



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

**MARINA DE RESENDE FARIA GUIMARÃES**

**INTERACTIONS BETWEEN *Exserohilum turcicum* AND  
MAIZE SEEDS: DETECTION, EFFECTS AND  
TRANSMISSION OF THE PATHOGEN**

**LAVRAS – MG**

**2021**



**MARINA DE RESENDE FARIA GUIMARÃES**

**INTERACTIONS BETWEEN *Exserohilum turcicum* AND  
MAIZE SEEDS: DETECTION, EFFECTS AND  
TRANSMISSION OF THE PATHOGEN**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, linha de pesquisa em Patologia de Sementes, para obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

Dra. Carolina da Silva Siqueira  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

Guimarães, Marina de Resende Faria.

Interactions between *Exserohilum turcicum* and maize seeds: detection, effects and transmission of the pathogen / Marina de Resende Faria Guimarães. - 2021.

84 p.

Orientador(a): José da Cruz Machado.

Coorientador(a): Carolina da Silva Siqueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Turcicum leaf blight. 2. Corn. 3. Inoculum level. I. Machado, José da Cruz. II. Siqueira, Carolina da Silva. III. Título.

**MARINA DE RESENDE FARIA GUIMARÃES**

**INTERACTIONS BETWEEN *Exserohilum turcicum* AND MAIZE SEEDS:  
DETECTION, EFFECTS AND TRANSMISSION OF THE PATHOGEN**

**Interações entre *Exserohilum turcicum* e sementes de milho: detecção, efeitos e  
transmissão do patógeno**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, linha de pesquisa em Patologia de Sementes, para obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 23 de abril de 2021

Dra. Carolina da Silva Siqueira – UFLA

Dr. Édson Ampélio Pozza – UFLA

Dra. Ellen Noly Barrocas – Indigo Agriculture

Dr. João Almir de Oliveira - UFLA

Prof. Dr. José da Cruz Machado  
Orientador

Dra. Carolina da Silva Siqueira  
Coorientadora

**LAVRAS – MG**

**2021**

*À memória de meus avós, Maria e João, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram nos meus estudos.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por ter sido minha segunda casa nos últimos 12 anos, e pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor José da Cruz Machado pela orientação, conselhos, ensinamentos e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Fitopatologia, pelos conhecimentos compartilhados e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Carol, minha amiga, por tantos ensinamentos, paciência, ajuda, amizade e por sempre me motivar a seguir em frente.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes (LAPS), Ângela, Iara, Layza, Anny, Manuel, Paulo, Guilherme, Ítalo, Allan e Ana Clara por todo apoio, amizade, momentos de descontração e ajuda nos trabalhos. Em especial, agradeço à Fabiana, pela amizade e por estar sempre comigo me dando forças para continuar, e à Luiza, por tantos conselhos, ajuda e amizade durante o ano em que estive no nosso laboratório.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição com este trabalho.

À minha família, por me apoiarem em todos os momentos. Em especial a minha mãe, Janette e meu pai, José Francisco por acreditarem em mim e estarem sempre dispostos a me ajudar para que eu pudesse terminar esse trabalho. Ao Gabriel, por não medir esforços para que eu concluísse mais esta etapa da minha formação profissional, por me entender e me apoiar, sempre! E à Júlia, meu presente de Deus durante o doutorado, por ser minha força e meu incentivo para conseguir chegar ao fim dessa etapa.

A todos, meu muito obrigada.

## RESUMO GERAL

Em decorrência da grande importância econômica e social do milho, torna-se relevante o estudo do desempenho de suas sementes na presença do patógeno *Exserohilum turcicum*, prevalente na maioria das regiões produtoras dessa cultura. Diante da escassez de informações mais pontuais sobre as relações entre esse patógeno e sementes de milho no Brasil e diante da importância crescente deste patossistema, a proposta nesta pesquisa foi o desenvolvimento de um protocolo de detecção molecular do fungo em sementes de milho, além da avaliação da presença do patógeno, seus efeitos no desempenho e transmissão a partir de sementes contaminadas. Sementes de um híbrido de milho suscetível foram inoculadas por 24, 48, 72 e 96 horas para obtenção de quatro níveis de inóculo (NI24, NI48, NI72 e NI96) com dois isolados de *E. turcicum*. Utilizando-se a técnica molecular de PCR convencional, foi possível detectar a presença do fungo, em quase todos os níveis de inóculo, nas sementes de milho inoculadas, utilizando um primer desenvolvido para quantificação do mesmo patógeno em folhas de milho. O par de primers utilizado é específico para *E. turcicum* e é capaz de detectar o patógeno em concentrações de até 0.0000147ng/μL. Nas análises utilizando a técnica de PCR em tempo real, pode-se quantificar o DNA genômico presente nas sementes de milho inoculadas com níveis de incidência mínima de 0,5%. Os efeitos do patógeno no desempenho das sementes foram avaliados por meio de teste de germinação, sanidade, condutividade elétrica e emergência. A presença de isolados de *E. turcicum* em sementes de milho foi prejudicial ao desenvolvimento das sementes inoculadas com este patógeno, havendo variações entre os fatores utilizados para este tipo de avaliação. A altura de plantas oriundas de sementes inoculadas com ambos isolados de *E. turcicum* não foi afetada ao contrário do vigor, avaliado pelo teste de condutividade elétrica, e germinação principalmente no tratamento de maior nível de inóculo. Avaliando-se plantas oriundas das sementes inoculadas, observou-se que a porcentagem de morte em pré-emergência aumentou com o aumento do nível de inóculo nas sementes, independente do isolado e da temperatura de cultivo. A taxa de transmissão total do patógeno em estudo foi de 55,27%, ocorrida no maior nível de inóculo presente na semente.

**Palavras chave:** Sementes. Milho. *Exserohilum turcicum*.



## ABSTRACT

Due to the great economic and social importance of corn, it is important to study the performance of its seeds in the presence of the pathogen *Exserohilum turcicum*, prevalent in most regions producing this crop. The lack of more specific information on the relationship between this pathogen and corn seeds in Brazil is still a problem. In view of the growing importance of this pathosystem, the purpose of this research was to evaluate the presence of the pathogen, its effects on the performance and transmission from contaminated seeds and development of a protocol for molecular detection of the fungus in corn seeds. Seeds of a susceptible hybrid of corn were inoculated to obtain four levels of inoculum (N24, N48, N72 and N96) with two isolates of *E. turcicum*. It was possible to detect the presence of the fungus, in almost all inoculum potentials using the conventional PCR technique, in the inoculated corn seeds, using a primer developed to quantify the same pathogen in corn leaves. The primer pair used is specific for *E. turcicum* and is capable of detecting the pathogen in concentrations up to 0.0000147ng /  $\mu$ L. In analyzes using the real-time PCR technique, it is possible to quantify the genomic DNA present in the inoculated corn seeds with minimum incidence levels of 0.5%. The effects of the pathogen on seed performance were evaluated by germination, health and vigor tests. The presence of *E. turcicum* isolates in corn seeds was detrimental to the development of seeds inoculated with this pathogen, with variations between the factors used for this type of evaluation. The height of plants from seeds inoculated with both isolates of *E. turcicum* was not affected, contrary to vigor and germination, mainly in the treatment of greater inoculum level. Evaluating plants from the inoculated seeds, it was observed that the percentage of death in pre-emergence increased with the increase of the level of inoculum in the seeds, regardless of the isolate and the temperature of cultivation. The rate of total transmission of the pathogen in study was 55.27%, which occurred at the highest level of inoculum present in the seed.

**Keywords:** Seeds. Maize. *Exserohilum turcicum*.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	11
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
2.1 A cultura do milho .....	12
2.2 Mancha túrcica do milho .....	14
2.2.1 Características gerais de <i>Exserohilum turcicum</i> .....	15
2.2.2 Detecção, transmissão e controle de <i>E. turcicum</i> em sementes .....	18
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	20
<b>SEGUNDA PARTE: ARTIGOS</b> .....	26
<b>ARTIGO 1</b> .....	26
MOLECULAR DETECTION OF <i>Exserohilum turcicum</i> IN CORN SEEDS – Sensitivity and specificity of Conventional and Real-time PCR techniques .....	26
<b>ARTIGO 2</b> .....	41
INFECTIVIDADE E EFEITOS DE <i>Exserohilum turcicum</i> EM SEMENTES DE MILHO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS .....	41
<b>ARTIGO 3</b> .....	70
TRANSMISSÃO DE <i>Exserohilum turcicum</i> A PARTIR DE SEMENTES DE MILHO EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE CULTIVO .....	70
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	83

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho é um dos três cereais mais cultivados no mundo e tem grande importância econômica e social devido às variadas formas de utilização. Atualmente o Brasil ocupa a terceira posição de maior produtor desta commodity, atrás dos Estados Unidos e China, que juntos contabilizam aproximadamente 709,5 milhões de toneladas por ano, ou 63,8% da produção total (USDA, 2020).

Considerada um dos principais insumos da atividade agrícola, a semente é parte importante para o sucesso de uma lavoura, pois além de ser o meio de perpetuação da maioria das espécies vegetais, comporta informações genéticas importantes para o desempenho das plantas, além de serem veículos de insumos como fertilizantes, fungicidas, inseticidas, inoculantes, promotores de crescimento, dentre outros, que, em conjunto, asseguram bons desempenhos no campo.

A adoção de sementes com alta qualidade, produzidas de acordo com as diretrizes de programas de certificação, tem sido um fator relevante para garantir que todos os fatores já citados, somados a redução de custos com insumos no campo, sejam traduzidas em produção com qualidade, maior produtividade e lucro ao produtor.

A qualidade das sementes está diretamente relacionada às características físicas, fisiológicas, genéticas e sanitárias, que em conjunto garantem um produto final de qualidade. Dentre estas características, a qualidade sanitária, relacionada à presença ou ausência de doenças e pragas nas sementes, é um dos principais problemas encontrados uma vez que a presença de microrganismos nas sementes pode comprometer grandemente um campo de cultivo e o armazenamento das sementes.

Dentre as diversas doenças que acometem a cultura do milho encontra-se a mancha túrcica causada pelo fungo *Exserohilum turcicum*. Prevalente na maioria das regiões produtoras de milho, é considerada uma das doenças de maior significância nos campos de produção dessa cultura. As perdas na produtividade de grãos variam de 15 a 50% podendo chegar a 90% em condições de alta severidade da doença (CHENULU; HORA, 1962; KACHAPUR; HEGDE, 1988; NWANOSIKE et al., 2015). As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são alta umidade relativa do ar juntamente com altas a moderadas temperaturas, ocorrendo a partir do estágio fenológico V3 até o desenvolvimento dos grãos (PALAVERSIC et al., 2012).

Embora não se conheça com profundidade a relação do fungo *E. turcicum* com sementes de milho, reconhece-se atualmente que o potencial de danos decorrentes do uso de sementes contaminadas com este patógeno tem sido uma grande preocupação junto aos produtores do milho.

Diante da escassez de informações mais pontuais sobre as relações entre *E. turcicum*, e sementes de milho no Brasil e diante da importância crescente deste patossistema no país, torna-se evidente que estudos mais aprofundados e seguindo metodologias científicas adequadas para estes casos, sejam necessárias. Neste sentido algumas medidas consideradas estratégicas para o manejo atual da doença em questão, como a avaliação da diversidade genética do patógeno já estabelecido nas áreas produtoras do milho, seus efeitos no desempenho de sementes contaminadas e desenvolvimento de um protocolo de detecção molecular do fungo em sementes de milho, tornam-se necessárias. Neste estudo o foco foi concentrado na detecção do patógeno em sementes de milho e seus efeitos incluindo transmissão do patógeno a partir de sementes portadoras de inóculo infectivo.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A cultura do milho**

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie da família Poaceae e um dos cereais mais cultivados em todo mundo, sendo a segunda espécie mais cultivada no território brasileiro (CONAB, 2020). Tem grande importância econômica e social em função de ser largamente utilizado tanto na dieta humana, como animal, e devido ao seu alto potencial produtivo, servindo de matéria prima para diversos subprodutos (GALVÃO et al., 2015) como óleo, proteína animal, etanol, entre outros.

Embora o centro de origem do milho seja no México (BRIEGER et al., 1958), a cultura tem uma grande variabilidade genética, que permite adaptar-se em climas tropicais, subtropicais e temperados, sendo o seu cultivo, no Brasil, caracterizado pela produção em duas épocas de semeadura, popularmente conhecidas como milho de primeira e segunda safra, ou safra verão e safrinha respectivamente (GURGEL, 2012). A época de semeadura mais adequada é aquela que faz coincidir o período de floração com os dias mais longos do ano, e a etapa de enchimento de grãos com o período de temperaturas mais elevadas e alta disponibilidade de radiação solar, variando conforme a região do Brasil. Geralmente, a semeadura do milho de primeira safra ocorre entre setembro e dezembro e a colheita durante janeiro e maio e, devido às condições climatológicas mais favoráveis, o milho semeado nesse

período tende a demonstrar uma maior produtividade. O milho safrinha, ou milho de segunda safra é normalmente semeado durante os meses de janeiro a março, e a colheita, ocorre nos meses de maio a agosto (CRUZ et al., 2012).

No panorama mundial, o Brasil ocupa posição de destaque como o terceiro maior produtor, contabilizando 9,5% do total produzido, equivalente a 110 milhões de toneladas, ficando atrás dos Estados Unidos e China. Também, tem destaque como quarto maior consumidor e o segundo maior exportador desse cereal (USDA, 2020). Na safra agrícola de 2019/2020, o Levantamento Sistemático da Produção Agrícola realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) registrou uma área total de 4,96 milhões de hectares plantados com milho em primeira safra e 13,22 milhões de hectares plantados na segunda safra, com produção total de 98.710,6 mil toneladas de grãos (CONAB, 2020). No entanto, a produtividade média brasileira ainda é considerada baixa em relação aos outros países produtores, ocupando a 23ª posição no ranking, com 6 toneladas por hectare (USDA, 2020). Entre os fatores que contribuem para essa baixa produtividade destacam-se as doenças, causadas principalmente por fungos, que podem comprometer o potencial de rendimento da cultura, podendo ocorrer tanto em condições de campo quanto de armazenamento (DUARTE et al., 2008; PINTO, 2005; WHITE, 1999).

