das mais importantes e antigas culturas agrícolas, caracterizado pela sua forma de utilização que vai desde a alimentação de humanos e animais até a indústria de alta tecnologia.

A produtividade crescente desse grão no Brasil pode ser atribuída aos avanços de tecnologias disponíveis aos agricultores. No entanto, além da produtividade, boas características sanitárias dos grãos são fundamentais para atender às demandas da indústria.

Com a ampla diversidade de épocas de semeadura nas diferentes regiões de cultivo, a cultura fica no campo quase o ano todo, o que facilita a sobrevivência e a disseminação de patógenos, podendo causar a morte de plântulas, podridão de raízes, de caules, de espigas e grãos.

As podridões de espiga e os grãos ardidos são causados por patógenos que podem afetar o rendimento da cultura, diminuindo a qualidade e o peso dos grãos. A incidência destes patógenos nos grãos de milho ainda pode estar associada à produção de micotoxinas. Os principais fungos toxigênicos predominantes na cultura do milho são do gênero *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Stenocarpella*. Dentre estes, merecem destaque o *Fusarium verticillioides* e o *Stenocarpella maydis* os quais infectam colmos, espigas e consequentemente os grãos, podendo inviabilizar a comercialização destes.

Para o manejo adequado da podridão rosada causada por *F. verticillioides* e podridão branca, doença causada por *Stenocarpella maydis* é necessário o conhecimento dos mecanismos de defesa da planta contra estes patógenos.

O sistema imunológico das plantas é composto de duas camadas de receptores (DODDS e RATHJEN, 2010). A primeira camada confere resistência basal à maioria dos patógenos "possíveis". A imunidade basal é conferida por receptores na face externa da célula hospedeira que reconhecem estruturas microbianas conservadas, como a flagelação de bactérias ou a componente de parede celular fúngica quitina. Os microrganismos precisam ultrapassar esta primeira camada de defesa com um conjunto correspondente de efetores de virulência para invadir uma célula hospedeira. Por exemplo, a proteína RIN4 de *Arabidopsis* é um regulador mestre da defesa basal e é o alvo de várias proteínas efetoras bacterianas (MACKEY et al. 2002). O segundo nível de receptores de defesa consiste de receptores intracelulares pertencentes à família conservada de proteínas repetidas ricas em leucina (NLRs), que reconhecem moléculas efetoras específicas.

As plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares como um mecanismo de resposta, e muitas dessas alterações podem estar diretamente relacionadas com defesa e proteção (DE WIT, 2007). A cascata de sinalização envolve entre outras moléculas, o ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA), o ácido jasmônico (AJ) e seu metil ester, metil jasmonato (MeJa) e o etileno (ET), como principais compostos capazes de induzir a expressão de muitos genes relacionados à defesa por meio de rotas diferentes (PERVIEUX et al., 2004; CAO et al., 2011).

Sabe-se que uma rota metabólica de defesa vegetal muito importante na defesa contra estresses bióticos, é denominada rota octadecanoide, a qual culmina com a produção do ácido jasmônico, um fitohormona relacionado ao estresse vegetal que ativa muitas respostas de defesa (Soares e Machado, 2007).

Resultados de expressão gênica foram obtidos por Shu et al. (2017) em um estudo com objetivo de identificar novos genes candidatos de resistência, caracterizando sua expressão temporal em resposta à infecção e comparando a expressão desses genes com genes conhecidos por serem associados à defesa da planta. A colonização fúngica e as alterações da transcrição em grãos inoculados com cada fungo foram monitoradas às 4, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hpi). Os autores observaram que vários genes que codificam as reductases de ácido 12-oxo-fitodienoico do milho (OPRs) e lipoxigenases (LOXs) foram diferencialmente expressos em sementes de milho em resposta a fungos.

Pereira et al. (2017) analisaram a expressão quantitativa relativa do gene LOX8, que codifica para um tipo de lipoxigenase, os autores afirmaram que houve a diferenciação da linhagem endogâmica 83, os mais vulneráveis a podridão de espiga em relação aos outros; no entanto, neste caso, maior expressão do gene foi observado. As lipoxigenases catalisam reações de incorporação de oxigênio em ácidos graxos livres na cadeia de carbono que têm óxidos lipídicos como produto, como o ácido jasmônico e metil-jasmonato, envolvidos na comunicação inter e intracelular e, sobretudo, na o mecanismo de defesa das plantas.

A identificação de regiões causais associadas à resistência a *Fusarium verticillioides* pode ser útil para entender mecanismos de resistência e ser utilizada em programas de melhoramento. O estudo de associação genômica ampla (GWAS) foi conduzido para identificar marcadores candidatos associado à resistência à podridão de orelha causada pelo fungo *F. verticillioides*. Um total de 242 linhagens de milho foram genotipadas com 23.153 marcadores DArT-seq. Um total de 12 DArTs foi associado à resistência à podridão auricular. Alguns DArTs foram localizados próximos a genes com funções diretamente relacionadas à resistência à podridão de espiga, como um gene responsável pela resposta imune inata que

pertence à classe de receptores NBS-LRR. Alguns marcadores também foram intimamente associados a genes que sintetizam fatores de transcrição (*nactf11* e *nactf61*), genes responsáveis pelo processo de oxidação-redução e atividade da peroxidase. Estes resultados foram importantes, uma vez que alguns marcadores candidatos podem apresentar relação funcional com a resistência à podridão de espiga no milho (DE JONG et al. 2017)

Neste contexto, os objetivos neste trabalho foram investigar a expressão de genes associados a defesa da planta contra a infecção dos patógenos *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis* em genótipos de milho com diferentes níveis de resistência à podridão de grãos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em área experimental e no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, cujas coordenadas são latitude 21°14'S, longitude 40°17'W e altitude de 918,8 m. Esta região apresenta clima tipo Cwb (clima temperado marítimo/clima tropical de altitude - regiões serranas) da classificação de Koppen (1900). A temperatura média anual é de 19,4°C, a pluviosidade se distribui, principalmente de outubro a abril, com valores médios anuais de 1529,7 mm.

Foram utilizados dois híbridos comerciais de milho com diferentes níveis de resistência a podridão de grãos conhecida como grãos ardidos. As informações relativas à resistência dos materiais a grãos ardidos foram passadas por profissionais que trabalham na área (TABELA 13).

Tabela 13 - Híbridos de milho resistentes e susceptíveis à podridão de grãos selecionados para os testes de campo e para as análises moleculares.

Resistente			Susceptível		
ID	Híbrido	Empresa	ID	Híbrido	Empresa
R1	P 4285 YH	Pioneer	S1	DKB 390 Pro2	Monsanto

ID: identificação; R1: resistente 1; R2: resistente 2; S1: suscetível 1; S2 suscetível 2; AG: Agrocere; P: Pioneer; RB: Riber; DKB: Dekalb; YH: Optimum® Intrasect®; Pro: resistente a lagartas; Pro 2: resistente a todos os tipos de lagartas e ao glifosato.

Sementes de cada híbrido foram semeadas em 40 linhas espaçadas de 0,6 m em novembro de 2016 com estande de população de plantas recomendado para estes híbridos de 60.000 plantas por hectare conforme recomendações técnicas das empresas produtoras de

sementes. No total, foram utilizadas quatro parcelas com oito linhas para cada híbrido com a realização de duas colheitas em épocas diferentes. Sendo assim, foi necessário separar quatro linhas por tratamento, cada linha por repetição com 3,6 m². 30 espigas de cada uma das 8 linhas das parcelas úteis foram inoculadas. Das quatro parcelas de cada híbrido foram inoculadas 8 linhas com *Fusarium verticillioides*, oito linhas com os dois fungos associados *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* e duas parcelas não foram realizadas inoculações. Todas as inoculações foram realizadas sempre no final do dia, quando a temperatura se encontrava mais baixa.

A semeadura foi realizada manualmente em novembro de 2016. A adubação de plantio foi de 400 Kg ha⁻¹ da formulação comercial 8-28-16. A adubação de cobertura foi realizada com a aplicação de 300 kg ha⁻¹ da formulação comercial 30-00-20 entre os estádios V4 e V5. Os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendação agrônômica para a cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3x2 sendo dois híbridos, inoculações com *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* e tratamento sem inoculação e duas épocas de colheita das espigas.

Para o processo de inoculação, foi usado o isolado de *Fusarium verticillioides* F425 com origem de genótipos de milho cultivados na cidade de Sinope, estado de Mato Grosso, sendo criopreservado na Micoteca da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas - MG. O isolado de *Stenocarpella maydis* Sm290 não tem origem definida e foi cedido pela Micoteca da UFLA. Primeiramente foi preparado o meio de cultura BDA (Batata-dextrose-agar) conforme protocolo (ANEXO A) para a replicação dos fungos *F. verticillioides* e o meio Aveia ágar – Oatmeal Agar (AO) para os fungos *S. maydis* (ANEXO B). Logo em seguida os isolados foram repicados em capela de fluxo e colocados em placas de petri para a produção do inóculo. As placas contendo os meios e os fungos repicados foram devidamente lacradas e incubadas em câmaras do tipo BOD com temperatura ajustada para ±27 °C e fotoperíodo de 12 horas. O crescimento e desenvolvimento dos fungos ocorreram durante 14 dias para os fungos da espécie *verticillioides* do gênero *Fusarium* e 20 dias para *S. maydis*.

Os conídios de *F. verticillioides* e de *S. maydis* foram suspensos em água destilada e a contagem dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer, obedecendo à quantidade ideal de inóculos. A concentração da suspensão dos fungos *F. verticillioides* foi de 1 x 10⁵ conídios mL⁻¹ e para *S. maydis* foi de 1 x 10⁶ conídios mL⁻¹. Foram aplicados 5 mL, de ambos, nos estilos estigmas das espigas através de seringa e agulha. A inoculação de *F. verticillioides* foi realizada 15 dias após todas as plantas da parcela terem emitido o estilo-estigmas (Bensch et

al. 1992; Reid e Mather 1996; Clements et al. 2003). Cinco dias após a inoculação com *F. verticillioides* foi realizada a inoculação de *S. maydis*, ou seja, 20 dias após todas as plantas terem emitido o estilo-estigma. Todas as inoculações foram realizadas com seringas e agulhas com penetração pelos estiloestigmas das espigas.

As espigas de milho foram colhidas manualmente, em duas épocas diferentes, a primeira em março e a segunda em maio, simulando as diferentes épocas de colheitas realizadas pelos produtores de grãos deste cereal. A primeira colheita de espigas foi realizada 47 dias após a inoculação dos patógenos em quatro das oito linhas de cada parcela para cada híbrido quando os grãos se apresentavam com 36% de teor de água. A segunda colheita de espigas das linhas remanescentes foi realizada 90 dias após a inoculação dos patógenos quando os grãos estavam com 18 a 20% de teor de água.

As espigas de milho das duas colheitas foram acondicionadas em secadores de gaveta com temperatura de 35°C até atingir 13% de teor de água. Após a secagem, os grãos foram beneficiados manualmente, amostras compostas contendo 1000 gramas de grãos de cada tratamento foram coletadas e encaminhadas para o Laboratório Central de Sementes onde foram armazenadas em câmara fria com temperatura de 10 °C para análises posteriores.

Após a secagem, sub amostras dos grãos com 13% de teor de água de cada linha por tratamento para cada época de colheita foram separadas e então reservadas para as análises moleculares. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório Central de Sementes e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C em ultra freezer (*®Sanyo Scientific Biomedical*) no Laboratório Central de Sementes da UFPA.

A análise de proteínas resistentes ao calor foi realizada em grãos colhidos em duas épocas dos híbridos P4285 e DKB390 cujas plantas foram inoculadas no campo, conforme descrição anterior. Com o auxílio de um moinho o material foi moído mantendo a temperatura da amostra refrigerada. Do material moído foram pesados 100 mg de cada amostra, calculado o volume de tampão de extração a ser utilizado foi acrescentado 0,1% de β -mercaptoetanol do volume total de tampão de extração. Em seguida, acrescentou-se solução tampão (50 mM Tris-HCL pH 7,5; 500mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão de extração), e o sobrenadante foi transferido para micros tubos com volume de 1,5 mL. Os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm por 30 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram removidos para novos micros tubos e incubados em banho-maria a 85°C por 15 minutos e novamente centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente. Antes da aplicação no gel, 70 μ L de extrato foram retirados e transferidos para novos micros tubos e acrescentados 40 μ L de solução tampão da amostra (2,5mL de glicerol;

0,46g de SDS; 20 mg de azul Bromofenol). Os tubos foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos (BLACKMAN et al. 1991). As amostras do extrato com proteínas + tampão da amostra foram aplicadas volume de 50µL em cada canaleta em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 120 Volts e os géis corados em Coomassie Blue R 250 a 0,05%, durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% (ALFENAS, 2006).

2.1 Desenho e seleção dos *primers*

Para realizar a análise de expressão gênica relativa, por meio da qPCR, primeiramente foram identificados genes associados ao mecanismo de defesa da planta contra patogenicidade relacionada aos fitopatógenos *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* causadores de grãos ardidos e também genes que codificam enzimas responsáveis pela defesa da planta. Primeiramente, foi realizada uma busca por genes alvos relatados em trabalhos científicos e as sequências de nucleotídeos foram conferidas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) relacionadas com as características desejáveis.

As sequências nucleotídicas encontradas foram alinhadas por meio da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) com sequências depositadas no banco específico para milho, *Mayze GDB* (*Mayze Genect and Genomics Database*). Assim, foi possível realizar uma busca mais apurada dos dados conferindo-se cada uma das sequências e padronizando-as para o desenho de *primers*.

Após as análises dos genes alvos nos bancos de dados, iniciou-se o desenho dos *primers* por meio do programa *OligoPerfect™ Designer* disponível na página da *Thermo Fisher Scientific* conforme os parâmetros recomendados, como o tamanho do oligonucleotídeo que varia de 18 a 20 pares de bases (pb), porcentagem de Citosina e Guanina (CG), de 30 a 50% e aqueles com alta capacidade de formação de grampos (*hairpin*) e dímeros foram eliminados buscando otimizar a qualidade da reação de PCR.

Para verificar a qualidade dos pares de *primers* desenhados e a formação de dímeros, as sequências foram testadas no programa *OligoAnalyzer 3.1* disponível na página da *Integrated DNA Technologies* e na sequência encaminhadas para a síntese dos oligonucleotídeos (Tabela 14).

Os genes de referência utilizados foram Actina e GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

2.2 Análises da expressão relativa de transcritos por meio da PCR em tempo real

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório Central de Sementes, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas amostras compostas de grãos colhidos em duas épocas de colheita e oriundas do tratamento controle (sem inoculação), do tratamento com inoculação de *F. verticillioides* e do tratamento com a inoculação dos dois fungos associados *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis*.

A análise quantitativa da expressão gênica dos transcritos envolvidos no processo de resistência a grãos ardidos por meio da qPCR foi dividida em quatro etapas: Extração e Purificação do RNA dos grãos, Transcrição Reversa para síntese do cDNA, qPCR e análise dos resultados.

Tabela 14 - Pares de *primers* desenhados a partir das sequências gênicas depositadas no banco de dados Mayze GDB e NCBI relacionadas com a defesa da planta contra o ataque de fungos causadores de podridões de grãos.

ID MayzeGDB	Sequência 5' - 3'	Bases	Informações	Referência	ID NCBI
GRMZM2G472248_Fw	GCTGTGCCATGAGATGTGAC	20	<u>LEA 3.</u>	Caixeta (2012);	DQ244216.1
GRMZM2G472248_Rv	AGGAGGAGCACAAAGAGAGCA	20	<u>Proteína: B6TNY6 MAIZE (B6TNY6)</u>	Jia, J. (2006);	
GRMZM2G171383_F	CGAGCGTGATGTGGAAAAC	19	GATase1; Tipo 1 de glutamina amidotransferase; biossíntese de triptofano.	Caixeta (2012)	AFW58503.1
GRMZM2G171383_R	CGGTGGATGGATTACCAGTC	20			
GRMZM2G069095_F	TATGGCCTTGGTGGTTCTTC	20	H + pirofosfatase inorgânica	Caixeta (2012)	AFW70478
GRMZM2G069095_R	CTACCTTCCCCACAAGGTCA	20	H ₂ ppase	Yuge et al. (2008)	
GRMZM5G822137_F	TTCTTCTCAGCGATCCGTCT	20	Heavy-metal-associated domain HMA; O (HMA) é um domínio conservado que transporta ou desintoxicam metais pesados.	Bull e Cox (1994)	DAA55967.1
GRMZM5G822137_R	ATCCTTGGCAGTGAATCGAC	20			
GRMZM5G822137_Fw	GTCAAATGGGGACTTCCAA	20			
GRMZM5G822137_Rv	TCACACGGAAACAGAACAGC	20			
GRMZM2G092474_F	GCTCATCCAACTCACAGCA	20	Proteína precursora não caracterizada. Taumatina;	Fantazzini (2014) Alexandrov et al. (2009)	DAA57162.1
GRMZM2G092474_R	GAGGAGGAGAAGAGAGGACGA	21			
GRMZM2G092474_Fw	TGAACGCTCATCCAACTCA	20			
GRMZM2G092474_Rv	GAGGAGGAGAAGAGAGGACGA	21			
GRMZM2G080054_F	ATCGTTTCAGTTTGGGACCTG	20	TPA: proteína de super família de domínio de ligação HLH (Helix-loop-helix) putativa proteínas isoforma 2. Específicas de ligação ao DNA que atuam como fatores de transcrição.	Fantazzini (2014) Alexandrov et al. (2009)	DAA35990.1
GRMZM2G080054_R	TGAGCAGCATCACAAATCACA	20			
GRMZM2G080054_Fw	CTAAAGGTTGGTGGGTCGAA	20			
GRMZM2G080054_Rv	TGGCCTCCTCCTTATGAA	20			
GRMZM2G106748_F	GCTAGCACCTTCCTTCCTC	20	9-lipoxigenase e 9-hidroperóxido liase. Biossíntese de ácidos graxos;	Christensen et al. (2014)	DAA54790.1
GRMZM2G106748_R	ATGGCGATGTGGTTCTCAG	19			
GRMZM2G106748_Fw	GAGCTAGCACCTTCCTTC	20			
GRMZM2G106748_Rv	ATGGCGATGTGGTTCTCAG	19			
GRMZM2G104843_F	GTGTCCTCCTCGAGCTCATC	20	Enzima Linolenato lipoxigenase; Biossíntese de ácido jasmônico	Nemchenko et al. (2006) Pereira et al. (2017)	DAA37595.1
GRMZM2G104843_R	CCGTCTTGACGTCCTTCTTC	20			
GRMZM2G046804_F	AAAGGACACGAGCGCTTAAA	20	GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 1 isoforma 1.	Manjunath; Sachs, (1997)	AFW61325.1
GRMZM2G046804_R	TGGCGAGTAGAGGAGCTAGG	20			
GRMZM2G126010_F	GGGATTGCCGATCGTATGAG	20	ACTINA – Isoforma 3, HSP70	Lin et al (2011)	AFW81800.1
GRMZM2G126010_R	GAGCCACCGATCCAGACT	20			

Fonte: Do autor (2018)

2.3 Extração e purificação do RNA dos grãos de milho

Para as análises moleculares foram utilizados grãos dos dois híbridos, sendo P 4285 e resistentes à doença grãos ardidos e DKB 390 susceptível. Seis grãos de cada amostra composta dos tratamentos dos híbridos foram submetidos à maceração manual com auxílio de pistilos e cadinhos ou *mortar* usando nitrogênio líquido. O macerado da amostra biológica foi transferido para micros tubos tipo *Eppendorf* 1,5 mL e pesados em balança aferindo o seu peso para 100 mg e armazenados a temperatura de -80°C . Esse procedimento foi realizado três vezes para a obtenção das três amostras biológicas de cada tratamento. O reagente utilizado nas extrações de RNA foi o *Concert RNA Plant*[®] (*Invitrogen*), seguindo as especificações do manual do fabricante. Para mais informações, segue nos anexos deste documento o protocolo usado para a extração de RNA total de grãos de milho (ANEXO C).

A integridade e a pureza dos RNAs foram avaliadas em todas as etapas através de corridas eletroforéticas em géis de agarose 1,5 % e os perfis das bandas foram visualizados em um transluminador com luz ultravioleta (UV) usando *GelRed*[™] *Nucleic Acid Gel Stain*, 10.000 X no *mix* das amostras. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi TBE 1X (*Tris-Borato-EDTA*, 1X). As amostras de RNA também foram quantificadas por meio de leitura óptica em espectrofotômetro (*BioTek*[™] *Eon*[™] *Microplate Spectrophotometer*) medindo-se a absorvância a 260 e 280nm, observando a razão de comprimento de onda 260/280, cujos valores se encontraram na faixa de 1,8 a 2,0, o que indica extração de alta qualidade conforme indicação do manual do equipamento.