Por ser uma cultura amplamente cultivada no Brasil, sob diversas condições climáticas, as plantas de milho estão sujeitas ao ataque de um número elevado de patógenos e ocorrência de diversas doenças que podem afetar a produção, qualidade, palatabilidade e o valor nutritivo dos grãos. Doenças causadas por fungos são importantes por serem facilmente propagadas e conhecidas por ocasionar grandes perdas na produtividade. Dentre as doenças fúngicas que ocorrem na cultura do milho, são destaques as que causam manchas foliares e podridões do colmo e da espiga (WORDELL et al., 2016). A importância de cada uma dessas doenças é variável de ano para ano e de acordo com a região de plantio, não sendo possível alegar que alguma tenha maior importância em relação às demais (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006). As doenças foliares na cultura do milho são responsáveis por reduções de até 40% na produtividade de grãos (CASA; REIS, 2003).

Das doenças fúngicas foliares que atingem a cultura do milho, destacam-se a mancha de antracnose causada por *Colletotrichum graminicola*; a mancha branca, causada por *Pantoea ananatis*, a cercosporiose, causada por *Cercospora zae-maydis*; a ferrugem comum e a ferrugem polissora causadas por *Puccinia* spp; e a helmintosporiose, ou também denominada mancha túrcica, cujo patógeno é o *Exserohilum turcicum* (WORDELL et al., 2016).

## 2.2 Mancha túrcica do milho

A mancha túrcica, ou mancha foliar, queima de turcicum ou mancha de turcicum foi inicialmente descrita como tendo o fungo *Helminthosporium turcicum* Luttrell (LUTRELL, 1958) como agente causal e por isso a doença recebia o nome de helmintosporiose. Posteriormente, autores mudaram o nome para *Bipolaris turcica* (Pass.) Shoemaker; e então para *Drechslera turcica* (Pass.) Subramanian & P. C. Jain. Porém em virtude de evidências apresentadas em estudos morfológicos em que o hilo dos conídios é bastante saliente, este patógeno foi enquadrado como *Exserohilum turcicum* K. J. Leonard e E. G. Suggs (LEONARD, 1974), como ainda hoje é denominado.

A forma sexuada do patógeno corresponde a *Setosphaeria turcica* (Luttrell) K. J. Leonard e E. G. Suggs (sinônimo *Trichometasphaeria turcica* Luttrell) e raramente ocorre na natureza (COTA et al., 2010; LEONARD et al., 1989; LUTTRELL, 1958). Taxonomicamente, o fungo *E. turcicum* pertence ao filo Ascomycota e à ordem Pleosporales e família *Pleosporaceae*, que contém outros patógenos economicamente importantes em monocotiledôneas.

Além do milho, *E. turcicum* tem como hospedeiros o sorgo (*Sorghum bicolor* (L. Moench), capim massambará, sorgo de halepo, ou capim Johnson (*S. halepense* (L.) Pers.), capim sudão (*S. sudanense* (Piper) Stapf) e o teosinto (*Euchlaena mexicana* Schrad.), sendo o milho considerado um dos mais importantes, e, embora a helmintosporiose seja também uma das doenças mais importantes do sorgo em diferentes partes do mundo; os isolados provenientes de milho não são patogênicos ao sorgo e vice-versa (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; COTA et al., 2010; FREDERIKSEN; ODVODY, 2000; REIS et al., 2004). Borchardt et al. (1998) sugerem como o centro de origem de *E. turcicum* a América Central, no caso de o patógeno ter coevoluido com o hospedeiro *Zea mays*, ou então a África Ocidental, se coevoluido com *Sorghum bicolor*.

A mancha túrcica foi descrita pela primeira vez na cultura do milho no estado de Nova Jersey em 1878, nos Estados Unidos da América, seguido por graves surtos em Connecticut (EUA) em 1889 (DRECHSLER, 1923). Atualmente, está disseminada em diversos países produtores, sendo considerada, dentre as doenças foliares do milho, a mais amplamente encontrada nas regiões tropicais (OGLIARI et al., 2005). Além da ocorrência nas áreas tropicais, também ocorre de forma generalizada em áreas subtropicais, como nos Estados Unidos da América, América do Sul, maioria dos países africanos, sul europeu, Índia, China entre outros (CHIDAMBARAM; MATHUR; NEERGAARD, 1973; JAKHAR et al., 2017; SHI, 2017).

No Brasil, existem relatos dessa doença desde o final da década de 80 e tem apresentado expressiva severidade principalmente na região Sul, durante a safra de verão e na região Centro oeste, na safrinha (ESTEVES, 1989). Geralmente ocorre em maior intensidade em cultivo de milho safrinha, causando os maiores danos quando infecta as plantas no período de floração (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). No sul do país é considerada uma das principais manchas foliares incidentes na cultura (REIS et al., 2004).

### **2.2.1 Características gerais de *Exserohilum turcicum***

Morfologicamente, o patógeno *E. turcicum* é caracterizado por apresentar conídios de coloração verde-oliva ou marrom-escuro, fusiformes, ligeiramente curvos. Os conídios podem ter de 3 a 8 septos, com dimensões de 20 x 105 µm, com hilo basal proeminente e germinação do tubo germinativo polar adjacente ao hilo. Os conidióforos são oliváceos, lisos ou verrugosos, com 2 a 4 septos, medindo de 7-9 x 150-250 µm (ALCORN, 1988; ELLIS, 1971; PEREIRA et al., 1996; SHURTLEFF, 1986; WHITE, 1999).

O processo de reprodução ocorre geralmente de forma assexuada, por meio da produção de conídios formados a partir das hifas. Pode ainda ocorrer por meio da fase sexuada, que embora seja raro na natureza e ainda não tenha sido reportado em nenhum material de campo, pode ser induzida em condições controladas de laboratório, com a produção de peritécios globosos e escuros (MARTIN, 2011; MOGHADDAM; PATAKY, 1994). Dentro dos peritécios, ocorre a formação dos esporos, os quais se diferenciam em ascósporos, no interior dos ascos. Estes são cilíndricos e contém de 1 a 8 ascósporos hialinos, trisseptados, retos ou ligeiramente curvos com dimensões de 13-17x 42-78 µm (BEDENDO, 1995; SHURTLEFF, 1986; WHITE, 1999).

Este patógeno é hemibiotrófico, apresentando uma fase parasitária na planta viva e uma fase necrotrófica nos restos culturais, os quais são importantes fontes de inóculo para o desenvolvimento de epidemias. Alguns autores afirmam que o fungo pode sobreviver de uma estação de cultivo para outra quando associado a restos culturais (folhas, bainha das folhas, palha da espiga) na forma de micélios, colonizando o substrato e produzindo esporos, ou como estrutura de dormência denominada de clamidósporo, mas não citam a possibilidade da presença do fungo em sementes de milho (BOOSALIS et al., 1967; SHURTLEFF, 1986, WHITE, 1999). A produção de clamidósporos ocorre como estratégia de sobrevivência quando o hospedeiro suscetível está ausente ou quando o ambiente é desfavorável e normalmente ocorre sob baixas temperaturas (aproximadamente 10 °C) e no escuro (LEACH, FULLERTON; YOUNG, 1977b). A sobrevivência nos restos culturais é a principal fonte de

inóculo para infecção de novas plantas de milho e varia conforme as condições de temperatura, luz e umidade (REIS et al., 2004).

A umidade relativa do ar próxima a 93% é essencial à esporulação, quando os conídios e conidióforos desenvolvem-se abundantemente nas lesões das folhas. A temperatura também é um fator importante pois influencia tanto na morfologia quanto na quantidade de septos presentes nos conídios. No geral, o melhor crescimento do fungo ocorre entre 18 e 27 °C, entretanto, o melhor intervalo para o desenvolvimento de conídios encontra-se entre 20 e 26 °C, porém, se expostos à luz o desenvolvimento é inibido. (LEACH, FULLERTON; YOUNG, 1977b; WHITE, 1999). A temperatura ideal para esporulação do fungo é definida como 25°C (BHOWMIK; PRASADA, 1970).

A deposição de uma estrutura reprodutiva de *E. turcicum* sobre a folha de milho suscetível e sadia, juntamente com condições favoráveis de temperatura e umidade, leva à uma série de reações bioquímicas entre o patógeno e o hospedeiro. A germinação do conídio origina um tubo germinativo que cresce ao longo da superfície foliar e produz um ou múltiplos apressórios, a partir dos quais o fungo penetra pela cutícula e epiderme da folha e raramente por meio dos estômatos (KNOX-DAVIES, 1974). As condições ideais para a ocorrência da doença são obtidas com temperaturas em torno de 20 °C e com um mínimo de 8h de molhamento foliar (VITTI et al., 1993).

Após a penetração, o patógeno se desenvolve e coloniza os tecidos do hospedeiro provocando alterações em diversos processos fisiológicos, podendo causar necrose e colapso dos tecidos (BEDENDO, 1995; PEREIRA et al., 1996). O micélio cresce através do tecido foliar e dentro do sistema vascular, se espalhando por toda a planta (MUIRU, 2008). Como consequências dessas alterações surgem os sintomas, expressos pelas lesões foliares, inicialmente como pontos cloróticos no local de penetração do patógeno, que podem ter um halo amarelado ou verde claro, consistindo na área de crescimento do fungo para novas células. Posteriormente, essas lesões vão transformar-se em lesões necróticas elípticas, cuja coloração varia de púrpura-avermelhada a castanho-amarelada com o centro amarelado a cinza, medindo de 2,5 a 15 cm de comprimento, evidenciando a morte de células. As primeiras lesões aparecem nas folhas mais velhas, inferiores e continuam aumentando em tamanho e número à medida que a planta se desenvolve, e, em condições de alta incidência pode ocorrer a queima completa dos tecidos foliares (COTA; SILVA; COSTA, 2013; DE LEÓN, 1994; WHITE, 1999).

Frequentemente é encontrado em quase todas as regiões produtivas de milho, entretanto, a infecção geralmente é limitada ao material foliar da planta, não causando danos



diretamente às sementes (RAYMONDO; HOOKER, 1981). Em lavouras com alta intensidade da doença o número de lesões por folha aumenta, o que pode ocasionar a morte prematura da planta. Lesões diretamente nas espigas não são comuns, embora algumas possam ser formadas externamente sobre a palha da espiga. Quando as plantas são severamente afetadas, as espigas têm seu tamanho reduzido (REIS et al., 2004). Além das lesões foliares, ocorre também murcha da planta devido à colonização do xilema, o que impede a absorção de água pela planta e conseqüente redução do potencial fotossintético, reduzindo a produção (THAKUR et al., 1989).

Após a infecção dos tecidos, observa-se intensa esporulação do patógeno no interior das lesões se exteriorizando por rupturas na superfície foliar nas lesões ou por meio dos estômatos (KNOX-DAVIS; DICKSON, 1960). Devido à produção de conidióforos, a lesão torna-se cinza-escura ou preta, com as bordas bem definidas, largas, alongadas, distribuídas irregularmente na superfície foliar, podendo coalescer e dando o aspecto de queima, principalmente nas cultivares suscetíveis. Quando expostas, essas estruturas reprodutivas amadurecem para serem liberadas e disseminadas para colonização de novo hospedeiro. Em condições de solos frios e úmidos, pode ocorrer podridão de sementes e morte de plântulas (SASSE, 2008).

A maior liberação de conídios acontece após ocorrência de chuvas, em períodos com alta umidade relativa ou presença de orvalho, e 40% deles são liberados no período da manhã, entre 8 e 12 horas, quando a luz solar seca a folhagem. A dispersão pode ocorrer por respingos de chuva ou vento que impulsiona o esporo para o ar disseminando-o a longas distâncias, ocasionando infecções secundárias na mesma planta, em plantas vizinhas, ou campos vizinhos distantes (LEACH; FULLERTON; YOUNG, 1977a).

Os danos causados pela ocorrência da doença variam com a virulência dos isolados que predominam na população. Durante epidemias, a incidência do fungo pode atingir 100%, causando significativas perdas de produção. Em regiões onde prevalecem alta umidade e temperaturas moderadas prevalecem durante as estações de cultivo e que a infecção ocorre antes do enchimento de grãos, a redução do potencial fotossintético pode levar a perdas de até 80% na produtividade (CARSON, 1995; RAMATHANI et al., 2011; RAYMONDO; HOOKER, 1981).

A redução do rendimento de grãos em híbridos suscetíveis pode ser explicada pela severidade da doença nas folhas imediatamente acima e abaixo da espiga (PATAKY, 1992). A mancha túrcica reduz a produção do milho, aumenta o tombamento das plantas e diminui a

capacidade germinativa das sementes, além de predispor a cultura a podridões do colmo (CARDWELL et al., 1997; GOWDA et al., 1992; PEREIRA et al., 1997).

### 2.2.2 Detecção, transmissão e controle de *E. turcicum* em sementes

A associação de patógenos com sementes é uma das maiores preocupações na produção de qualquer espécie que utilize a semente como forma de propagação. Deste modo, a detecção e identificação precisa de patógenos em sementes e outros materiais de propagação vegetal se torna uma etapa importante no sistema de produção agrícola. Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes seguem, de modo geral, as regras adotadas pela International Seed Testing Association (ISTA), responsável pela validação dos testes de sementes, que em sua maioria consistem em estimular os microrganismos a produzir estruturas ou metabólitos que permitam a sua identificação.

Existem diversos testes destinados à detecção de microrganismos associados às sementes, porém nem todos permitem a detecção de todos os patógenos presentes na amostra ou de patógenos específicos. Dentre os métodos que utilizam bases biológicas ou culturais, aqueles que envolvem períodos de incubação em substratos de papel (*blotter test*) e meios agarizados são os mais comuns em análises de rotina para a detecção de um grande número de fungos (BRASIL, 2009). Por estes métodos o reconhecimento dos organismos baseia-se na presença de hifas, corpos de frutificação e esporos, independentemente de estarem localizados na superfície ou no interior das sementes. A esporulação de *E. turcicum* depende grandemente de fontes adequadas de carbono e nitrogênio (MALCA; ULSTRUP, 1962) e a utilização de um meio rico nesses nutrientes favorece a detecção e correta identificação deste microrganismo. Desta forma, Tuite (1969) cita o meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA) como sendo apto para induzir a esporulação de *E. turcicum*, pois a lactose funciona como a fonte de carbono e a caseína hidrolisada como a fonte de nitrogênio.