Seguindo o procedimento, para evitar qualquer contaminação com DNA, as amostras de RNA foram tratadas com DNase *Free* utilizando o *Kit DNase Turbo Free*[®] AMBIOM de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para comprovar a eficiência do tratamento das amostras com DNase foi realizada a *PCR* convencional. Como controle positivo foi utilizado uma amostra de DNA genômico de milho. O *primer* utilizado foi o correspondente ao gene constitutivo Ubiquitina. O resultado da *PCR* convencional foi obtido pela corrida eletroforética em um gel de agarose 1,5% corado com gel *red* onde foi possível visualizar através do transluminador que não houve ampliações de DNA nas amostras tratadas.

2.4 Transcrição reversa para síntese do cDNA

Após o processo de extração e purificação, os RNAs mensageiros foram utilizados como molde para a síntese de cDNA. Para a *PCR* foi utilizado o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* cDNA[®] da *Applied Biosystems*, seguindo as especificações do

protocolo recomendado pelo fabricante. As amplificações foram conduzidas em Termociclador *Axygen® Thermal Cycler* modelo *MaxyGene™ II*, programado com quatro passos sendo o inicial a 25°C por 10 min, seguido para 37°C por 120 minutos, 5 min a 85°C, finalizando com a temperatura de 4°C. A eficiência da síntese de cDNA foi comprovada por meio da eletroforese em gel de agarose conforme descrita anteriormente.

2.5 Teste de eficiência dos *primers* através da qPCR

Para a análise de eficiência e de expressão dos genes utilizou-se o aparelho *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*, com método de detecção via *SYBR Green*. Após obter os cDNAs, para determinar a concentração ideal da reação de PCR, foi construída uma curva de eficiência com diferentes concentrações de cDNA (1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125), foi selecionada a diluição 1:5 em função do resultado na eficiência de cada primer.

2.6 Expressão relativa

Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento sendo cada amostra biológica dividida em três repetições técnicas para cada gene em estudo. Os resultados foram normalizados usando o *Cycle Threshold (CT)* obtidos pela expressão dos genes de referência.

As condições térmicas da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e finalizando-se com 15 segundos a 95°C. Ao fim da ciclagem, uma curva de desnaturação de 60-95°C mostrou a especificidade da reação de *PCR*. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Fast Software (Versão 2.1)*. Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de *cDNA* (diluído 1:5), 0,4 µL de *primer forward/reverse* (10 µM), 5 µL de *Master Mix SYBR green (Applied Biosystems)* e 3,6 µL de água ultrapura, para um volume final de 10,0 µL/amostra. Os controles negativos e as curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises. Os dados analisados dos pares de *primers* foram à amplificação específica e padrão das amostras dos tratamentos (*CT Cycle Threshold = Cq Ciclos de quatificação*), a não amplificação das amostras controle negativo (NTC) e amplificação do inter-ensaio como controle positivo.

Após a amplificação pela PCR em tempo real, cada produto da amplificação foi analisado por uma curva de dissociação, método da curva padrão relativa, descrito no manual do equipamento. Deste modo, foi possível observar para cada gene e tratamento, que o produto amplificado não apresentou expressão iPESpecífica e/ou formação de dímeros de primer.

Os valores obtidos correspondentes aos níveis de mRNA's das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de mRNA's da amostra calibradora que é aquela de menor expressão. Após a obtenção dos dados brutos foram submetidos às análises.

Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse foram considerados: Cq (aumento exponencial do produto de PCR) do gene alvo e do gene de referência. A proporção de um gene alvo de uma amostra é expressa em contraste com um controle em comparação com um gene de referência. E_{alvo} é a eficiência de PCR em tempo real da transcrição do gene alvo; E_{ref} é a eficiência de PCR em tempo real de uma transcrição do gene de referência; ΔCq_{alvo} é o desvio Cq do controle - amostra do gene do gene alvo; ΔCq_{ref} = Desvio de controle do Cq - amostra da transcrição do gene de referência. O gene de referência pode ser um transcrito não regulado estável e seguro. Para o cálculo da quantificação relativa, as eficiências da PCR em tempo real individuais e o desvio de Cq (ΔCq) das transcrições investigadas devem ser conhecidos. As eficiências da PCR em tempo real foram calculadas, de acordo com o modelo matemático proposto por Pfaffl, (2001) conforme a equação abaixo:

$$\text{Quantificação relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta Cq_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Cq_{\text{referência}} (\text{controle} - \text{amostra})}}$$

Para calcular o desvio padrão (DESVPAD.P) dos resultados de expressão foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

onde x é a média de amostra $MÉDIA(\text{núm1}, \text{núm2}, \dots)$ e n é o tamanho da amostra.

O Erro padrão foi calculado da seguinte forma, resultado do desvio padrão dividido pela raiz do número total de amostras, neste caso, foram três amostras biológicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Expressão de proteínas resistentes ao calor

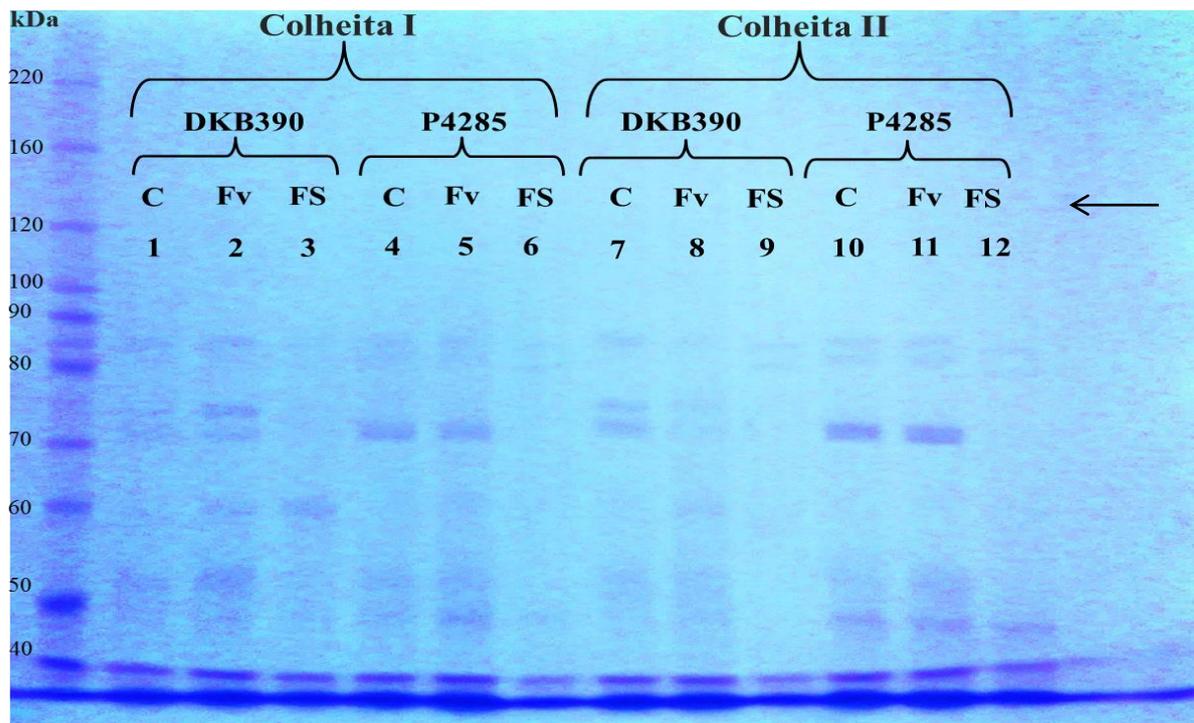
Conforme relatado no referencial teórico deste documento, as proteínas resistentes ao calor por sua natureza anfipática, essas proteínas são capazes de inibir a denaturação de

macromoléculas e estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse (BLACKMAN et al. 1995; Close, 1997).

Mendes et. al. (2012) investigaram a influência de proteínas resistentes ao calor, presentes em grãos de milho, sobre a resistência aos fungos que causam grãos ardidos. A ideia surgiu a partir dos resultados obtidos por Bezerra (1996) que associou a resistência de cultivares de feijão-de-corda a condições de estresse às proteínas resistentes ao calor.

Nesta pesquisa, as bandas polimórficas foram avaliadas em função dos pesos moleculares. Foram observadas variações, tanto no número quanto na intensidade das bandas entre os tratamentos, associados aos híbridos, inoculações com patógenos e época de colheita (FIGURA 2).

Figura 2 - Padrões eletroforéticos de proteínas resistentes ao calor em gel SDS PAGE em grãos de híbridos de milho. DKB390: híbrido susceptível; P4285: híbrido resistente; C: controle; Fv: *Fusarium verticillioides*; FS: *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*).



Fonte: Do autor (2018).

O padrão eletroforético das proteínas resistentes ao calor foi diferente para todos os tratamentos considerando as bandas de peso molecular entre 40 kDa e 90 kDa, evidenciando o polimorfismo entre estes. Foi observada diferença de expressão das proteínas em grãos do híbrido resistente P4285 em relação ao susceptível DKB390 em intensidade, a fração proteica próxima a 70 kDa principalmente naqueles colhidos na segunda época. Ressalta-se que para o

híbrido susceptível aparecem duas frações proteicas com a mesma intensidade próximas ao peso molecular de 70 kDa, enquanto para o híbrido resistente foi revelada apenas uma banda específica com o mesmo peso molecular. Isso foi observado principalmente no tratamento controle, sem inoculação e quando a inoculação foi realizada com o fungo *Fusarium verticillioides*.

Assim, houve maior expressão das proteínas resistentes ao calor nos grãos do híbrido resistente especificamente nos tratamentos controle e no tratamento inoculado com o patógeno *Fusarium verticillioides* quando os mesmos foram colhidos em duas épocas. Também foi observado uma banda, com peso molecular de 60 kDa em grãos do híbrido DKB390, colhidos na primeira época quando as plantas foram inoculadas com *Fusarium verticillioides* e com os dois patógenos (FS).

Pode-se inferir que os genes não foram expressos na inoculação FS devido os fungos *Stenocarpella maydis* inibirem a expressão destes genes de defesa. Bensch et al. (1992), verificou a germinação dos conídios de *S. maydis* com penetração e colonização da hifa do fungo inter e intracelular. A colonização foi acompanhada pela degeneração das paredes da célula, demonstrando haver atividade de enzimas. Qualquer agente físico ou químico capaz de estimular resposta de defesa em plantas é denominado indutor. Os indutores químicos podem ser desde carboidratos, proteínas/enzimas, glicoproteínas e outras substâncias liberadas pela parede celular vegetal durante a herbivoria do inseto, assim como substâncias químicas liberadas por patógenos (NURNBERGER, 1999; SMITH, 1996).

Fatores bióticos e abióticos, por meio de indutores, podem ativar vias de sinalização como espécies reativas de oxigênio (EROs), fragmentos de parede celular, dentre outros, que por sua vez irão reconfigurar o metabolismo vegetal, onde tais mudanças redirecionam os recursos para a tolerância ou a produção de compostos antinutritivos e tóxicos (DIEKE e HILKER, 2003; KESSLER e BALDWIN, 2002). Kessler & Baldwin (2002) relataram um tipo de defesa direta contra patógenos que compreende a resposta hipersensível (HR), eficaz quando a área comprometida é pequena, que envolve a morte programada de células (apoptose) situadas ao redor da infecção e a produção de compostos antimicrobianos que impedem a dispersão do patógeno. Frequentemente a HR é precedida da produção de uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio (ERO's) como o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ambos liberados local e sistemicamente), que podem contribuir com a apoptose.

Provavelmente, pode-se atribuir ao fato de não haver a expressão gênica no tratamento FS devido à pressão de inóculos aplicados diretamente no estilo estigma das espigas, podendo

romper as barreiras físicas e bioquímicas de defesa da planta contra a infecção destes patógenos. Klapproth e Hawk (1991) obtiveram maior nível de infecção com injeção da suspensão de esporos de *S. maydis* dentro da espiga.

Os resultados foram semelhantes aos observados por Mendes et. al. (2012) que observaram uma concentração das frações proteicas de peso molecular entre 40 e 60 kDa, em grãos de híbridos considerados resistentes aos fungos causadores de grãos ardidos em milho. Vale salientar, que foi possível observar bandas específicas presentes nos grãos dos híbridos considerados resistentes, mais especificamente de peso molecular de 50 kDa (FIGURA 2).

Bezerra (1996) estudando a influência da seca em diferentes estádios da germinação, para o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), também identificou cultivares mais resistentes a condições de estresse por meio deste marcador. Polimorfismo para essas proteínas também foi observado por Mann (2002) em sementes de algodoeiro de diferentes cultivares.

Existem estudos nos quais foi relatado que em grãos a evolução de *S. maydis* praticamente cessa quando a umidade de grãos atinge 21 a 22% (JULIATTI et al., 2007; CASELA et al., 2006; FANCELLI e DOURADO NETO, 2004).

Marcondes, (2012) observou redução da viabilidade do inóculo de *Fusarium* spp. da primeira para a segunda época de colheita, favorecida, provavelmente, pela redução na umidade dos grãos.

3.2 Análises dos Transcritos

Os 12 pares de *primers* dos genes alvos e mais dois pares de *primers* dos genes de referência GAPDH e Actina foram submetidos às análises de eficiência pelo método da curva padrão relativa por meio da técnica de RT-qPCR.

A partir dos resultados das eficiências dos *primers* foi possível selecionar aqueles com melhor eficiência, ou seja, aqueles com eficiência próxima de 100%. Portanto, para as análises de expressão gênica foram selecionados cinco *primers* dos genes alvos PRC - Proteínas Resistentes ao Calor, GATase I - Tipo 1 de Glutamina Amido Transferase, HMA - *Heavy Metal Associated* em português Domínio Associado a Metal Pesado, HLH - *Helix-loop-Helix*, proteína putativa isoforma e LOX 8 - Enzima Linolenato Lipoxigenase; Biossíntese de ácido jasmônico (JA). Os genes de referência utilizados foram GAPDH e Actina.

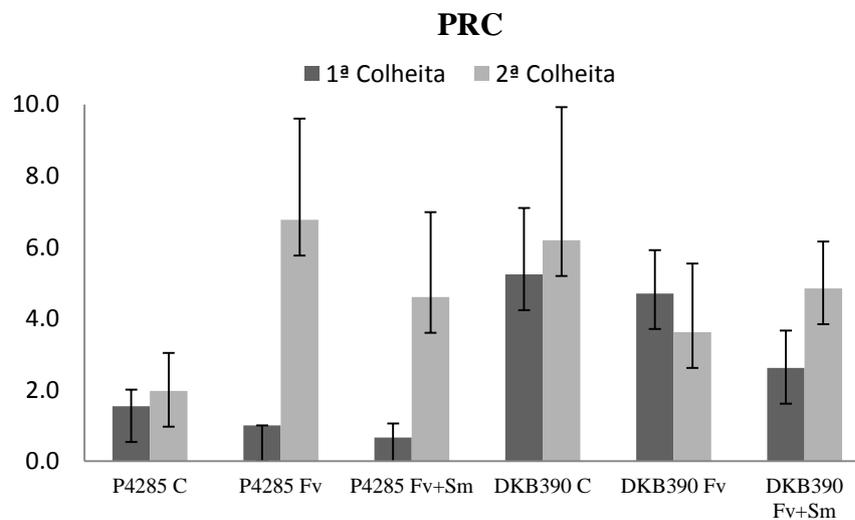
3.3 Expressão Relativa dos Transcritos

Para facilitar a análise dos gráficos de expressão relativa dos transcritos, os híbridos e as inoculações com patógenos foram incluídos no eixo *x* seguindo os períodos de colheitas e

no eixo y estão apresentados os valores da quantificação relativa. P4285 híbrido resistente, DKB390 híbrido susceptível com os tratamentos de inoculação C (controle, sem inoculação das espigas), Fv (com inoculação das espigas com o fungo *Fusarium verticillioides*) e Fv+Sm (com inoculação das espigas com os dois fungos *F. verticillioides* e *Stenocarpella maydis*).

A expressão do gene PRC – Proteínas Resistentes ao Calor dos grãos colhidos na primeira época de colheita do híbrido DKB 390 foi maior com quantificação relativa de 5,2 para o tratamento controle, sem inoculação (GRÁFICO 2).

Gráfico 2 - Quantificação Relativa do gene PRC (Proteínas Resistentes ao Calor) UFLA, Lavras/MG 2018.



Fonte: Do autor (2018).

Para o híbrido P4285, considerado como resistente a grãos ardidos obtiveram-se valores inferiores de expressão do gene PRC quando comparado ao observado ao híbrido DKB390, na primeira época de colheita independentemente dos tratamentos de inoculação. Também na segunda época de colheita e no tratamento de inoculação controle, observou-se maior expressão de PRC em grãos do híbrido DKB390.

Na segunda época de colheita, para a maioria dos tratamentos houve maior expressão deste gene quando comparada à observada em grãos colhidos na primeira época. Para o P4285 houve maior nível de expressão no tratamento Fv com Cq de 6,8. Também houve maior expressão do gene PRC quando o híbrido foi submetido à pressão de estresse no tratamento com os fungos associados Fv+Sm. Novamente, o híbrido DKB390 obteve maiores expressões relativas com a interação dos tratamentos e os valores de Cq (ciclos de quantificação) obtidos foram para o tratamento controle, 6,2, enquanto que para o tratamento Fv+Sm, 4,8 e quando inoculados apenas com *F. verticillioides* (Fv), 3,6. Neste sentido, é possível afirmar que o híbrido susceptível DKB390 apresentou maiores valores de expressão relativa do gene PRC

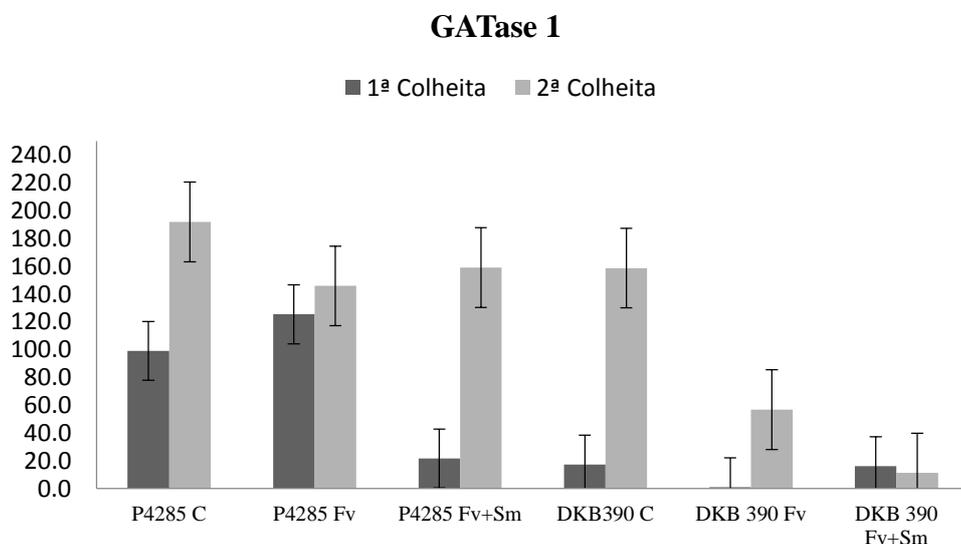
com e sem a inoculação dos fungos nas duas épocas de colheitas. O híbrido resistente P4285 obteve maior expressão relativa do gene PRC apenas quando submetido à inoculação com *F. verticillioides* (GRÁFICO 2).

De acordo com Amara et al. (2012) são vários os grupos de proteínas resistentes ao calor e há diversidade funcional entre esses grupos em milho. Estas proteínas funcionais desempenham papéis importantes na proteção de células da desidratação e do oxigênio ativo e no ajuste da pressão osmótica sob condições de estresse (CUSHMAN e BOHNERT, 2000; HASEGAWA et al. 2000; SEKI et al. 2002).

Andrade et al. (2013) realizaram um estudo de quantificação e caracterização da expressão de proteínas resistentes ao calor durante o desenvolvimento da semente de linhagens de milho com diferentes níveis de tolerância a alta temperatura de secagem. Foi observado maior expressão do gene PRC na fase LL3 (Linha de Leite 3) dependendo do genótipo utilizado. Certamente, a diferença observada nas expressões do gene PRC está relacionada aos níveis de resistência de cada híbrido. A qualidade dos grãos reduz com o aumento da colonização dos fungos e provavelmente o gene PRC permanece ativo enquanto a membrana celular se encontrar íntegra. Após a degradação celular das membranas e com a redução de água os níveis de expressão do gene diminuem.

Em geral, o nível da expressão relativa do gene GATase 1, tipo 1 de Glutamina Amido Transferase foi maior em grãos do híbrido P4285 nas duas colheitas. Para o híbrido DKB390, o gene foi mais expresso na segunda colheita comparada a primeira para o mesmo híbrido (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 - Quantificação Relativa do gene GATase 1 (tipo 1 de glutamina amidotransferase) UFLA, Lavras/MG 2018.