A detecção de fungos com base na análise do DNA por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e em tempo real, qPCR, tem sido uma alternativa para uma diagnose mais rápida e sensível. A técnica da qPCR tem sido bastante utilizada, pois permite a visualização da quantidade de fragmentos de DNA do patógeno em estudo durante a reação, por meio da utilização de sondas fluorescentes e *primers* específicos. Em geral, os métodos moleculares são mais rápidos, específicos e seguros para a detecção de patógenos de interesse. Chung et al. (2010) conseguiram quantificar o inóculo de *E. turcicum* presente em folhas de milho infectadas artificialmente em casa de vegetação por qPCR. Bunkoed et al. (2014) também utilizando a técnica de PCR conseguiram identificar isolados de *E. turcicum* em

Bangkok, na Tailândia. A detecção deste fungo em sementes de milho via PCR ou qPCR ainda não foi investigada.

Apesar de ser um fungo que tem sido detectado com certa frequência em testes laboratoriais em amostras de sementes de milho, é ainda pouco esclarecida a sua relação de transmissão e efeitos em sementes desta espécie. De Rossi (2012) estudando a transmissão deste patógeno a partir de sementes artificialmente infectadas não detectou a presença do fungo nos órgãos aéreos de plântulas de milho, quando avaliando visualmente a presença de estruturas fúngicas nas folhas.

O fungo *E. turcicum* apresenta alta variabilidade tanto em suas características morfo-fisiológicas como genéticas que caracterizam virulências diferentes (YESHITILA, 2003). Dessa forma, técnicas como incluindo RAPDs, AFLP, isoenzimas, microssatélites entre outros têm sido utilizadas em estudos populacionais visando a determinação da sua diversidade genética (DONG et al, 2008; FERGUSON; CARSON, 2004; HAASBROEK et al, 2014; MUIRU et al, 2010; SIMCOX; BENNETZEN, 1993).

O termo ‘raça fisiológica’ vem sendo utilizado para descrever os patógenos da mesma espécie, morfologicamente semelhantes e com mesma virulência. Patógenos de raças fisiológicas distintas apresentam diferentes níveis de virulência. No Brasil, já foram identificadas as raças fisiológicas 0, 1, 2, N, 12, 23 e 23N de *E. turcicum* em milho (PEREIRA, 2019). A existência de raças bem como a variabilidade em termos de virulência do patógeno implica na necessidade do desenvolvimento de híbridos de milho resistentes a tais raças, uma vez que seu uso tem sido a alternativa mais utilizada para o controle da mancha túrcica do milho (FERGUSON; CARSON, 2007). Neste caso há uma redução dos custos de produção, além da diminuição das atividades de manejo e problemas ambientais (RIBEIRO et al., 2016). Além do uso desta estratégia, a rotação de culturas com uma cultura não hospedeira em áreas com plantio direto que tenham histórico da doença pode ser necessária para a redução da fonte de inóculo e conseqüentemente da quantidade de doença na cultura de milho seguinte. A aplicação de fungicidas específicos no cultivo em desenvolvimento, voltada especificamente para a mancha túrcica é uma terceira ferramenta, porém é uma alternativa que gera custos adicionais, fato que deve ser considerado na composição final dos custos de produção deste tipo de cultivo (GULLICKSON, 2017; SALGADO et al., 2016). No geral, o manejo eficaz da doença deve ser preventivo em campos com alto risco de desenvolvimento da doença, sempre evitando os danos e perdas na produção causadas pela doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCORN, J. L. The taxonomic of “*Helminthosporium*” species. *Annual Review of Phytopathology*. V.26, p 37-56, 1988.
- BEDENDO, I.P. Manchas foliares. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*, v.1, p.855-857, 1995.
- BHOWMIK, L. & PRASADA, R. Physiologic specialization in *Helminthosporium turcicum* Pass. From India. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, v.68, p.84-87, 1970.
- BOOSALIS, M.G.; SUMMER, D.R. & RAO, A.S. Overwintering of conidia de *Helminthosporium turcicum* on corn residues and in the soil in Nebraska. *Phytopathology*. v.57, p.990-996, 1967.
- BORCHARDT, D. S., WELZ, H. G., AND GEIGER, H. H. 1998. Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in temperate and tropical climates. *Phytopathology* 88:322-329.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. *Manual de Análise Sanitária de Sementes*. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009. 200p.
- BRIEGER, F. G., T. A. GURGEL, E. PATERNIANI, A. BLUMENSCHNEIN, E M. R. ALLEONI. 1958. Races of maize in Brazil and other eastern south American countries. Publication. National Academy of Sciences – National Research Council, Washington, D.C. 593. 283 p.
- BUNKOED, W.; KASAM, S. and CHAIJUCKAM, P. (2014). Sexual reproduction of *Setosphaeria turcica* in natural corn fields in Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 48, 175–182.
- CARDWELL, K. F.; SCHULTHESS, F.; NDEMAH, R.; NGOKO, Z. A systems approach to assess crop health and maize yield losses due to pests and diseases in Cameroon. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 65 (1997) 33-47.
- CARSON, M.L., 1995. Inheritance of latent period length in maize infected with *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease* 79:581-585.
- CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças na cultura do milho. In: Fancelli AL & Dourado Neto D (Eds.) *Milho: estratégia de manejo para alta produtividade*. Piracicaba, ESALQ/USP. p.01-18. 2003.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. Doenças na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular técnica, 83).
- Chenulu VV; Hora TS (1962). Studies on losses due to *Helminthosporium* blight of maize. *Indian Phytopathology* 15:235-237.
- CHIDAMBARAM, P., MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Identification of seed-borne Drechslera species. *Friesia, Hornbæk*, v. 10, p.165-207.,1973.

CHUNG et al. Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize - *Setosphaeria turcica* pathosystem. BMC Plant Biology 2010, 10:103. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/103>.

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 7. Safra 2019/20 – Décimo Segundo levantamento, Brasília. p. 1-68. Setembro 2020.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P.; NOLASCO, A. A. Especialização fisiológica de *Exserohilum turcicum* para o milho e sorgo. Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. 2010. 6p.

COTA, L. V.; SILVA, D. D.; COSTA, R. V. Helminthosporiose causada por *Exserohilum turcicum* na cultura do milho. Sete Lagoas. Circular técnica 195. Embrapa. 2013. 8p.

CRUZ, J. C. et al. Cultivo do milho. 2012. Disponível em: [https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducao6\\_1galceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=3821&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=1309](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3821&p_r_p_-996514994_topicoId=1309). Acesso em: 10 out. 2018.

DE LEÓN, C. Moléstias do milho. Guia para sua identificação no campo. Fundação Cargill, Campinas, 1994. 119p.

DE ROSSI, R. L. *Exserohilum turcicum* em milho: caracterização morfológica e patológica, associação a sementes e sensibilidade a fungicidas. Passo Fundo, 2012. Dissertação (mestrado). Universidade de Passo Fundo, 2012.

DONG, J.; FAN, Y.; GUI, X. AND AN, X. (2008). Geographic distribution and genetic analysis of physiological races of *Setosphaeria turcica* in northern China. Am. J. Agric. Biol. Sci. 3, 389–398. doi: 10.3844/ajabssp.2008.389.398

DRECHSLER, C. 1923. Some graminicolous species of Helminthosporium. I. J. Agri. Res., 24: 641-739.

DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). Cultivo do milho. 4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 2). Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_4es/economia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_4es/economia.htm)>. Acesso em: 17 out. 2018.

ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Kew: CAB. 608p. 1971.

ESTEVES, M. C. F. Reações a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em milho (*Zea mays* L.) e variabilidade do patógeno. 1989. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

FERGUSON, L. M. and CARSON, M. L. (2004). Spatial diversity of *Setosphaeria turcica* sampled from the Eastern United States. Phytopathology 94, 892–900. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.8.892

FERGUSON, L. M. and CARSON, M. L. (2007). Temporal variation in *Setosphaeria turcica* between 1974 and 1994 and origin of races 1, 23 and 23N in the United States. *Phytopathology*. Vol 97. No 11. Doi: 10.1094/PHYTO-97-11-1501

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2000. 80p.

FREDERIKSEN, R. A.; ODVODY, G. N. Compendium of sorghum diseases. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000. 78 p.

GALVÃO, J. C. C. et al. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. *Ceres*, Viçosa, MG, v. 61, n. 7, p. 819-282, 2015.

GOWDA, K. T. P.; SHETTY, H. S.; GOWDA, B. J.; PRAKASH, H. S.; SANGAM, L. 1992. Comparison of two methods for assessment of yield loss due to Turcicum leaf blight of maize. *Indian Phytopathology* 45: 316–320.

GULLICKSON, G. HOW TO BATTLE NORTHERN CORN LEAF BLIGHT. 2017. Acesso em: 22 de nov 2018. Disponível em:<<https://www.agriculture.com/crops/corn/how-to-battle-northern-corn-leaf-blight>>.

HAASBROEK, M. P.; CRAVEN, M.; BARNES, I. AND CRAMPTON, B. G. Microsatellite and mating type primers for the maize and sorghum pathogen, *Exserohilum turcicum*. 2014. *Australasian Plant Pathol.* DOI 10.1007/s13313-014-0289-4

JAKHAR, D. S.; SINGH, R.; KUMAR, S. and SINGH, P. 2017. Turcicum Leaf Blight: A Ubiquitous Foliar Disease of Maize (*Zea mays* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(3): 825-831. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.097>

Kachapur MR, Hegde RK (1988). Studies on turcicum blight of maize (*Zea mays* L.) caused by *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs with special reference to crop loss assessment. *Plant pathology – News* 6:33-35.

KNOX-DAVIES, P. Penetration of maize leaves by *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathol.* 64, 1468-1470, 1974.

KNOX-DAVIES, P. S. & DICKSON, F. G. (1960) Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage, *Trichometasphaeria*. *American Journal of Botany* 47: 328-339

LEACH, C. M.; FULLERTON, R. A.; YOUNG, K. Northern leaf blight of maize in New Zealand: Relationship of *Drechslera turcica* airspora to factors influencing sporulation, conidium development, and chlamydospore formation. *Phytopathology* 67: 629-636. 1977b

LEACH, C. M.; FULLERTON, R. A.; YOUNG, K. Northern leaf blight of maize in New Zealand: Release and dispersal of conidia of *Drechslera turcica*. *Phytopathology* 67: (in press).1977a

LEONARD, K. J. Foliar pathogens of corn in North Carolina. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 58, p. 532–534, 1974.

- LEONARD, K. J.; LEVY, Y.; SMITH, D. R. Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. *Plant Disease*, St. Paul, v. 73, p. 776-777, 1989.
- LUTTRELL, E. S. The perfect stage of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 48, p. 281-287, 1958.
- MALCA, I. & ULLSTRUP, A. J. Effects of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of *Helminthosporium*. *Bulletin of Torrey Botanical Club* 89: 240-249. 1962.
- MARTIN, T. *Setosphaeria turcica*, fungal mating and plant defense. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2011.
- MOGHADDAM, F., & PATAKY, J. K. (1994). Reactions of isolates from matings of races 1 and 23 N of *Exserohilium turcicum*. *Plant Disease*, 78, 767-771.
- MUIRU, W. Histological studies and characterization of races of *Exserohilium turcicum* the causal agent of northern leaf blight of maize in Kenya. PhD thesis. University of Nairobi, Kenya, 2008.
- MUIRU, W. M.; KOOPMANN, B.; TIEDEMANN, A. V.; MUTITU, E. W. AND KIMENJU, J. W. Use of Repetitive Extragenic Palindromic (REP), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) and BOX sequences to fingerprint *Exserohilium turcicum* isolates. 2010. *Journal of Applied Biosciences* 30: 1828-1838.
- Nwanosike, M. R. O., Mabagala, R. B., Kusolwa, P. M. (2015). Effect of northern leaf bight (*Exserohilium turcicum*) severity on yield of maize (*Zea mays* L.) in Morogoro, Tanzania. *International Journal of Science and Research* 4(9):466-475.
- OGLIARI, J.B.; GUIMARÃES, M.A.; GERALDI, I. O.; CAMARGO, L.E.A. New resistance genes in the *Zea mays* - *Exserohilium turcicum* pathosystem. *Genetics and Molecular Biology*. Ribeirão Preto, v.28, p.3, 435-439. 2005.
- PALAVERSIC, B., JUKIC, M., JUKIC, K., ZIVKOVIC I., BUHUNICEK, I., JOZINOVIC, T., VRAGOLOVIC, A., KOZIC, Z., JEMENARSTVO, S. (2012). Breeding maize for resistance to Northern leaf blight (*Exserohilium turcicum* Pass.) [Croatian]. 29 (3/4): 111-120
- PATAKY, J.K. Relationships between yield of sweet corn and northern leaf blight caused by *Exserohilium turcicum*. *Phytopathology*, v.82, p.370-375, 1992.
- PEREIRA, J. N. P. Identificação de raças de *Exserohilium turcicum* em áreas comerciais de milho no Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Uberlândia. 2019
- PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). Manual de fitopatologia. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. p.538-555.
- PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V. de; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho (*Zea mays*). In: BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: Epidemiologia e controle econômico. Ceres, São Paulo. p. 479-480, 1996.