Fonte: Do autor (2018).

Para o híbrido P4285 na segunda colheita a expressão do gene GATase 1 foi alta para os três tratamentos, variando os valores de Cq de 145 a 192. Enquanto isso, em grãos colhidos na primeira época de colheita, a expressão do gene para o híbrido DKB390 foi baixa para os três tratamentos com nível de expressão quase nulo quando inoculado com *F. verticillioides*. Não houve diferença significativa na expressão relativa do gene para os dois híbridos no tratamento controle para a segunda época de colheita.

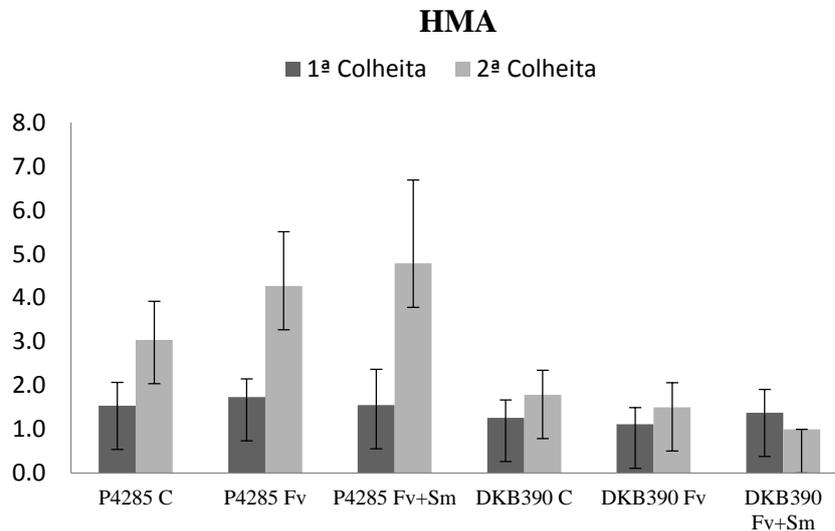
Recentemente, Kaur et al. (2012) elucidaram uma via adicional de degradação de glutatona (DUG; *L-c-glutamyl-L-cysteinyl-glycine*) em *Saccharomyces cerevisiae* em que Dug2p e Dug3p formam uma amidotransferase (GATase) que cliva a ligação c-glutamil. Uma dipeptidase Dug1p então cliva a cisteinil-glicina (Kaur et al., 2009). O caminho alternativo recentemente identificado, específico para fungos da degradação da glutatona, requer a participação de três genes, DUG1, DUG2 e DUG3. Dug1p mostrou-se funcionar como uma dipeptidase específica de Cys-Gly. Neste estudo os autores descreveram a caracterização de Dug2p e Dug3p. Dug3p possui um domínio funcional da glutamina amidotransferase (GATase) II que é de importância catalítica para a degradação da glutatona.

De fato, observando pela característica do híbrido, o gene GATase 1 foi diferencialmente expresso com alto nível de quantificação relativa no híbrido resistente P4285 alcançando valor de Cq de 192 em comparação com o híbrido susceptível DKB390. Entretanto, quando houve à expressão nos grãos da segunda época de colheita, que estavam no campo em condições adversas de umidade e temperatura. Outra informação importante para este gene foi à alta expressão em grãos, cujas plantas não foram inoculadas, o tratamento controle. Pode-se inferir que o gene está sendo expresso continuamente nos grãos em defesa da planta contra as condições de estresse.

Enquanto isso, sobre pressão de estresse quando da inoculação associada utilizando os dois fungos *F. verticillioides* e *S. maydis*, pode-se inferir que a degradação celular dos grãos reduziu o metabolismo e conseqüentemente a ação das enzimas e proteínas envolvidas na defesa da planta, principalmente para o híbrido DKB390.

Em relação ao gene HMA (*Heavy-metal-associated* – Domínio associado a metal pesado) em grãos colhidos na primeira época o nível de expressão do HMA foi baixo para os dois híbridos P4285 e DKB390, em todos os tratamentos, com valores da quantificação relativa entre 1,1 a 1,7, cujos os valores não diferiram significativamente (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 - Quantificação Relativa do Gene HMA (*Heavy-metal-associated* – Domínio associado a metal pesado) UFLA, Lavras/MG 2018



Fonte: Do autor (2018).

Na segunda época de colheita, houve maior expressão do gene nos grãos do híbrido P4285 embora não tenha havido significância estatística, maior expressão deste gene foi observada em grãos colhidos na segunda época, quando as plantas foram inoculadas com os dois fungos associados, FV+SM. Enquanto para o híbrido DKB390 houve baixa expressão independentemente dos tratamentos de inoculação.

O domínio HMA foi descoberto primeiro em animais; No entanto, as proteínas vegetais e de plantas também apresentam uma sequência central (M / L / IxCxxC) que contém duas cisteínas características e que está envolvida na ligação de metais pesados (Hung et al. 1998; Dykema et al. 1999).

O sistema imunológico das plantas é composto de duas camadas de receptores (DODDS e RATHJEN, 2010). A primeira camada confere resistência basal à maioria dos patógenos "possíveis". A imunidade basal é conferida por receptores na face externa da célula hospedeira que reconhecem estruturas microbianas conservadas, como a flagelação de bactérias ou a componente de parede celular fúngica quitina. Os microrganismos precisam desarmar esta primeira camada de defesa com um conjunto correspondente de efetores de virulência para invadir uma célula hospedeira. Por exemplo, a proteína RIN4 de Arabidopsis é um regulador mestre da defesa basal e é o alvo de várias proteínas efetoras bacterianas (MACKEY et al. 2002). O segundo nível de receptores de defesa consiste de receptores

intracelulares pertencentes à família conservada de proteínas repetidas ricas em leucina (NLRs), que reconhecem moléculas efetoras específicas.

A resposta de defesa baseada em NLR é muito mais forte do que a resistência basal e muitas vezes resulta na morte da célula hospedeira afetada. A percepção efetora por receptores imunes NLR ocorre diretamente ou indiretamente. O reconhecimento indireto pode ser alcançado quando os receptores NLR monitoram a atividade dos efetores sobre outras proteínas hospedeiras envolvidas na imunidade basal das plantas. Isto é referido como o modelo de "guarda". Um avanço sofisticado do modelo de "guarda" envolve proteínas de "indução". Em contraste com as guardas, as proteínas de indução não têm uma função na imunidade das plantas; Seu único papel é imitar alvos efetores e atrapalhar os efetores de virulência. Se um indutor é monitorado por um receptor NLR, a ligação efetiva ao indutor desencadeará uma resposta de defesa. Curiosamente, os indutores e as proteínas NLR monitoradoras de indutores às vezes são codificados pelo mesmo gene; estes são conhecidos como NLR de "domínio integrado" (NLR-IDs). Em dois estudos independentes recentemente foi descrita a análise funcional da proteína RRS1 de *Arabidopsis* NLR, que contém um domínio adicional dos fatores de transcrição WRKY (Sarris et al, 2015; Le Roux, et al. 2015).

Da mesma forma, as proteínas NLR RGA5 e Pik-1 de arroz contêm um domínio de metal pesado (HMA) que é alvo de vários efetores do patógeno *Magnaporthe oryzae* (CESARI et al. 2013; MAQBOOL et al. 2015).

No entanto, uma resistência mais durável pode ser alcançada com o conhecimento de domínios integrados: muito interessante, a proteína Pi21 de arroz, como RGA5 e Pik-1, também contém um domínio HMA (MAQBOOL et al. 2015).

A perda de Pi21 resulta em resistência durável (FUKUOKA et al. 2009), indicando que o gene Pi21 é um fator de susceptibilidade. Isso sugere que o domínio HMA é um alvo de um efetor de patógenos. Portanto, domínios integrados podem fornecer informações sobre fatores de susceptibilidade que podem servir como alvos para gerar mutações knock-out no hospedeiro que têm potencial para proporcionar resistência durável.

Um determinado gene HvFP1, inclui motivos de sequência contendo um domínio HMA e sinais de localização nuclear (NLS). O HvFP1 é induzido durante o estresse da seca ou a senescência da folha e após a exposição ao ácido abscísico (ABA) (BARTH et al., 2004).

A imunidade das plantas aos agentes patogênicos microbianos requer uma intrincada rede de sinalização cujos componentes permanecem pouco claros. Nos estudos desenvolvidos por Zhang (2015) foram isolados um novo gene de trigo, TaHIP1, que possui um NLS, um sítio de prenilação e um domínio HMA. As características moleculares do gene TaHIP1

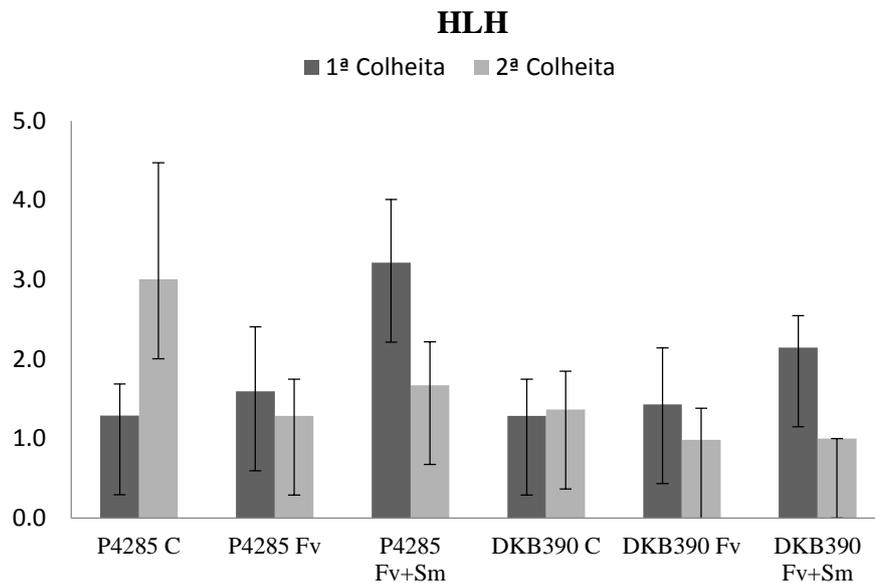
foram analisadas e os perfis de transcrição de sua resposta ao patógeno da ferrugem e outros estímulos abióticos foram determinados usando RT-qPCR. Os autores mostraram que o gene TaHIPPI1 foi preferencialmente expresso no caule e nas folhas, e que sua expressão nas folhas foi regulada pela seca e pelo estresse salino.