- PINTO, N. F. J. de A. Grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 66)
- RAMATHANI, I., BIRUMA, M., MARTIN, T., DIXELIUS, C. AND OKORI, P. (2011) Disease severity, incidence and races of *Setosphaeria turcica* on sorghum in Uganda. *Eur. J. Plant Pathol.* DOI: 10.1007/s10658-011-9815-1
- RAYMONDO, A. and HOOKER, A. (1981) Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. *Plant Dis.* 65, 325-327.
- REIS, E.M.; CASA, R.T.; BRESOLIN, A.C.R. Manual de diagnose e controle de doenças do milho. 2ed. Rev. Atual. Lages: Graphel, 144p., 2004.
- RIBEIRO, R. M. et al. History of northern corn leaf blight disease in the seventh cycle of recurrent selection of an UENF-14 popcorn population. *Acta Sci., Agron., Maringá*, v. 38, n. 4, p. 447-455, Dec. 2016. Acesso em 22 Nov. 2018. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1807-86212016000400447&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-86212016000400447&lng=en&nrm=iso). <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.30573>
- SALGADO, J. D.; SCHOENHALS, J. AND PAUL, P. A. 2016 Northern corn leaf blight. Ohio State University Extension.
- SASSE, S. Caracterização de variedades locais de milho procedentes de Anchieta – SC quanto à resistência à *Exserohilum turcicum*. Florianópolis, 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- SHI, N. N.; DU, Y. X.; RUAN, H. C.; YANG, X. J.; DAI, Y. L.; GAN, L.; CHEN, F. R. and LIU, X. Z. First Report of Northern Corn Leaf Blight Caused by *Setosphaeria turcica* on Corn (*Zea mays*) in Fujian Province, China. *Plant Disease* 2017 101:5, 831
- SHURTLEFF, M.C. A compendium of corn diseases. 2.ed. St. Paul: APS/University of Illinois, 1986. 105p.
- SIMCOX, K. D.; and BENNETZEN, J. L. (1993). Mapping the HtN resistance gene to the longarm of chromosome 8. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 67, 118–119.
- THAKUR, R., LEONARD, K. AND LEATH, S. (1989) Effects of temperature and light on virulence of *Exserohilum turcicum* on corn. *Phytopathol.* 79, 631-635.
- TUITE, J. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University. Lafayette, Indiana. 1969.
- USDA – United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. Foreign Agricultural Service. Circular Series WAP 1-20. January 2020.
- VITTI, A. J.; BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre ferrugem comum e helmintosporiose do milho. *Fitopatologia Brasileira* 18: 314. 1993
- WHITE, D.G. Compendium of corn diseases. Third edition. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.1999.



WORDELL FILHO, J.A.; RIBEIRO, L. do P.; CHIARADIA, L.A.; MADALÓZ, J. C.; NESI, C.N.; Pragas e doenças do milho: diagnose, danos e estratégias de manejo. Florianópolis: Epagri, 2016. 82p. Epagri. Boletim Técnico, 170.

YESHITILA D, 2003. Cloning and characterization of xylanase genes from phytopathogenic fungi with a special reference to *Helminthosporium turcicum* the cause of northern leaf blight of maize. Department of Applied Biology, University of Helsinki- Finland. Academic Dissertation.

**SEGUNDA PARTE: ARTIGOS****ARTIGO 1****MOLECULAR DETECTION OF *Exserohilum turcicum* IN CORN SEEDS – Sensitivity and specificity of Conventional and Real-time PCR techniques**

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Exserohilum turcicum* EM SEMENTES DE MILHO –  
Sensitividade e especificidade das técnicas de PCR convencional e em tempo real

Preparado de acordo com a Journal of Seed Science (versão preliminar)

Marina de Resende Faria Guimarães<sup>1</sup>, José da Cruz Machado<sup>1</sup>, Carolina da Silva Siqueira<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia de Sementes, Caixa Postal 3037, CEP 37200-900 Lavras, MG, Brasil. E-mail: mari16na@gmail.com, machado@ufla.br e kerolpet@gmail.com

## ABSTRACT

Turcicum leaf blight (TLB) is the most devastating disease in corn caused by *Exserohilum turcicum* and can be found in most cornfields worldwide. The association of pathogens with seeds is considered a serious threat to the establishment of the field since they are considered important ways of survival and spread of the pathogen. The aim of this study was to evaluate the use of molecular techniques such as conventional and real time PCR, for detecting *E. turcicum* in corn seed samples artificially inoculated and develop a protocol for routine detection in the laboratory. In this study the conventional and quantitative PCR techniques were used to detect and quantify *E. turcicum* in corn seeds artificially inoculated. Seeds were prepared with 0.25%, 0.5%, 1%, 10% and 100% of incidences of seeds exposed to the pathogen for periods of time, corresponding to different levels of inoculum 36h (N36), 72h (N72), 108h (N108) and 144h (N144). Both techniques were efficient in the detection of the fungus in the seeds. Using the conventional PCR, the highest sensibility was noted in the lowest level of inoculum (N36), at 0.5% of incidence. The same result was obtained while using the qPCR technique, where amount as low as 0.0000147ng/ $\mu$ L could be detected in the lowest inoculum level.

Index Terms: maize, PCR, turcicum blight

## RESUMO

A mancha túrcica é a doença mais devastadora do milho, causada por *Exserohilum turcicum*, pode ser encontrada na maioria dos campos de milho em todo o mundo. A associação de patógenos com sementes é considerada uma séria ameaça ao estabelecimento do campo, visto que são consideradas importantes meios de sobrevivência e disseminação do patógeno. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de técnicas moleculares, como a PCR convencional e em tempo real, para detecção de *E. turcicum* em amostras de sementes de milho inoculadas artificialmente e desenvolver um protocolo para detecção de rotina em laboratório. Neste estudo foram utilizadas as técnicas de PCR convencional e quantitativo para detectar e quantificar *E. turcicum* em sementes de milho inoculadas artificialmente. As sementes foram preparadas com 0,25%, 0,5%, 1%, 10% e 100% de incidência de sementes expostas ao patógeno por períodos de tempo, correspondendo a diferentes níveis de inóculo 36h (N36), 72h (N72), 108h (N108) e 144h (N144). Ambas as técnicas foram eficientes na detecção do fungo nas sementes. Utilizando a PCR convencional, a maior sensibilidade foi observada no nível mais baixo de inóculo (N36), com 0,5% de incidência. O mesmo resultado foi obtido ao usar a técnica de qPCR, onde uma quantidade tão baixa quanto 0,0000147ng/ $\mu$ L pode ser detectada no nível de inóculo mais baixo.

Termos para indexação: *Zea mays*, mancha túrcica, técnicas moleculares

## Introduction

Northern Corn Leaf Blight (NCLB) also known as turcicum leaf blight (TLB) is the most devastating disease in corn. Caused by the ascomycete *Exserohilum turcicum* it can be found in most corn fields worldwide, where susceptible corn is grown (De Rossi e Reis, 2014). The disease, on susceptible hybrids, is characterized by long elliptical grey to tan-colored lesions on the leaves. The first lesions appear on the lower and older leaves and increase in size and number as the plant develops (Cota, Silva, Costa, 2013). Yield losses can range from 24% to 91% (Pant et al., 2000; Nwanosike et al., 2015). Besides the yield losses, the disease also causes qualitative changes to the seeds produced, resulting to decreased sugar content, germination capacity, vigor (Gowda et al., 1992; Cardwell et al., 1997).

The seed is one of the most important ways that the pathogens use to survive and spread its structures to other areas; therefore, their association with seeds is considered a serious threat to the establishment of the field. Pathogens can be associated with the seeds in their inner parts or on the outside tissue and this biological relationship shows the importance of the use of healthy seeds.

*E. turcicum* is a corn pathogen that is detected in most of corn seed samples that are analyzed in routine laboratories, even though this fungus has not its transmission by seeds confirmed, it is important to detect its presence in the seed so its structures will not be disseminated. Therefore, detecting these pathogens in the seeds has a huge importance and impact on the field.

There are several methods that can be used to detect and identify seedborne pathogens, but each of them has a different time of procedure, sensitivity, specificity, and cost (Walcott, 2003). The conventional and the real time Polymerase Chain Reaction (PCR) are techniques that, although expensive, can be used to detect seed pathogens with speed and precision if the right pair of primers are used. Both methods have already been used to detect the presence of *E. turcicum* in corn leaves (Chung et al., 2010; 石妞妞 Shi Niuniu et al., 2016), but it has not been used to detect it in seeds yet.

Having that said the aim of this study was to evaluate the use of molecular techniques such as conventional and real time PCR, for detecting *E. turcicum* in corn seed samples artificially inoculated.

## Material and Methods

The experiment was performed in the Seed Pathology Laboratory, at the Plant Pathology Department of the *Universidade Federal de Lavras* (UFLA).

### *Source and multiplication of the fungi*

In this study, it was used the isolate CMLAPS805 of *Exserohilum turcicum*, obtained from the Biological Institute of São Paulo. Initially, the isolate was cultivated in 9 cm diameter Petri dishes and a monosporic culture was obtained from it. This monosporic culture was replicated into 15cm diameter Petri dishes containing LCHA medium (Tuite, 1969) and kept in a BOD incubator for 15 days at  $25\pm 2$  °C and 12 h photoperiod. Other fungal species isolates found in corn seeds, such as *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *Fusarium verticillioides*, *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum graminicola*, obtained from the mycological collection of the Seed Pathology Laboratory from UFLA, were also cultivated in PDA medium and kept in the same conditions as described previously.

The commercial hybrid RB9006PRO used in the present work is characterized as susceptible to Northern Corn Leaf Blight (NCLB) and were obtained from Riber KWS Company (Patos de Minas, MG),

### *Seed inoculation and sample preparation*

Initially corn seeds were disinfested on the surface with 1% sodium hypochlorite for 1 minute, followed by washing three times with distilled water. Then they were dried between germitest paper sheets for 48 hours, placed in plastic trays, in a 20 °C room. These seeds were inoculated with the isolate CMLAPS805 of *E. turcicum* using the hydric conditioning methodology (Machado et al., 2012). Monosporic fungi colonies were grown for 15 days in 15 cm diameter Petri dishes containing LCHA medium plus mannitol, with the osmotic potential adjusted to -1,4 MPa (Michel and Radcliffe, 1995). Corn seeds were distributed over the colony in a single layer, with the scutellum facing down to the colony and the plates were kept in a BOD incubator at  $25\pm 2$  °C, with a 12-hour photoperiod. The seeds were exposed to the fungus colonies during 36, 72, 108 and 144 hours, corresponding to the inoculum levels IL36, IL72, IL108 and IL144, respectively. After that, the seeds were dried in trays, between germitest paper sheet, for 48 hours at 20 °C room, for later mixture with healthy seeds.

To determine the sensitivity of detection of the fungus *E. turcicum* when associated with corn seeds, using the conventional and real-time PCR techniques, the artificially inoculated seeds were mixed. The mixture was composed of inoculated and non-inoculated

seeds at specific quantities (Table 1) to obtain different levels of artificial incidence (0.25%, 0.50%, 1%, 10% and 100%), in different inoculum levels (IL36, IL72, IL108 and IL144), in a 400 seeds sample.

Table 1. Incidence levels prepared from the mixture of healthy corn seeds (commercial hybrid RB9006PRO) and inoculated corn seeds with the isolate CMLAPS805 of *Exserohilum turcicum*, for different periods, corresponding to the inoculum levels IL0 (0h), IL36 (36h), IL72 (72h), IL108 (108h) and IL144 (144h).

Inoculum level	N° of inoculated seeds	Incidence level (%)
IL36	1	0.25
	2	0.5
	4	1
	40	10
	400	100
IL72	1	0.25
	2	0.5
	4	1
	40	10
	400	100
IL108	1	0.25
	2	0.5
	4	1
	40	10
	400	100
IL144	1	0.25
	2	0.5
	4	1
	40	10
	400	100

#### *DNA extraction*

To obtain pure DNA from *Exserohilum turcicum*, the fungus was cultivated in 9 cm Petri dishes containing PDA medium. The colonies were kept in a BOD incubator for approximately 10 days, until the mycelium reached the edge of the plates, at  $25\pm 2$  °C and 12 h photoperiod. Then, the mycelia were carefully scraped off with a blade and ground with liquid nitrogen in a mortar until it become fine powder. An amount of 0.04g of this material was collected into 1.5 mL microtubes to proceed the DNA extraction. Also, colonies of other fungi that naturally infect corn seeds, such as *S. maydis*, *S. macrospora*, *F. verticillioides*, *R. solani* and *C. graminicola* were grown following the same procedures to obtain their DNA.

To extract the DNA from the mixture of healthy and inoculated seeds an A11 Basic IKA mill was used to ground each sample individually with liquid nitrogen. The samples

were ground in a crescent order of incidence level and after each maceration the mill was cleaned and disinfested with 70% alcohol. From each maceration, three subsamples were collected and transferred to 1.5 mL microtubes. Samples of healthy seeds were also macerated.

All DNA extractions were performed using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI), following the manufacturer's instructions. The DNA was quantified with a NanoDrop 3300 spectrophotometer (Thermo Scientific).

#### *Conventional and real-time PCR*

Specific pair of primers described by Chung et al. (2010), used for quantifying mycelial growth of *E. turcicum* in maize leaves, were tested and the cycle adjusted. The primers 5'-TCTTTTGCGCACTTGTTGTT and reverse: 5'-CGATGCCAGAACCAAGAGAT were tested to detect *E. turcicum* in both conventional PCR (PCR) and real-time PCR (qPCR) techniques.

The amplification of the 170 base pair fragments in the conventional PCR consisted of initially denaturation of 95 °C for 2 minutes and 30 cycles of denaturation of 95 °C for 15 seconds, annealing of 59.3 °C for 30 seconds and extension of 72 °C for 45 seconds, with final extension of 72 °C for 10 minutes. The amplifications were performed in a Multigene thermocycler (Labnet, NJ, USA). The products were evaluated in 1% agarose gel, stained with Gel Red® (Biotium), and observed in a L-PIX UV transilluminator (Loccus Biotecnologia, Brazil).

For the qPCR, the same conditions were used, except for the number of cycles, that were raised to 35. The reaction was performed in a Rotor-Gene 6500 thermocycler (Corbett Research, Mortlake, Australia) and the software Rotor-Gene version 1.7.75 (Corbett) were used to analyze the results.

#### *Evaluation of specificity and sensitivity of detection of E. turcicum*

After DNA extractions of *E. turcicum* and from other fungi commonly associated with corn seeds (*Stenocarpella maydis*, *S. macrospora*, *F. verticillioides*, *R. solani* and *C. graminicola*), tests were carried out to confirm the specificity of the primers, described by Chung et al. (2010), in conventional PCR. In addition, the pair of primers were checked regarding its sensitivity of detection through dilution series (10x), which ranged from 147 ng to 14.7 fg of the total genomic DNA of *E. turcicum*. The primers were used to verify their ability to detect the presence of the pathogen in samples of corn seeds with different incidence



levels (Table 1) both in conventional and qPCR. Ultrapure sterile water was used as negative control.

### Results and Discussion

The PCR products analyzed in electrophoretic analysis in 1.0% agarose gel and the DNA fragments obtained from the conventional PCR, generated single bands of 170 base pairs, indicating that the pair of primers used, as used by Chung et al. (2010), were specific for the species in study (Figure 1). The pair of primers described by 石姐姐 et al. (2016) were also tested but they were not able to detect the presence of the pathogen in the inoculated seeds.

The absence of reaction by the other species used in this work, such as *S. maydis*, *S. macrospora*, *F. verticillioides*, *R. solani* and *C. graminicola*, confirms this specificity of that technique to detect *E. turcicum* associated with corn seeds.

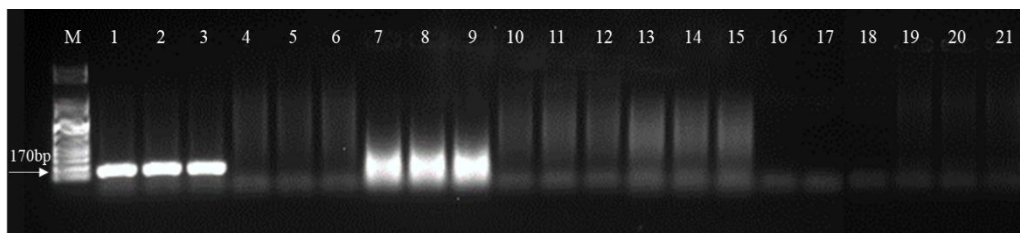


Figure 1. Specificity of the pair of primers (Chung et al., 2010) in the detection of *Exserohilum turcicum* by conventional PCR technique. M: 1 kb ladder (Qiagen GelPilot<sup>®</sup>); Columns 1-3: *Exserohilum turcicum*; 4-6: *Stenocarpella maydis*; 7-9: *S. macrospora*; 10-12: *Fusarium verticillioides*; 13-15: *Rhizoctonia solani*; 16-18: negative control; 19-21: *Colletotrichum graminicola*.

Based on this result, it is clear that the conventional PCR technique can be used as an alternative to routine laboratories to detect the presence of *E. turcicum* in corn seeds, since by that mean it is possible to get faster and reliable results than the biological method. Similar findings in studies with other pathogenic fungi reaffirm this possibility (Barrocas et al., 2012; Sousa et al., 2016; Gadaga et al., 2018).

In the test with DNA obtained from pure cultures of *E. turcicum* to access the limit of detection was observed that the pair of primers were able to detect low concentrations of the DNA (Figure 2), showing high sensitivity of the primers for detection in the present case. It was possible to detect the presence of the fungi in all dilutions used, from 14.7 fg/ $\mu$ L to 147 ng/ $\mu$ L.

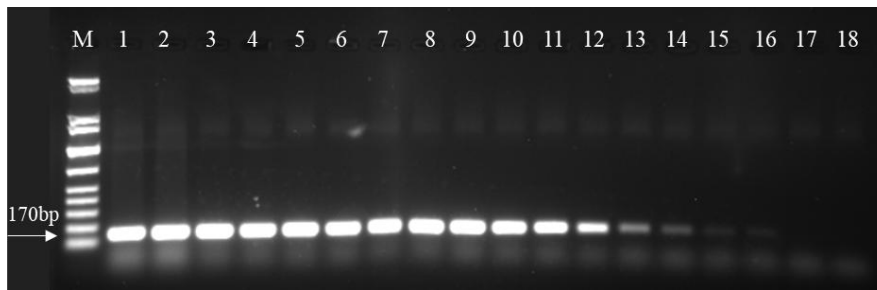


Figure 2. Limit of detection of the pair of primers (Chung et al., 2010) for *Exserohilum turcicum* by conventional PCR. M: 1 kb ladder (Qiagen GelPilot<sup>®</sup>); Columns 1-2: 147 ng; 3-4: 14.7ng; 5-6: 1.47ng; 7-8: 0.147ng; 9-10: 0.00147ng; 11-12: 0.000147ng; 13-14: 0.000147ng; 15-16: 0.0000147ng; 17-18: negative control.

Due to the great range of DNA quantities that the pair of primers were able to detect, it could be used to detect the presence of *E. turcicum* in mixtures of health and artificially inoculated seeds at different incidence levels. The fungus was detected in all inoculum levels with the minimum artificial incidence level of 0.25%, except in the inoculum level IL36, in which it could be detected in samples with incidence above 0.5% (Table 2). These results demonstrate the high sensitivity of the pair of primers used and the potential use of the conventional PCR technique to detect *E. turcicum* in corn seed samples with low inoculum of the fungi.

Table 2. Amplification of the genomic DNA of *Exserohilum turcicum* by conventional PCR, in 400 corn seeds samples with different levels of incidence and exposed to the fungus for different periods of time (IL36 - 36 h, IL72 - 72 h, IL108 -108 h, and IL144 - 144 h).

Inoculum level	Incidence of seeds inoculated with <i>Exserohilum turcicum</i> (%)	Detection in inoculated seeds by cPCR (positive results/replications)
Negative control	-	0/3
Positive control	+	3/3
IL36	0.25	0/3
	0.5	3/3
	1	3/3
	10	3/3
	100	3/3
IL72	0.25	3/3
	0.5	3/3
	1	3/3
	10	3/3
	100	3/3
IL108	0.25	3/3
	0.5	3/3
	1	3/3
	10	3/3
	100	3/3
IL144	0.25	3/3
	0.5	3/3
	1	3/3
	10	3/3
	100	3/3

Regarding the real-time PCR, the pair of primers described by Chung et al (2010) were specific and sensitive in the detection of *E. turcicum* in the corn seeds artificially inoculated with different amounts of the pathogen. A standard curve was generated using serial dilution from the pure DNA of *E. turcicum* (Figure 3a). The efficiency of the qPCR was of 1.03, as determined by the linear regression equation, with the mean values of the corresponding amplifications ( $r^2=0.99$ ) (Figure 3b).

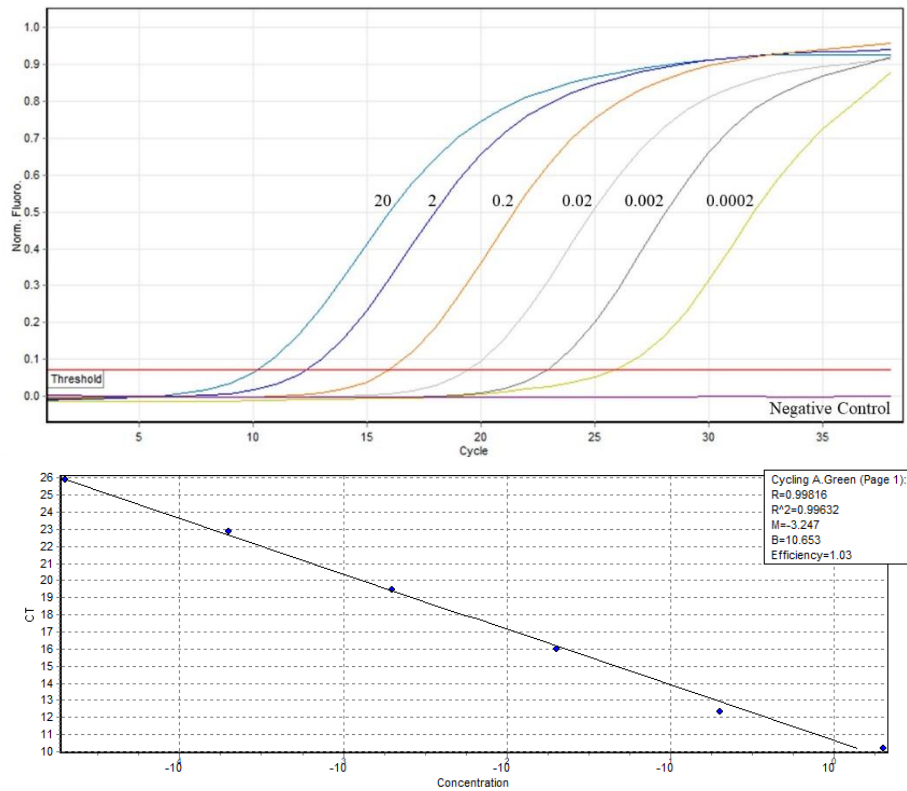


Figure 3. SYBR Green quantitative PCR amplification to detect and quantify *Exserohilum turcicum*. A. Amplification curve of serial dilutions of the target DNA, from 20 ng/ $\mu$ L to 200 fg/ $\mu$ L B. Standard curve; threshold cycles (Ct), graphically represented as a function of the logarithm values of dilution and fluorescence emitted during the reaction.

The results obtained from the qPCR reaction show that it was possible to quantify, from the standard curve, most of the genomic DNA of *E. turcicum* that was present in all inoculated corn seeds, except in the inoculum level IL36 at the lowest incidence of 0.25% (Table 3). The minimum amount of DNA that the primers were able to detect was 3.42E-07 fg/ $\mu$ L, found in the inoculum level IL36 with 0.5% of incidence, confirming the sensitiveness of the primers used. In average, it can be said that as the incidence level raised, the amount of *E. turcicum* DNA found in the samples increased as well, in all the inoculum levels, except in the IL108, where the amount of DNA was higher in the incidence level of 0.25% than in the 0.5%.

Table 3. Quantification of the genomic DNA of *Exserohilum turcicum* by real-time PCR, in corn seeds samples with different incidence levels of inoculated seeds (0.25%, 0.5%, 1%, 10% and 100%), treated with different inoculum levels IL36 - 36 h, IL72 - 72 h, IL108 -108 h, and IL144 - 144 h.

Incidence levels (%)	Quantification of <i>Exserohilum turcicum</i> (fg/ $\mu$ L) by qPCR			
	IL36	IL72	IL108	IL144
0.25	0	1.03E-06	7.21E-06	7.66E-07
0.5	3.42E-07	1.57E-06	4.58E-06	4.42E-06
1	9.23E-07	1.66E-06	9.80E-06	6.30E-05
10	6.56E-05	1.94E-04	5.09E-05	3.40E-04
100	9.90E-05	2.54E-04	1.67E-04	3.96E-03

Although both techniques have been sensitive to detect and quantify the DNA of *E. turcicum* in artificially inoculated corn seeds, they were not able to detect the pathogen in the lowest incidence level of 0.25% in seeds with inoculum level IL36. However it is reasonable to understand that result does not guarantee the absence of the fungus in the seed sample. It is important to consider that the seed fractions used for molecular analysis in laboratory are extremely small, composed by mixture of health and inoculated seeds in only three replicates of 40 mg sample. To assure the presence of the pathogen in the seeds, higher quantity of seed material should be processed and analyzed.

Combining molecular methods, such cPCR and qPCR, has been widely used as important tools to investigate the presence of pathogens in seeds, due to their accuracy, specificity, and reduced time to obtain results. For many pathosystems, those techniques have been used as alternatives for the biological method, blotter test, since they are able to detect small quantities of pathogens that occur in low incidence (Júnior et al., 2020; Guimarães et al., 2017; Gadaga et al., 2018). Despite their high sensitivity and specificity the molecular techniques should be used as part or complement of the protocol to detect pathogens in seeds in routine seed health analysis. The combination of molecular and biological methods should be therefore the correct procedure to be employed in seed health analysis (Botelho et al., 2015).

Although the maximum sensitivity of molecular detection of *E. turcicum* in corn seeds observed in this study was 0.5% it is relevant to consider that such sensitivity can be improved if an incubation period higher than 72 hours were adopted prior the DNA

extraction, as demonstrated in Table 3. The Bio PCR technique is a procedure successfully adopted in routine seed health analysis for some pathogens (Siqueira et al, 2014; Botelho et al., 2015) due to its advantage of increasing the detection sensitivity by increasing the number of target cells (Chih-Hung et al., 2009).

### Conclusions

The conventional and real-time PCR techniques are proved to be specific and able to detect *E. turcicum* in corn seed samples with minimum incidence of 0.50 % at the lowest inoculum level tested in this study.

The incubation of seeds for a minimum of 48 hours prior the extraction of DNA is a mean to improve the sensitivity of the techniques. By that pre-incubation of seeds, the PCR techniques were able to detect the pathogens in seed samples with 0.25% incidence.

### Acknowledgements

The authors thank the Universidade Federal de Lavras; the CNPq, CAPES and FAPEMIG for the financial support; Riber KWS Sementes for providing the corn seeds and Biological Institute of São Paulo for the isolate.

### References

- BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; ALMEIDA, M.F.; BOTELHO, L.S.; VON PINHO, E.V.R. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, v.34, n.2, p.218-224, 2012.  
<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v34n2/05.pdf>.
- BOTELHO, L.S.; BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; MARTINS, R.S. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds by conventional and quantitative PCR techniques. *Journal of Seed Science*, v.37, n.1, p.055-062, 2015.  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2317-15372015000100055](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372015000100055)
- CARDWELL, K. F.; SCHULTHESS, F.; NDEMAH, R.; NGOKO, Z. A systems approach to assess crop health and maize yield losses due to pests and diseases in Cameroon. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 65 (1997) 33-47.
- CHI-HUNG, L.; SHIH-TIEN, H.; KUO-CHING, T.; JAW-FEN, W. Detection of race 1 strains

of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. 2009. European Journal of Plant Pathology. 124:75 – 85. DOI 10.1007/s10658-008-9394-y.

CHUNG et al. Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize - *Setosphaeria turcica* pathosystem. BMC Plant Biology 2010, 10:103. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/103>

COTA, L. V.; SILVA, D. D.; COSTA, R. V. Helmintosporiose causada por *Exserohilum turcicum* na cultura do milho. Sete Lagoas. Circular técnica 195. Embrapa. 2013. 8p.

DE ROSSI, R. L.; REIS, E. M. Meio de cultura semisseletivo para o isolamento de *Exserohilum turcicum* de sementes de milho. Summa Phytopathologica, v.40, n.2, p.163-167, 2014.

GADAGA, S. J. C.; SIQUEIRA, C. S.; MACHADO, J. C.. Transmission potential of *Colletotrichum lindemuthianum* (race 65) in association with bean seeds under controlled conditions. J. Seed Sci., Londrina, v.42, e202042025, 2020.

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2317-15372020000100122&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372020000100122&lng=en&nrm=iso)>.

GOWDA, K. T. P.; SHETTY, H. S.; GOWDA, B. J.; PRAKASH, H. S.; SANGAM, L. 1992. Comparison of two methods for assessment of yield loss due to Turcicum leaf blight of maize. Indian Phytopathology 45: 316–320.