Okuyama et al. (2011) relataram a clonagem do gene de resistência Pia que confere resistência ao fungo *Magnaporthe oryzae* com um domínio HMA localizado no terminal C. O papel que este domínio pode desempenhar na resistência do arroz ao patógeno *M. oryzae* foi hipotetizado, mais tarde, por Kanzaki et al. (2013) que descobriram que os domínios HMA de várias proteínas de arroz pertencentes à família de proteínas de domínio associadas ao *Heavy Metal* (sHMAs) interagem com o efector de avirulência Avr-Pik de *M. oryzae*.

A alta similaridade desta família de proteínas (sHMAs) com o domínio CC da proteína R R-R do arroz, na interação com o patógeno, sugeriu que as proteínas sHMA do arroz poderiam estar envolvidas na geração de RNAi de sHMA e linhas de sobreexpressão em arroz (KANZAKI et al. 2013).

Houve expressão do domínio HLH (*Helix-loop-helix*) em todos os tratamentos. Em grãos do híbrido P4285 colhidos na primeira época houve aumento significativo da expressão deste gene quando as espigas foram inoculadas com os fungos *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* com valores mais significativos do que os observados, neste mesmo tratamento, em grãos do híbrido DKB390 Fv. No entanto, para o híbrido P4285, para a segunda época de colheita houve redução da expressão deste gene, quando as espigas foram inoculadas com os dois fungos associados, em comparação com a observada em grãos provenientes e espigas não inoculadas. Isto também foi observado para o híbrido DKB390 Fv (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 - Quantificação Relativa do gene Gene HLH (Helix-loop-Helix) UFLA, Lavras/MG 2018.



Fonte: Do Autor (2018).

Em geral, os níveis de expressão do domínio HLH nos grãos de milho foram maiores em grãos colhidos da primeira colheita, principalmente quando da inoculação associada dos dois patógenos, Fv+Sm.

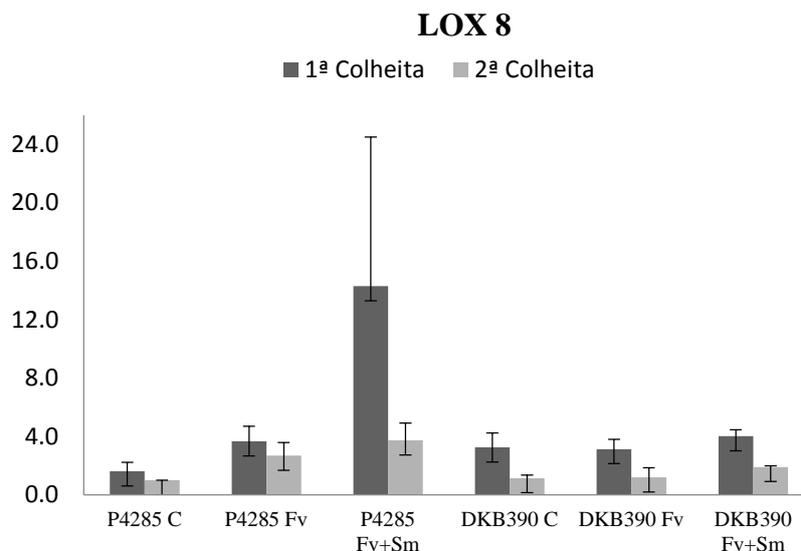
O domínio básico da *helix-loop-helix* (bHLH) é um motivo de aminoácido altamente conservado que define um grupo de fatores de transcrição. Foi originalmente descrito em animais (Murre et al. 1989) e logo descoberto em todas as principais linhagens eucarióticas. As proteínas que contêm um domínio bHLH (referidas como proteínas bHLH) estão envolvidas em diversos processos regulatórios. A família básica de fatores de transcrição de hélice-loop-hélice (BHLH) em plantas é um regulador onipresente e é altamente conservada, regulando diferentes tipos de genes durante a transcrição (HEIM et al., 2003). Suas funções incluem a regulação ou modulação das vias do metabolismo secundário, a diferenciação epidérmica e as respostas aos fatores ambientais nas plantas (RAMSAY e GLOVER 2005; CASTILLON et al. 2007). Certamente, após a infecção dos fungos uma série de enzimas é ativada alterando as vias do metabolismo. Assim, os fatores de transcrição de HLH regulam os genes envolvidos na defesa da planta o que causa a maior ou menor expressão deste gene.

Dois fatores de transcrição de bHLH (*Basic Helix-loop-Helix*), SB06G025040 e SB06G0254060 pertencem a um mecanismo regulador de antocianinas e foram associados aos níveis de antocianina medidos em condições de frio. Fatores de transcrição tais como *bHLH* são sugeridos para serem envolvidos em mecanismos de

adaptação a outros tipos de estresse como estresses bióticos (FENG et al. 2012; HUANG et al. 2013; PENG et al. 2013).

Em relação ao gene LOX 8 (Enzima Linolenato lipoxigenase; Biossíntese de ácido jasmônico JA). Para o híbrido P4285, classificado como resistente, houve aumento significativo da expressão deste gene, em grãos colhidos na primeira época quando da inoculação dos patógenos em espigas, principalmente quando inoculados os dois fungos *F. verticillioides* e *S. maydis*. Nos grãos deste híbrido, colhidos na segunda época, a expressão também foi aumentada quando as espigas foram inoculadas com os dois fungos. Ao comparar a expressão do gene em grãos dos dois híbridos avaliados verifica-se maior expressão nas do híbrido P4285, quando inoculados com os patógenos associados (GRÁFICO 6).

Gráfico 6 - Quantificação Relativa do gene LOX 8 (Enzima Linolenato lipoxigenase; Biossíntese de ácido jasmônico) UFLA, Lavras/MG 2018.



Fonte: Do autor (2018).

O aumento significativo desta expressão provavelmente está relacionado com a atividade das lipoxigenases que catalisam a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, o que origina compostos voláteis e o regulador traumatina, entre outros, envolvidos no crescimento, na maturação, na senescência e em respostas de defesa das plantas (BAYSAL e DEMIRDOVEN, 2007).

Christensen et al. (2014) aprofundaram os estudos das enzimas lipoxigenases presentes em sementes de milho quanto à defesa da planta contra patógenos. Nesta pesquisa os autores caracterizaram um novo gene 9-LOX ZmLOX12. Este gene está entre os genes conhecidos como LOX dicotiledôneas, com homólogos mais próximos encontrados

exclusivamente em outras espécies monocotiledôneas. ZmLOX12 é predominantemente expresso em mesocótilos em que é fortemente induzidos em resposta a infecção por *Fusarium verticillioides*. Este estudo demonstrou que esta única enzima específica monocotiledônea-9-LOX desempenha um papel fundamental na defesa contra *F. verticillioides* em diversos tecidos de milho e fornece a evidência genética de que ácido jasmônico (JA) é a principal defesa hormonal contra este patógeno. Com base nestas informações é possível relacionar com a maior expressão do gene LOX 8 nos grãos inoculados com os dois fungos para o híbrido P4285 na primeira colheita quando os grãos estavam com alto teor de água e suas membranas celulares íntegras.

Provavelmente, como o gene ZmLOX8 faz parte da via que fornece substratos para a síntese de ácido jasmônico (JA) (GAO et al. 2007), que é o principal fito hormônio diretamente envolvido na resistência das plantas aos fungos necrotróficos e aos insetos de mastigação (Yan et al. 2012), houve o aumento desta expressão do gene LOX 8 em resposta a infecção dos grãos.

Resultados de expressão gênica foram obtidos por Shu et al. (2017) em um estudo com objetivo de identificar novos genes candidatos de resistência, caracterizando sua expressão temporal em resposta à infecção e comparando a expressão desses genes com genes conhecidos por serem associados à defesa da planta. A colonização fúngica e as alterações da transcrição em grãos inoculados com cada fungo foram monitoradas às 4, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hpi). Os autores observaram que vários genes que codificam as reductases de ácido 12-oxo-fitodienoico do milho (OPRs) e lipoxigenases (LOXs) foram diferencialmente expressos em sementes de milho em resposta a fungos. A expressão de LOX4 e LOX13 aumentou em resposta a *Aspergillus flavus* a 24 hpi e em resposta a *F. verticillioides* a 72 hpi. Dois outros genes LOX, LOX10 e LOX11, foram regulados a 12 hpi em resposta à infecção por *A. flavus* e LOX10 foi regulado apenas a 24 hpi. Estes dois genes não foram diferencialmente expressos em resposta à infecção por *F. verticillioides*. A infecção por *A. flavus* aumentou a expressão de OPR2 a 24 e 48 hpi, e a expressão de ORP2, ORP3 e ORP5 foi regulada em resposta a *A. flavus* a 48 hpi e a *F. verticillioides* a 72 hpi.

Os resultados do mapeamento de um estudo de associação de genes realizado por Ogunola et al. (2017) sugerem que os genes do mapa ZmLOX1, 2, 5, 8, 9 e 10 dentro do QTL estão associados a uma redução nos níveis de aflatoxina. Os resultados de mapeamento são mais fortes para os genes ZmLOX8 e 10, ambos com 13 LOXs. Genes ZmLOX8 e ZmLOX10 são relatados para ter papéis diretos e indiretos na defesa da planta contra herbívoros e resistência fúngica, produzindo os substratos utilizados na biossíntese de JA e GLVs,

respectivamente (GAO et al. 2008). Este mesmos autores afirmam que há evidências de que ZmLOX8 e ZmLOX10 funcionam sinergicamente, pelo menos, em termos de biossíntese de JA induzida por feridas, embora os genes sejam encontrados em diferentes cromossomos no genoma do milho. Em relação ao gene ZmLOX8 a expressão ocorre em níveis muito baixos, em geral, mas ligeiramente mais expresso em níveis elevados em folhas mais velhas. Se ZmLOX8 é o gene específico para o QTL encontrado diretamente acima dele, o efeito fenotípico pode ser indireto.

Os níveis de expressão gênica em grãos colhidos nas duas épocas de colheita variaram de acordo com os tratamentos. De modo geral, comparando as duas colheitas, o gene PRC foi mais expresso no híbrido susceptível DKB390 no tratamento controle, sem inoculação. Em seguida, o gene GATase 1 foi mais expresso no híbrido resistente P4285 no tratamento controle. Os genes HMA, HLH e LOX 8 foram mais expressos no híbrido resistente quando inoculado com os dois fungos associados *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis*.

Portanto, analisando pela característica do híbrido e pela pressão da infecção do patógeno, a hipótese de que HMA, HLH e LOX 8 sejam genes marcadores moleculares associados as características de resistência deve ser estudada em outras experiências para aprofundar essas observações.