GUIMARÃES, M.R.F.; SIQUEIRA, C.S.; MACHADO, J.C.; FRANÇA, S.K.S.; GUIMARÃES, G.C. Evaluation of inoculum potential of pathogens in seeds: relation to physiological quality and DNA quantification by qPCR. *Journal of Seed Science*, v.39, n.3, p.224-233, 2017. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v39n3/2317-1545-jss-39-03-00224.pdf>

JÚNIOR, M. B. S., RESENDE, M. L. V., POZZA, E. A. et al. qPCR-based detection of *Colletotrichum truncatum* in soybean seeds. *Trop. plant pathol.* **45**, 550–555 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00380-7>

MACHADO, J.C. *Patologia de sementes: fundamentos e aplicações*. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107p.

- MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; COSTA, M.L.N.; GUIMARÃES, R.M; MACHADO, C. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* (Impresso), v.20, p.37-63, 2012.
- MICHEL, B.E.; RADCLIFFE, D.A. Computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. *Agronomy Journal*, v.87, n.1, p.131-136, 1995.
- NWANOSIKE, M. R., MABAGALA, R., KUSOLWA, P. M. (2015) Effect of Northern Leaf Blight (*Exserohilum turcicum*) severity on yield of maize (*Zea Mays* L.) in Morogoro, Tanzania. *Int. J. Sci.Res.* 4 (9): 466-475.
- PANT, S. K., KUMAR, P., CHAUHAN, V. S. (2000) Effect of Turcicum leaf blight on Photosynthesis in maize. *Indian Phytopathology* 54: 251-252
- SOUSA, M.V.; SIQUEIRA, C.S.; MACHADO, J.C. Conventional PCR for detection of *Corynespora cassiicola* in soybean seeds. *Journal of Seed Science*, v.38, n.2, p.085-091, 2016. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v38n2/2317-1545-jss-v38n2152049.pdf>
- TANAKA, M.A.S.; MACHADO, J.C. Patologia de sementes. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p.40-46, 1985.
- TUITE, J. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University. Lafayette, Indiana. 1969.
- WALCOTT, R. R. Detection of seedborne pathogens. *HortTechnology*, v.13, n.1, p.40-47, 2003. <http://horttech.ashspublications.org/content/13/1/40.full.pdf+html>
- 石妞妞, 杜宜新, 阮宏椿, 陈福如, 杨秀娟, 甘林. *Exserohilum turcicum* molecular detection primers and quick detection method. 2016



**ARTIGO 2****INFECTIVIDADE E EFEITOS DE *Exserohilum turcicum* EM SEMENTES DE MILHO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS**

INFECTIVITY AND EFFECTS OF *Exserohilum turcicum* ON CORN SEEDS UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Preparado de acordo com a Journal of Seed Science (versão preliminar)

Marina de Resende Faria Guimarães<sup>1</sup>, José da Cruz Machado<sup>1</sup>, Carolina da Silva Siqueira<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia de Sementes, Caixa Postal 3037, CEP 37200-900 Lavras, MG, Brasil. E-mail: mari16na@gmail.com, machado@ufla.br e kerolpet@gmail.com

## RESUMO

A mancha túrcica, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* é considerada uma das principais doenças foliares do milho e está presente em todas as áreas onde essa gramínea é cultivada. Diante deste cenário o objetivo neste trabalho foi estudar os efeitos, em diferentes temperaturas, da associação de isolados *E. turcicum* com sementes de milho com diferentes níveis de inóculo. Sementes de um híbrido de milho suscetível a este patógeno foram inoculadas por 24, 48, 72 e 96 horas para obtenção de quatro níveis de inóculo (NI24, NI48, NI72 e NI96) de dois isolados de *E. turcicum*, CMLAPS804 e CMLAPS805. Os efeitos do patógeno no desenvolvimento inicial do milho foi avaliado por meio dos seguintes testes: Germinação; Sanidade, Condutividade elétrica e emergência onde avaliou-se o Índice de velocidade de germinação, Estande Inicial e Final, Altura de Plantas, Peso de Plantas Frescas e Peso de Plantas Secas, índice de doenças, em ambiente de casa de vegetação com temperatura média de 19,3 °C, e em câmaras de crescimento com temperatura média de 20 °C e outra de 26 °C, durante 28 dias. De modo geral a presença de isolados de *E. turcicum* em sementes de milho foi prejudicial ao desenvolvimento das sementes inoculadas havendo variações entre os fatores utilizados para este tipo de avaliação. Especificamente o isolado CMLAPS804 causou maiores danos ao desenvolvimento do milho de acordo com a maioria das avaliações. A altura de plantas oriundas de sementes inoculadas com ambos isolados de *E. turcicum* não foi afetada ao contrário dos demais parâmetros de vigor, e germinação principalmente no maior nível de inóculo utilizado.

Termos para indexação: *Zea mays*, *Exserohilum turcicum*, mancha túrcica

## ABSTRACT

Turcicum leaf blight, caused by the fungus *Exserohilum turcicum* is considered one of the main leaf diseases of corn and is present in all areas where this grass is grown. Given this scenario, the main of this work was to study the effects, at different temperatures, of the association of *E. turcicum* isolates with corn seeds with different inoculum levels. Seeds of a susceptible corn hybrid were inoculated to obtain four levels of inoculum (N24, N48, N72 and N96) from two isolates of *E. turcicum*, CMLAPS804 and CMLAPS805. The effects of the pathogen on the initial development of corn was evaluated using the following tests: Germination; Health and electrical conductivity. Also the tests: Germination speed index, initial and final stand, plant height, weight of fresh and dry plants in greenhouse temperature with an average of 19.3 °C and in growth chambers with 20 °C and 26 °C, for 28 days. In general, the presence of *E. turcicum* isolates in corn seeds was detrimental to the development of the inoculated seeds, with variations between the factors used for this type of evaluation. Specifically, the isolate CMLAPS804 caused greater damage to corn development according to most evaluations. The height of plants from seeds inoculated with both isolates of *E. turcicum* was not affected, contrary to vigor, and germination mainly in the greater potential of inoculum used.

Index terms: *Zea mays*, *Exserohilum turcicum*, turcicum leaf blight

## INTRODUÇÃO

A mancha túrcica, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* é considerada uma das principais doenças foliares do milho e está presente em todas as áreas onde essa gramínea é cultivada, sendo os restos culturais do milho fator importante para a sobrevivência deste patógeno e início de uma epidemia no campo (Fullerton e Fletcher, 1974).

Considerando as condições climáticas e a susceptibilidade do híbrido, epidemias causadas pelo referido patógeno podem ocorrer com consequências desastrosas para os produtores de milho (Ramathani et al., 2011). As condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da mancha túrcica incluem umidade relativa entre 90 – 100%, baixa luminosidade e temperaturas moderadas, entre 15 e 25 °C. Após o estabelecimento da doença, este patógeno pode causar murcha da planta durante o período de enchimento de grãos, podendo resultar em perdas de produção que, geralmente, podem variar de 15 a 50% (Kloppers e Tweer, 2009; Nwanosike et al., 2015).

Muitos patógenos de plantas têm as sementes como seu principal meio de disseminação a novas áreas de cultivo, entretanto, a associação de *E. turcicum* com as sementes ainda não foi devidamente esclarecida. Alguns autores detalham o ciclo de vida de *E. turcicum*, mas não fazem referência a sua presença ou não em sementes de milho (Luttrell, 1958; Boosalis et al., 1967; White, 1999; Lipps e Mills, 2002). Sobre este patossistema existe carência de informações referentes aos efeitos do fungo sobre a germinação e vigor das sementes e o desenvolvimento inicial da cultura.

A hipótese formulada foi que a presença de *E. turcicum* nas sementes de milho, em diferentes níveis de inóculo, quando cultivada em diferentes ambientes causa redução da germinação e do vigor, resultando em menor desempenho das plântulas de milho em campo.

Diante do exposto e da falta de informações concretas na literatura sobre a verdadeira relação de *E. turcicum* com sementes de milho, é que se propôs este estudo tendo, portanto como intuito entender com mais detalhes o grau de associação de *E. turcicum* e os danos causados em sementes de milho sob diferentes temperaturas de cultivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório Central de Análise de Sementes, no Departamento de Agricultura, ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

**Origem e multiplicação dos isolados de *Exserohilum turcicum* e perfil das sementes:**

Foram selecionados dois isolados de *Exserohilum turcicum* para a realização do trabalho, sendo um obtido a partir de sementes de milho naturalmente infectadas pelo patógeno, identificado como CMLAPS804, e o outro, CMLAPS805, obtido da coleção micológica do Instituto Biológico de São Paulo. Ambos isolados foram, inicialmente, cultivados em meio de cultura Lactose Caseína Hidrolisada Ágar (LCHA) (TUIITE, 1969) em placas de Petri e mantidos em câmara do tipo BOD à temperatura de  $25\pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, foram obtidas culturas monospóricas dos isolados para uso na inoculação das sementes.

Foram utilizadas sementes de milho híbrido RB9006PRO (KWS), suscetível à mancha túrcica do milho com germinação de 94% e a partir do teste de sanidade, verificou-se que as sementes estavam livres de *E. turcicum*, apresentando com 21% das sementes com *Penicillium sp.* e 31,5% com *Fusarium verticillioides* (2009a, 2009b).

**Obtenção de sementes com diferentes níveis de inóculo de *E. turcicum*:**

foi utilizada a metodologia de inoculação por condicionamento hídrico (Machado et al., 2001). Inicialmente as sementes foram desinfestadas utilizando hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e então lavadas três vezes com água destilada e secadas entre folhas de papel germitest em sala climatizada a 20 °C por 48 horas. Paralelamente, colônias de *E. turcicum* dos isolados CMLAPS804 e CMLAPS805, oriundas de culturas monospóricas, foram crescidas em placas de Petri de 15cm com meio LCHA acrescido de manitol, com potencial hídrico ajustado a -1,4 MPa (Michel e Radcliffe, 1995). Após 15 dias de crescimento das colônias, as sementes de milho foram distribuídas sobre as colônias fúngicas, em camadas simples, de modo que o escutelo ficasse em contato direto com o fungo. As placas com as sementes foram mantidas em câmaras do tipo BOD, com temperatura de  $25\pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Os períodos de incubação foram estabelecidos em 24, 48, 72 e 96 horas, que corresponderam aos diferentes níveis de inóculo codificados por NI24, NI48, NI72 e NI96 respectivamente.

Decorridos os tempos de incubação, as sementes foram retiradas do contato com as colônias fúngicas e colocadas para secagem em sala climatizada com temperatura média de 19 °C entre folhas de papel germitest, por 48 horas. Para avaliação do efeito isolado do restritor hídrico, as sementes foram também colocadas em placas de Petri contendo apenas o meio LCHA acrescido de manitol pelos mesmos períodos mencionados e secas da mesma maneira descrita para sementes inoculadas, correspondendo ao tratamento controle.

### **Avaliação da incidência e efeitos de *Exserohilum turcicum* no desempenho das sementes de milho em condições de laboratório**

Para esta avaliação foram utilizados os seguintes testes: teste de sanidade, pela incubação em substrato de papel (“*blotter test*”) (Brasil, 2009b); teste de germinação pelo método de “rolo de papel” (Brasil, 2009a) e teste de vigor avaliado pela condutividade elétrica (CE) das sementes, conforme descrito por Krzyzanowski et al. (1999).

### **Avaliações dos efeitos de *Exserohilum turcicum* no desempenho das sementes de milho em diferentes ambientes de cultivo**

Os ensaios foram conduzidos em três ambientes de cultivo: (A) Casa de vegetação com temperaturas variáveis na faixa: 8,6 °C - 30,5 °C, com média de 19,3°C; e em duas câmaras de cultivo vegetal, B e C, com temperaturas variáveis nas faixas de 18 a 22 °C, com média de 20 °C e 24 a 28, com média de 26 °C respectivamente, e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK T10 40W 6500K FL40T10-6 60 Hz) /12 horas escuro. A casa de vegetação possuía sistema de irrigação automatizado, sendo que as irrigações ocorriam três vezes ao dia e a umidade relativa do ar média dentro desse ambiente durante a condução do experimento foi de 81,9%, nestas condições avaliou-se:

**a) Índice de Velocidade de Emergência (IVE).** Cem sementes de milho de cada tratamento foram distribuídas individualmente em copos plásticos de 200 mL contendo uma mistura autoclavada de substrato comercial (Tropstrato HA hortaliças saco de 25 kg) e areia na proporção 1:1. Os copos foram dispostos em grupos de 25 unidades por bandeja, sendo cada bandeja correspondente a uma repetição. Foram realizadas contagens diárias da emergência das plântulas a partir da emergência da primeira plântula até a estabilização do estande, por três dias consecutivos. Para a contagem da plântula emergida, foi adotado como critério, o rompimento do coleótilo pelas primeiras folhas. As plântulas permaneceram em câmara de crescimento até 28 dias após a semeadura (D.A.S). O índice de velocidade de emergência foi calculado de acordo com a fórmula descrita por Maguire (1962).

**b) Estande inicial e estande final.** O estande inicial das plântulas desenvolvidas nas câmaras de cultivo e na casa de vegetação foi registrado aos 6 dias após a semeadura. Os estandes finais dessas plantas foram registrados aos 28 dias após a semeadura. Os valores absolutos foram transformados em porcentagem.

c) **Altura de plantas.** Aos 28 dias após a semeadura, foram realizadas medições de 10 plantas aleatórias em cada repetição, que foram medidas desde a base do colo até o ápice foliar com o uso de uma régua graduada com precisão de milímetros.

d) **Peso da planta fresca e seca.** Aos 28 dias após a semeadura, as plantas emergidas foram cortadas na região do colo com o auxílio de uma lâmina de bisturi e todas as plantas de uma mesma repetição foram pesadas ainda frescas. Posteriormente foram mantidas em uma estufa com circulação forçada de ar, regulada a 70 °C, por 7 dias e, então pesadas novamente. Os resultados foram expressos em gramas (g).

e) **Índice de Doença (ID).** Para esta variável, lançou-se mão de uma escala arbitrária de notas de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6, onde 0 = plantas normais sem sintomas de infecção, 1= plantas com peso abaixo de 10% do peso de plantas oriundas de sementes não inoculadas, 2= plantas com peso acima de 10% do peso de plantas oriundas de sementes não inoculadas, 3= plantas com sintomas leves de infecção (até 30% em comparação com a testemunha), 4= plantas com sintomas severos de infecção (acima de 30% em comparação com a testemunha), 5= plantas mortas em pós-emergência, 6= sementes mortas. Os valores anotados foram submetidos a fórmula de McKinney (1923) que expressa valores médios percentuais de danos provocados pela doença em avaliação e os resultados foram expressos em porcentagem de plantas infectadas por *E. turcicum*.

$$ID = \frac{\sum(f.v)}{n.x} . 100$$

Onde: ID=Índice de doença (%); f= número de plantas com determinada nota; v= nota observada; n= número total de plantas avaliadas e x= grau máximo de infecção.

### **Delineamento Experimental e Análises estatísticas dos dados**

Para os testes de germinação, sanidade e condutividade elétrica, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e os dados submetidos à análise de variância em esquema fatorial duplo 2 x 4 (2 isolados e 4 níveis de inóculo), com quatro repetições por tratamento, e quando significativos, procedeu-se o ajuste de modelos de regressão linear.

O delineamento experimental dos testes de emergência, que avalia IVE, estande inicial e final, altura, peso da planta fresca e seca, e índice de doença, foi em blocos ao acaso (DBC), em esquema fatorial triplo 3 x 3 x 4 (3 ambientes de cultivo, 3 tratamentos – controle, CMLAPS804 e CMLAPS805 - e 4 níveis de inóculo), com quatro repetições por tratamento.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SISVAR<sup>®</sup> versão 5.6 (Ferreira, 2011). As médias das variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste de Scott Knott ( $P \leq 0,05$ ) e as quantitativas procedeu-se o ajuste de modelos de regressão linear.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de qualidade inicial das sementes de milho utilizadas neste trabalho, determinado por testes em laboratório, mostrou que as sementes estavam isentas de *E. turcicum*, e com 94% de germinação.

Pela análise de variância verifica-se que para o teste de sanidade houve interação dupla significativa entre os fatores: isolados do fungo e potencial do inóculo. Na variável resposta germinação não houve interação entre os fatores ( $p \leq 0,05$ ), e diferença significativa entre os isolados e os níveis de inóculo utilizados. Na variável resposta “condutividade elétrica” não houve interação entre os fatores e nem diferença significativa entre os dados. Para IVE, estande inicial, estande final, peso de planta fresca e seca e índice de doença observou-se interação tripla significativa nas análises de variância. Para a variável resposta altura, essa interação tripla não foi significativa, havendo diferença apenas entre os ambientes de cultivo ( $p \leq 0,05$ ).

No tratamento controle não foi observada a presença de *E. turcicum* em nenhum dos testes realizados neste trabalho, e não foram observados efeitos isolados do restritor hídrico manitol no desempenho das sementes.

### **Relação entre incidência de *E. turcicum* e qualidade fisiológica de sementes de milho em laboratório**

Observou-se tendência linear crescente da incidência do fungo com o aumento do nível de inóculo, que correspondeu aos aumentos dos tempos de exposição das sementes ao fungo (Figura 1). Estes resultados seguem os padrões de tendências já observados para outros patossistemas, que foram alvos de estudos anteriores dentro desta mesma linha de pesquisa (Botelho et al., 2013; Siqueira et al., 2014; Guimarães et al., 2017).

Os resultados observados nas avaliações das sementes do tratamento controle confirmaram a ausência do fungo em estudo em todos os níveis de inóculo utilizados. Na comparação entre os isolados do patógeno nos diversos níveis de inóculo, o isolado CMLAPS804 mostrou-se mais virulento que o isolado CMLAPS805, já que mesmo em



menores valores de nível de inóculo, a incidência foi mais alta, entretanto, a partir de 72h de inoculação, não houve diferença entre ambos isolados (Figura 1).

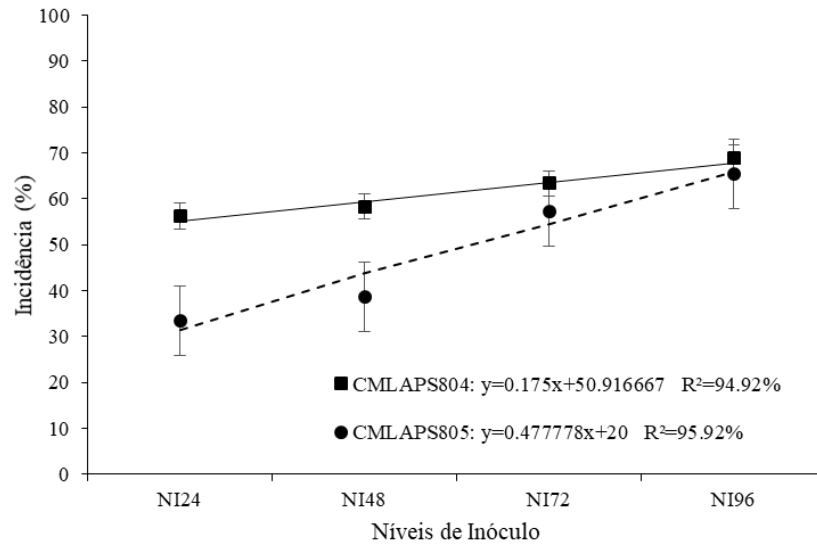


Figura 1. Incidência de *Exserohilum turcicum*, em sementes de milho com diferentes níveis de inóculo (NI24-24h, NI48-48h, NI72-72h, NI96-96h) com os isolados CMLAPS804 e CMLAPS805.

Verifica-se que nas condições em que foram realizadas as inoculações observou-se que a infecção das sementes utilizando o isolado CMLAPS804 foi mais acentuada que o isolado CMLAPS805. Valores próximos aos obtidos no maior tempo de exposição das sementes pode ser verificado no menor nível de inóculo, mostrando a agressividade deste isolado.

O percentual de germinação das sementes inoculadas sofreu reduções em função do aumento do nível de inóculo independente do isolado (Figura 2A). Pelos resultados do teste de germinação, verifica-se que a presença do fungo provocou reduções do percentual médio de germinação das sementes inoculadas. Observou-se que as sementes do tratamento controle tiveram o percentual de germinação reduzido em 14,7% em relação ao percentual de germinação inicial das sementes, com média de germinação de 94%. As sementes inoculadas com CMLAPS804 tiveram uma redução de 29,06% e apresentaram em média 64,94% de germinação, e as inoculadas com CMLAPS805 tiveram redução de 21,25% com média de

72,75%. Todos os tratamentos foram significativamente diferentes entre si, sendo que a maior redução ocorreu nas sementes inoculadas com o inóculo CMLAPS804 (Figura 2B).

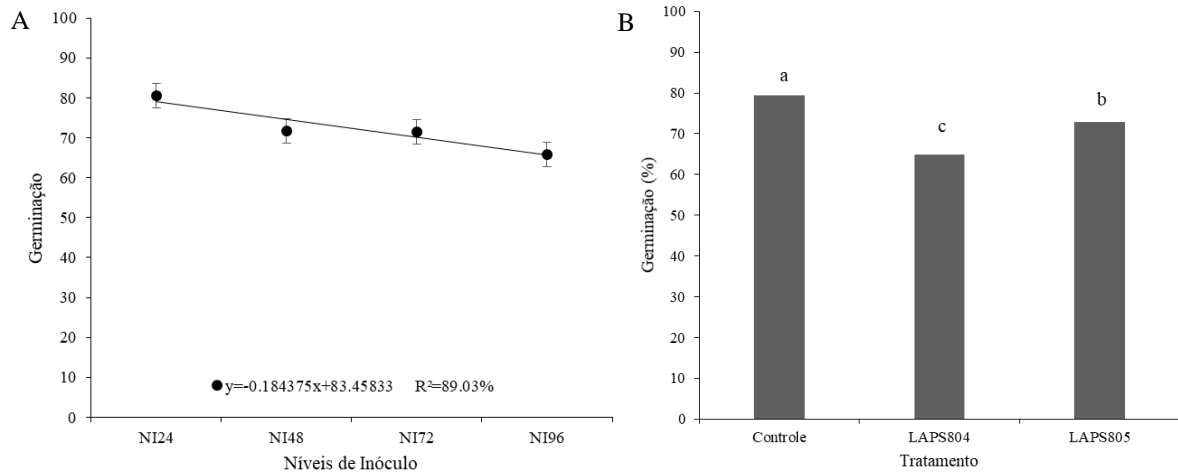


Figura 2. Tendência de percentuais de germinação de sementes de milho infectadas com isolados *Exserohilum turcicum* (CMLAPS804 e CMLAPS805) em diferentes níveis de inóculo, NI24, NI48, NI72 e NI96 (A) e médias de percentuais de germinação nos diferentes tratamentos utilizados, independentemente do nível de inóculo (B).

A presença de isolados de *E. turcicum* nas sementes de milho foi capaz de provocar efeitos negativos na formação de plântulas. Observou-se uma redução do percentual de germinação de maneira proporcional ao aumento do nível de inóculo, o efeito provocado pelo isolado CMLAPS804 foi mais acentuado em relação ao isolado CMLAPS805. Tais resultados condizem com os resultados observados no blotter test, em que as sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804 apresentaram maior incidência de *E. turcicum* em comparação com os resultados observados para o isolado CMLAPS805. Embora em proporções relativamente distintas, esses resultados demonstram uma similaridade de comportamento desta interação com outros patossistemas já estudados por Zancan et al. (2015), Siqueira et al. (2014) e Guimarães et al. (2017).

Em relação aos efeitos dos isolados de *E. turcicum* no vigor das sementes, avaliado pelo teste de condutividade elétrica, não houve diferenças entre o tratamento controle e os isolados e nem entre os diferentes níveis de inóculo utilizados neste estudo. Por este teste, valores mais elevados de condutividade elétrica indicam menor vigor das sementes. Neste estudo, a estabilização da produção de exsudatos pelas sementes inoculadas,

independentemente do nível de inóculo, revela que este patógeno não foi capaz de desestruturar as membranas celulares das sementes durante os períodos em que as sementes permaneceram em contato físico com o fungo durante o processo de inoculação. Vale lembrar que *E. turcicum* por se enquadrar como um fungo hemibiotrófico (Horbach et al., 2011; Koeck et al., 2011), pode não ter apresentado habilidade suficiente para desestruturar as células parasitadas das sementes no período de contato entre sementes e fungo, estabelecido neste trabalho. Uma outra hipótese que pode explicar estes resultados seria a atuação do restritor hídrico, manitol, utilizado no processo de inoculação como um fator de reparação de danos de membranas celulares, efeito *priming*, que ocorrem em procedimentos de condicionamento fisiológico de sementes, conforme prática adotada em tecnologia de sementes com o intuito de potencializar a germinação das sementes em um dado lote (Hilhorst e Leprince, 1998; Sanchez et al., 2001). Estes resultados sugerem que provavelmente os danos provocados pelo fungo ocorrem em fases mais tardias da germinação, após a protrusão da radícula, fase a partir da qual o teste de condutividade elétrica não atinge.

#### **Efeitos de *E. turcicum* no desenvolvimento inicial do milho em condições controladas de cultivo (teste de emergência)**

Na avaliação do índice de velocidade de emergência (IVE) houve interação tripla significativa entre ambientes de cultivo, os isolados e os níveis de inóculo de *E. turcicum*.

Observa-se que nos dois ambientes com temperaturas médias de 19,3 °C e 20 °C o fungo não exerceu influência diferencial na velocidade de germinação das sementes independente dos níveis de inóculo considerados neste estudo. Por sua vez em ambiente com condições mais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, temperaturas mais altas com média em torno de 26 °C, foi possível observar uma clara influência do patógeno no índice de velocidade de emergência. Observa-se que houve redução do IVE, nos níveis NI24, NI48 e NI72, quando as sementes foram inoculadas com o isolado CMLAPS804, enquanto que para o isolado CMLAPS805 nestes mesmos níveis não diferiu do controle. Já no maior nível de inóculo, NI96, observa-se o contrário, ou seja, as sementes que foram inoculadas com isolado CMLAPS804 apresentaram maiores valores de IVE, em relação ao isolado CMLAPS805 e controle, que não diferiram entre si (Figura 3).

Na comparação entre isolados, ficou evidenciado que os maiores danos foram provocados pelo isolado CMLAPS804 na maioria das vezes em que foram verificadas diferenças significativas. Este fato confirma uma maior agressividade deste isolado às sementes de milho. Entretanto em níveis de inóculo mais elevados, houve diferenças não

consistentes já que os prejuízos observados no tratamento controle e no CMLAPS805 foram maiores que os observados no CMLAPS804, mas independentemente do tipo de inóculo o IVE foi menor do que nos demais tempos de inoculação.

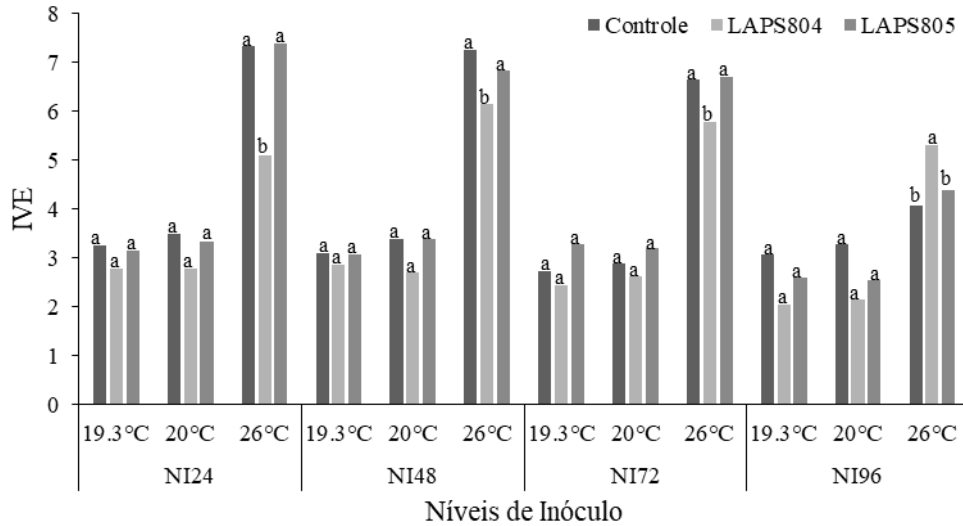


Figura 3. Médias do índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de milho inoculadas com dois isolados de *Exserohilum turcicum*, CMLAPS804 e CMLAPS805, em diferentes níveis de inóculo NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h) sob três temperaturas de cultivo (19,3, 20 e 26 °C), comparados com o tratamento controle.