Zaccaron et al. (2017) realizaram recentemente uma pesquisa sobre a genômica comparativa de patógenos de podridão da espiga de milho buscando revelar como o fungo *Stenocarpella maydis* infecta o milho. Neste trabalho, o genoma de *S. maydis* foi sequenciado com as tecnologias de Biosciências da Illumina e do PacBio, e o primeiro conjunto de genoma de *S. Maydis* foi montado com uma estratégia híbrida personalizada. As análises genômicas comparativas forneceram novos conhecimentos sobre as características genômicas deste importante patógeno e destacaram mecanismos potenciais subjacentes à notória a sua gressividade. Finalmente, este trabalho forneceu recursos valiosos para novas pesquisas sobre a base molecular da patogênese em *S. maydis*, que, em última instância, promoverá o desenvolvimento de híbridos de milho resistentes.

Lanubile et al. (2017) elaborou uma revisão concentrada nos avanços significativos que foram feitos no desenvolvimento de informações transcriptômicas, genéticas e genômicas para o milho, os moldes de *Fusarium verticillioides* e suas interações nos últimos anos. As descobertas de estudos transcriptômicos foram usadas para delinear um modelo específico para a cascata de sinalização intracelular que ocorre em células de milho contra a infecção por *F. verticillioides*. Vários receptores de reconhecimento, tais como quinases tipo receptor e genes R, estão envolvidos na percepção de patógenos e desencadeiam redes de sinalização de

fluxo descendente mediadas por proteínas quinases associadas à mitógenos. Esses sinais podem ser orquestrados principalmente por hormônios, incluindo ácido salicílico, auxina, ácido abscísico, etileno e ácido jasmônico, em associação com a sinalização de cálcio, visando múltiplos fatores de transcrição que, por sua vez, promovem a ativação descendente de genes de resposta defensiva, como aqueles relacionados aos processos de desintoxicação, fenilpropanóides e vias metabólicas da oxilipina.

Nos níveis genéticos e genômico, são descritos vários marcadores quantitativos de loci (QTL) e marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único para resistência à podridão da orelha de *Fusarium* derivadas do mapeamento de QTL e estudos de associação de todo o genoma, indicando a complexidade desse traço poligênico. Todas essas descobertas contribuirão para identificar genes candidatos para resistência e para a aplicação de tecnologias genômicas para a seleção de genótipos de milho resistentes e acelerando uma estratégia de reprodução para contraste da doença, através de plantas resistentes aos patógenos produtores de micotoxinas.

A identificação de genes expressos quando da infecção de grãos de milho por fungos, é de substancial importância para o entendimento dos mecanismos que governam essa infecção, para que sejam desenvolvidos métodos de detecção precoce da defesa das plantas contra os patógenos causadores de podridão de grãos.

Shu et al. 2017 realizaram uma pesquisa para identificar novos genes candidatos de resistência, caracterizando sua expressão temporal em resposta à infecção e comparando a expressão desses genes com genes conhecidos por serem associados à defesa da planta. As sementes de milho responderam pela expressão diferencial do gene a cada fungo dentro de 4 horas pós-inoculação (hpi), antes que os fungos pudessem ser observados visualmente, mas mais genes foram diferencialmente expressos entre 48 e 72 hpi, quando a colonização fúngica era mais extensa. Este estudo forneceu uma análise abrangente da expressão gênica para cada patógeno *Aspergillus. flavus* e *F. verticillioides* durante a infecção de grãos de milho com a identificação de genes expressos no início e no final do processo de infecção.

CONCLUSÕES

Ocorreu maior expressão das proteínas resistentes ao calor em grãos do híbrido P4285, classificado como resistente aos fungos que causam grãos ardidos.

Houve menor expressão de proteínas resistentes ao calor nos grãos quando as espigas foram inoculadas com os fungos *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* associados.

Verificou-se maior expressão do gene LOX8 em grãos do híbrido P4285 classificado como resistente aos fungos que causam a podridão de grãos em comparação com a observada em grãos do híbrido DKB390, classificado como susceptível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDROV, N. N. et al. Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, p.179-194. 2009.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Editora UFV, 2006.
- AMARA, I. et al. Insights into Maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, n. 2, p. 312-329, 2012.
- ANDRADE, T. et al. Physiological quality and gene expression related to heat-resistant proteins at different stages of development of maize seeds. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 3630-3642, 2013.
- BAKER, J.; VAN DENNSTEELE, C.; DURE, L. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 277-291, 1988.
- BARTH, O. et al. Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, n. 2, p. 282-293, 2004.
- BAYSAL, T.; DEMIRDOVEN, A. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 4, p. 491-496, 2007.
- BENSCH, M. J.; VAN STADEN, J.; RIJKENBERG, J. H. F. Time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, n. 4, p. 265-269, 1992.
- BEZERRA, M. A. **Efeitos do déficit hídrico em vários estádios morfofisiológicos da germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) com diferentes graus de resistência à seca**. 1996. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- BLACKMAN, M. J. et al. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 29-33, 1991.
- BLACKMAN, S. A.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 4, p. 630-638, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Determinações adicionais – peso volumétrico. In: **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. cap.8, item 8.2, p.193-194.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009.

BULL, P. C.; COX, D. W. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. **Trends Genet**, London, v. 10, n. 7, p. 246–252, 1994.

CAIXETA, F. Expressão diferencial de genes nas interações entre sementes de milho e *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium* spp. 2012. 104 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. The roles of ABA in plant-pathogen interaction. **Journal of Plant Research**, v. 124, n. 4, p. 489-499, 2011;

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

CASTILLON, A.; SHEN, H.; HUQ, E. Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, n. 11, p. 514–521, 2007.

CESARI, S. et al. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 4, p. 1463–81, 2013

CHRISTENSEN, S. A. et al. The Novel Monocot-Specific 9-Lipoxygenase ZmLOX12 Is Required to Mount an Effective Jasmonate-Mediated Defense Against *Fusarium verticillioides* in Maize. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, . v. 27, n. 11, p. 1263–1276, 2014.

CLEMENTS, M. J. et al. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 147-153, 2003.

CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, Conpenhagen, v.100, n. 2, p. 291-296, 1997.

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 3, n. 2, 117–124, 2000.

DE WIT, P. J. G. M. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 64, n. 21, p. 2726-2732, 2007

DICKE, M.; HILKER, M. Induced plants defence: from molecular biology to evolutionary ecology. **Basic and applied ecology**. Jena, v. 4, p. 3-14, 2003.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, p. 539-48, 2010.

DYKEMA, P. E. et al. A new class of proteins capable of binding transition metals. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, n. 1, p. 139–150, 1999.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária, 2004.

FANTAZZINI, T. B. **Desempenho de sementes e expressão gênica da interação *Fusarium verticillioides* e milho**. 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

- FENG, X. et al. The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdC1bHLH1 encodes an ICE-like protein in apple. **BMC Plant Biol.** [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–14, 2012.
- FUKUOKA, S. et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. **Science**, Washington, v. 325, n. 5943, p. 998–1001, 2009.
- GAO X. et al. Disruption of a maize 9 lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxins fumonisin. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 8, p. 922-933, 2007.
- GAO, X. et al. Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. **Molecular plant-microbe interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 1, p. 98-109, 2008.
- HASEGAWA, P. M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 463–499, 2000.
- HEIM, M. A. et al. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. **Molecular biology and evolution**, Chicago, v.20, n. 5, p. 735–747, 2003.
- HUANG, X. A basic helix-loop-helix transcription factor, PtrbHLH, of *Poncirus trifoliata* confers cold tolerance and modulates peroxidase-mediated scavenging of hydrogen peroxide. **Plant Physiology**, Bethesda, . v. 62, n. 2, p. 1178–94, 2013.
- HUNG, I. H. et al. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. **The journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 3, p. 1749–1754, 1998.
- JIA, J. et al. Annotation and expression profile analysis of 2073 full-length cDNAs from stress-induced maize (*Zea mays* L.) seedlings. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 710–727, 2006.
- JULIATTI, F. C. et al. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, p. 34-41, 2007.
- KANZAKI, K. et al (2013) Rice proteins that interact with the magnaporthe oryzae avirulence effector AVR-Pik (A-22). In: International rice blast conference, 6, 2013, Jeju, **Proceedings...** Jeju: IRBC, 2013, p. 20-24.
- KAUR, H.; GANGULI, D.; BACHHAWAT, A. K. Glutathione Degradation by the Alternative Pathway (DUG Pathway) in *Saccharomyces cerevisiae* Is Initiated by (Dug2p-Dug3p)₂ Complex, a Novel Glutamine Amidotransferase (GATase) Enzyme Acting on Glutathione, **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 287, n. 12, p. 8920-8931, 2012.
- KESSLER, A. ; BALDWIN, I. T., Plant responses to insect herbivory: The Emerging Molecular, **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 299-328, 2002.

- KLAPPROTH, C. J.; HAWK, A. J. Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 1057-1060. 1991.
- LANUBILE, A. et al. Molecular Basis of Resistance to Fusarium Ear Rot in Maize. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, p. 1774, 2017
- LE ROUX, C. A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. **Cell**, [s. l.], v.161, n. 5, p. 1074–88, 2015.
- LIN, Y. et al. Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize. **BMC Genomics**, [s. l.], v 12, p.76, 2011
- MACKEY, D. et al, RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. **Cell**. [s. l.], v. 108, n. 6, p. 743-754, 2002.
- MANJUNATH, S.; SACHS, M. M. Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 97-112, 1997.
- MANN, R. S. Diversidade do complexo *Colletotrichum* e de cultivares de algodoeiro por meio de marcadores moleculares. 2002. 146 p. **Tese** (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- MAQBOOL, A. et al. Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. **eLife**, [s. l.], v. 4, p. e08709, 2015.
- MARCONDES, M. M. **Incidência de podridão de colmo e grãos ardidos em híbridos de milho sob diferentes densidades de plantas e épocas de colheita**. 2012. 62 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Centro Oeste, Unicentro, Guarapuava. 2012.
- MENDES, M. C. et al. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8 n. 2 p. 275-292, 2012
- MURRE, C.; MCCAWE, P. S.; BALTIMORE, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins. **Cell**. [s. l.], v. 56, n. 5, p. 777-783, 1989.
- NEMCHENKO A. et al. Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 14, p. 3767–3779, 2006.
- NURNBERGER, T. Signal perception in plant pathogen defense. **Cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 55, n. 2, p. 167-182, 1999.
- OGUNOLA, O. F. et al. Characterization of the maize lipoxygenase gene family in relation to aflatoxin accumulation resistance. **PLoS ONE**, [s. l.], v.12, n. 7, p. e0181265, 2017.

- OKUYAMA, Y et al. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS–LRR protein genes. **Plant Journal**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 467-479, 2011.
- PENG, H. et al. Molecular characterization of cold-responsive basic helix-loop-helix transcription factors MabHLHs that interact with MaICE1 in banana fruit. **Planta**. Berlin, v. 238, n. 5, p. 937-53, 2013
- PEREIRA, G. S et al. Selection of maize inbred lines and gene expression for resistance to ear rot. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v.16, n. 3, p. 1-21, 2017.
- PERVIEUX, I. et al. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, n. 6, p. 331-341, 2004.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 29, n. 1, p. e45, 2001.
- RAMSAY, N. A.; GLOVER, B. J. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.10, n. 2, p. 63–70, 2005.
- REID, L.M.; HAMILTON, R. I. Effects of inoculation position, timing, macroconidial concentration, and irrigation on resistance of maize to *Fusarium graminearum* infection through kernels. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 18, n. 3, 279-285, 1996.
- SARRIS, P. F. et al. A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. **Cell** [s. l.], v. 161, n. 5, p. 1089-100, 2015.
- SEKI, M. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 279-292, 2002.
- SHU, X. et al. Comparative Histological and Transcriptional Analysis of Maize Kernels Infected with *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. 2017. **Frontiers in Plant Science**, v. . 8, p. 2075, 2107.
- SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, [s. l.], v. 132, p. 1-45. 1996.
- SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.
- YAN, Y. et al. A. Disruption of OPR7 and OPR8 reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 2, p. 1420-1436, 2012.
- YUGE, G. et al. Molecular cloning and characterization of a novel H⁺-translocating pyrophosphatase gene in *Zea mays*, **DNA Seq.**, [s. l.], v.19, n. 2, p. 79–86, 2009.

ZACCARON, A. Z.; WOLOSHUK, C. P.; BLUHM, B. H. Comparative genomics of maize ear rot pathogens reveals expansion of carbohydrate-active enzymes and secondary metabolism backbone genes in *Stenocarpella maydis*. **Fungal Biology**, Oxford, v. 121, n. 11, p. 966-983, 2017.

ZHANG, X. et al. Isolation and characterisation of cDNA encoding a wheat heavy metal-associated isoprenylated protein involved in stress responses. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 17, n. 6, p. 1176-1186, 2015

ANEXO A

Meio de cultura BDA (batata agar dextrose)

Para 1 litro de solução

200 g de batata lavada

20 g Agar

20g Dextrose (GLUCOSE ANIDRA)

q.s.p. Água destilada

Preparo

1. Cozinhar as batatas em micro-ondas até o ponto de purê em um bécher com volume de água suficiente para cobrir as batatas.
2. Com um tecido, filtrar a solução extraída das batatas durante o cozimento e adicionar a água até o volume de um litro (aferir usando proveta).
3. Separar quatro recipientes (plástico/vidro) com capacidade de um litro e adicionar 10 g de Agar mais 10 g de dextrose em cada. Verter 500 mL da solução de batata em cada recipiente.
4. Autoclavar (pressão = 121 por 15 a 20 minutos).
5. OBS: Preparar as placas e palitos de madeira (substitui a pinça no momento de repicar) para autoclavar junto com os meios.

Preparo das placas

1. Agrupar a quantidade de placas em um saco de papel e fechar com fita crepe.
2. Os palitos podem ser acondicionados em um bécher pequeno e fechados com papel do tipo crafite (colocar uma borracha ou fita crepe pra lacrar).
3. Após autoclavar, deixar secando (*over night*) sobre a bancada.

Vertendo o meio nas placas:

1. Limpar a capela de fluxo com álcool 70 % mais hipoclorito de sódio concentrado e deixar secar (pode usar papel toalha para secar). Cuidado (Não precisa usar luz ultravioleta).
2. Aquecer o meio em micro-ondas passando-o do estado sólido para o líquido.
3. Colocar uma pitada de antibiótico e misturar devagar pra não formar muitas bolhas.
4. Usar chama para flambar os recipientes com os meios após abrir.
5. Verter o meio nas placas de petri próximo a chama com cuidado para não passar a mão por cima das placas abertas. Deixar as placas semiabertas na capela de fluxo até a solidificação.
6. Após solidificar, o meio altera sua cor de amarela passa a ser de cor branca.
7. Fechar as placas, lacrar com papel filme, virar as placas (caso ficar umidade nas placas viradas irá evaporar) e armazenar até a utilização.

ANEXO B**Meio Aveia ágar – Oatmeal Agar (AO)**

Ingredientes:

Flocos de aveia (Quaker tradicional)	30 g
Ágar	20 g
Água destilada	1L

Preparo:

- 1) Pesar 30 g de flocos de aveia;
- 2) Colocar os flocos em um pano de algodão;
- 3) Mergulhar o pano com a aveia em um litro de água destilada;
- 4) Cozinhar em fogo baixo por 60 minutos;
- 5) Sempre completar o volume de água;
- 6) Torcer brandamente o pano e descartar a aveia cozida;
- 7) Filtrar o extrato em uma proveta utilizando gaze hidrofílica;
- 8) Completar o volume para 1L;
- 9) Pegar 5 g de ágar e colocar em cada frasco;
- 10) Distribuir 250 mL do extrato de aveia em cada frasco;
- 11) Esterelizar em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

ANEXO C

Protocolo de Extração de RNA de Grãos de Milho

1. Macerar 6 sementes/grãos de milho em cadinho com nitrogênio líquido.
2. Transferir para micro tubos de 1,5 mL o volume de 0,100 g do tecido macerado. Pesar cada amostra.
3. Acrescentar 500 μ L de Reagente de extração® gelado (4°C).
Esse processo deve ser realizado dentro da capela de exaustão.
4. Homogeneizar o material através de agitação em Vortex por 20 segundos e em seguida colocar os tubos na posição horizontal por 5 minutos em temperatura ambiente (*dentro da capela*).
5. Centrifugar a uma temperatura de 4°C com rotação de 14000 rpm por 15 minutos.
6. Com uma pipeta, transferir 400 μ L do sobrenadante para novos micro tubos de 1,5 mL.
Manter o material sobre gelo.
7. Acrescentar 100 μ L de NaCl gelado (4°C), homogeneizar no vortex e em seguida acrescentar 300 μ L de Clorofórmio gelado (4°C).
Após aplicar clorofórmio, inverter cada microtubo cuidadosamente, duas vezes.
8. Centrifugar a uma temperatura de 4°C com rotação de 14000 rpm por 10 minutos.
9. Com uma pipeta, transferir 400 μ L do sobrenadante para novos micro tubos de 1,5 mL.
Manter o material sobre gelo.
10. Acrescentar 400 μ L de Isopropanol gelado.
Inverter cada microtubo cuidadosamente, duas vezes.
11. Acondicionar o material a temperatura de - 20 °C (freezer) por 10 a 20 minutos.
12. Centrifugar a uma temperatura de 4°C com rotação de 14000 rpm por 10 minutos.
13. Remover todo o isopropanol.
Nessa etapa pode virar rapidamente os microtubos com cuidado para não desgrudar o pellet. Levar as amostras a centrifuga para um giro (spin) rápido e em seguida retirar o residual de isopropanol com uma pipeta.
14. Acrescentar 1 mL de etanol 75%. Usar ponteira de 1000 μ L.
15. Centrifugar a uma temperatura de 4°C com rotação de 14000 rpm por um minuto.
16. Remover todo o etanol virando o micro tubo de uma vez.
Centrifugar com rotação de 14000 rpm com poucos giros (Spin) por 30 segundos e logo após retirar o residual de etanol com pipeta usando.
17. Secar os pellets por um período de 20 a 30 minutos deixando os micros tubos descansarem na posição horizontal (*dentro da capela em temperatura ambiente*).
18. Ressuspender o pellet em 20 μ L de água ultra pura.
Nessa fase pode congelar a uma temperatura de -80 °C até a quantificação.

ANEXO D

Tabela 15 - Resumo das análises de variância dos resultados fisiológicos dos grãos com a observação de incidência e severidade dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Stenocarpella maydis* em dois tempos de colheita.

Fv	GL	QM										
		Sm	PMG_T1	PMG_T2	PESP_T1	PESP_T2	IPE_T1	IPE_T2	PGA_T1	PGA_T2	PROD_T1	PROD_T2
Híbrido	3		1584.1004	8333.8519	1080.7778	333.5321	411.4219	240,1681*	712.5836	170.7356	20844184.3524	15658782.1264
Inoculação	2		21522.5018	39376.1944	15467.8611	21846.7219	27179.9900	23815,6774*	15554.9417	24680.5514	15646591.5070	10411503.2844
Híb*Inoc	6		3318,4600*	2966,2685*	561,1944*	63,1071*	155,9692*	39.5475	720,6840*	158,1165*	3705231,6749*	3301320,1717*
Erro	24		75.9530	35.0833	28.1111	18.5858	14.1352	39.5475	1.8818	2.5283	1074461.79752	285732.5627
CV			3.53	2.1500	16.04	12.30	10.31	21.43	5.9	5.57	15.22	7.55

*Significativo a 5% pelo teste f

QM: Quadrado Médio; **GL:** Graus de Liberdade; **Fv:** *Fusarium verticillioides*; **Sm:** *Stenocarpella maydis*

T1: primeiro tempo de colheita; **T2:** segundo tempo de colheita;

PMG: Peso de Mil Grãos; **PESP:** Número de Espigas com Sintomas de Podridão; **IPE:** Incidência de Podridão de Espigas; **PGA:** Porcentagem de Grãos Ardidos; **PROD:** Produtividade.

ANEXO E

Tabela 16 - Resumo das análises de variância do teste de sanidade *Blotter test*.

Fv	GL	QM			
		Fv T1**	Fv T2**	Sm T1	Sm T2
Híbrido	3	0.34496	0.9472	57.8374	58.2525
Inoculação	2	10.29009	3,8790*	34171.0882	31489.7284
Híb*Inoc	6	9,0918*	0.9212	51,3218*	86,9947*
Erro	24	1.15398	0.4076	8.9906	9.1844
CV		20.09	10.21	9.68	10.04

*Significativo a 5% pelo teste f.

**Transformados pela equação $(X+0,5)^{0,5}$

T1: primeiro tempo de colheita; **T2:** segundo tempo de colheita;

GL: Graus de Liberdade; **QM:** Quadrado Médio;

Fv: *Fusarium verticillioides*; **Sm:** *Stenocarpella maydis*