Pela avaliação de IVE neste ensaio não foi possível observar uma variação significativa deste índice entre os níveis de inóculo do patógeno nos ambientes de cultivo com temperatura média de 19,3 °C e 20 °C. Possivelmente a baixa temperatura de cultivo foi desfavorável tanto para o desenvolvimento do fungo quanto para a velocidade de emergência das sementes de milho.

No tratamento controle, o IVE teve tendência de estabilidade nas temperaturas de 19,3 °C e 20 °C, enquanto que na temperatura de 26 °C, onde o IVE foi, em todos os níveis de inóculo, mais alto em relação as demais temperaturas, houve tendência de redução com o aumento dos níveis de inóculo (Figura 4). Talvez nesta temperatura o maior tempo de exposição das sementes ao meio tenha sido prejudicial ao bom desempenho das sementes.

Para as sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804, também se observa tendência de estabilidade nas temperaturas de 19,3 °C e 20 °C e tendência de aumento na temperatura de 26 °C à medida que se aumentou os níveis de inóculo (Figura 4).

Nas sementes inoculadas com o isolado CMLAPS805, verifica-se tendência de redução nos valores de IVE com o aumento dos níveis de inóculo. Na temperatura de 26 °C o IVE foi em todos os níveis de inóculo mais alto em relação as demais temperaturas (Figura 4).

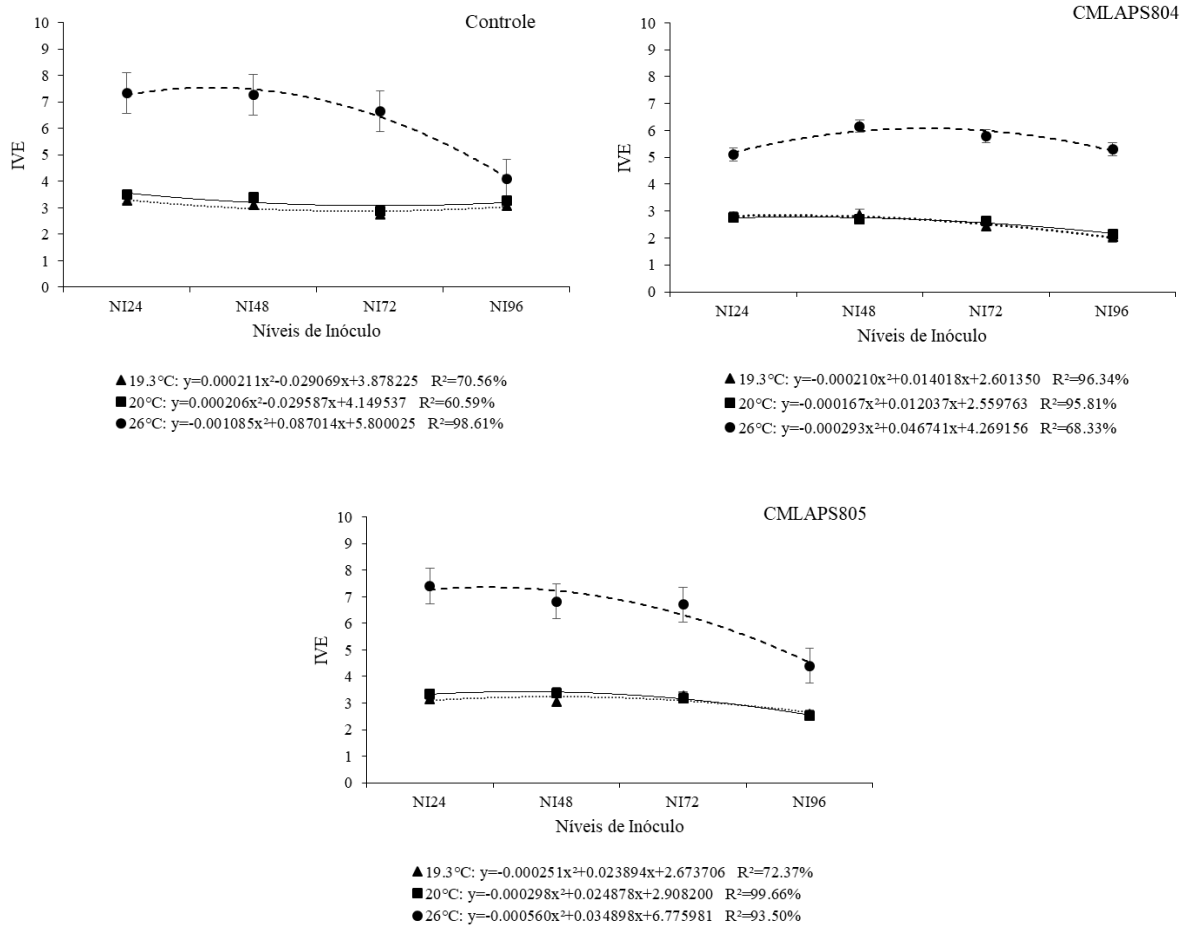


Figura 4. Índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de milho provenientes de sementes não inoculadas e inoculadas com dois isolados de *Exserohilum turcicum*, CMLAPS804 e CMLAPS805, em diferentes níveis de inóculo, NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h).

Em condições de temperatura mais elevada, média de 26 °C, observou-se que os valores de IVE foram mais elevados, o que comprova o favorecimento desta condição para a germinação das sementes de milho. Nesta temperatura houve uma maior influência do nível de inóculo do isolado CMLAPS805 em comparação com o isolado CMLAPS804.

Em relação ao estande inicial de plantas, Figura 5, observa-se que na temperatura de 19,3 °C, apenas no nível de inóculo NI72, houve diferença significativa entre os isolados. Nesta situação o maior estande pode ser verificado nas sementes inoculadas com o isolado

CMLAPS805. O estande resultante da inoculação de sementes com o isolado CMLAPS804 foi igual ao estande referente ao tratamento controle. Na temperatura de cultivo de 20 °C, e para o nível de inóculo NI48, o estande foi menor nas sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804 em comparação com CMLAPS805, que foi igual ao controle. No nível de inóculo NI96, ainda a 20 °C, o maior estande foi observado no controle e não houve diferença significativa entre estandes provenientes das sementes inoculadas com os isolados. Nessa temperatura, nos demais níveis de inóculo não houve diferenças entre os tratamentos. Na temperatura ideal para o cultivo do milho (26 °C) houve diferenças entre isolados no nível de inóculo NI24 quando o estande foi menor para o isolado CMLAPS804, já no tempo de 96h de inoculação ocorreu o contrário ou seja o estande foi maior para esse mesmo isolado (Figura 5).

Neste caso, observa-se também menores valores de estandes iniciais associados ao isolado CMLAPS804 na maioria dos casos em que houve diferenças, confirmando também por este teste, a maior virulência deste isolado.

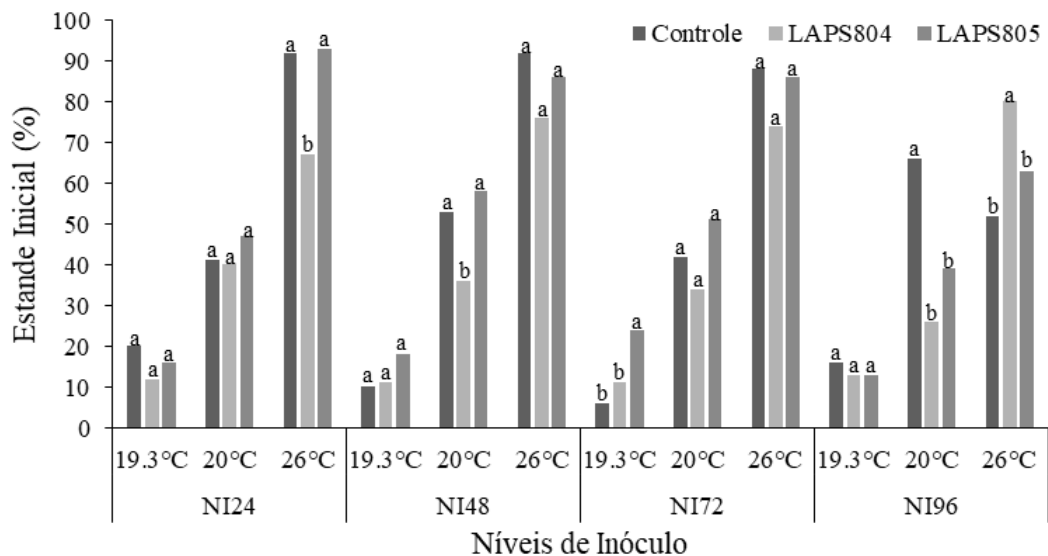


Figura 5. Estande inicial de plantas de milho crescidas de sementes inoculadas com *Exserohilum turcicum* isolado em quatro níveis de inóculo (NI24-24h, NI48-48h, NI72-72h, NI96-96h) mantidas a 20 °C e 26 °C.

No tratamento controle observa-se variações no estande em função dos níveis de inóculo em cada uma das temperaturas utilizadas. Verifica-se que a 26 °C houve tendência de aumento do estande entre os menores níveis de inóculo, NI24 e NI48, seguida de tendência de redução do estande nos níveis de inóculo maiores. Nos ambientes de cultivo com

temperaturas médias de 20 °C e 19,3 °C a tendência foi de queda nos níveis de inóculo mais baixos e aumento do estande nos mais altos (Figura 6).

Na Figura 6 também estão representadas as variações no estande inicial em função das temperaturas utilizando-se o isolado CMLAPS804, observa-se que houve tendência de aumento do estande com o aumento do nível de inóculo na temperatura de 26 °C e de redução do estande com o aumento do nível de inóculo na temperatura de 20 °C. Na temperatura de 19,3 °C houve uma tendência de estabilidade do valor do estande, independentemente do nível de inóculo.

O estande inicial das sementes inoculadas com o isolado CMLAPS805 apresentou tendência de aumento nos menores níveis de inóculo e redução nos maiores, tanto na temperatura de 19,3 °C como em 20 °C (Figura 6). Em 26 °C houve tendência à estabilidade quando o nível de inóculo variou de NI24 para NI48, seguida de tendência à redução do estande nos níveis mais altos.

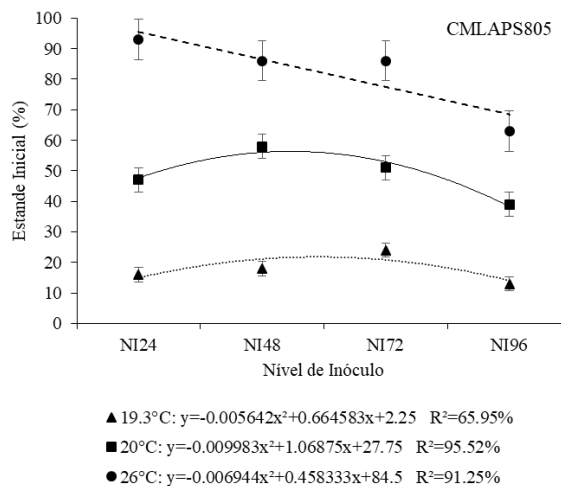
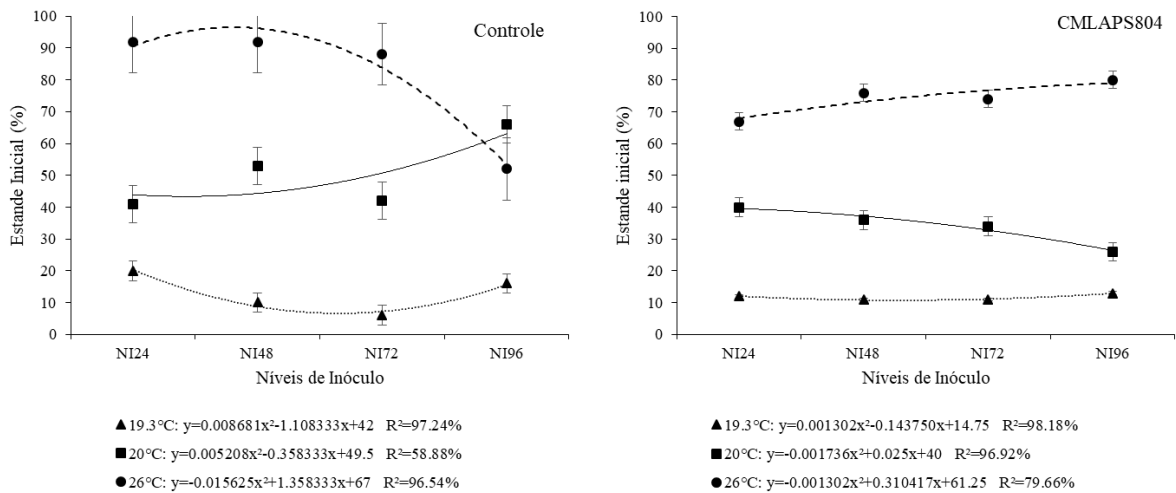


Figura 6. Estande inicial de plantas de milho oriundas de sementes não inoculadas e inoculadas artificialmente com isolados de *Exserohilum turcicum*, CMLAPS804 e CMLAPS805, em diferentes níveis de inóculo (NI24, NI48, NI72 e NI96) crescidas em três temperaturas de cultivo (19.3 °C, 20 °C e 26 °C).

O fato das temperaturas na casa de vegetação terem apresentado variações de maior amplitude, com mínimas atingindo 8 °C e média em torno de 19,3 °C, pode explicar os valores muito baixos de estandes iniciais em relação à temperatura de 20 °C. No ambiente de temperaturas mais estáveis e próximas a 20 °C, o estande apresentou valores intermediários.

Pela análise estatística dos valores de estandes finais, observou-se interação tripla significativa entre a temperatura de cultivo, os tratamentos e os níveis de inóculo do patógeno. Na Figura 7 estão apresentadas as diferenças observadas no estande final de plantas de milho oriundas de semeio em diferentes ambientes (19,3 °C; 20 °C e 26 °C), em função dos níveis de inóculo, com dois isolados CMLAPS804 e CMLAPS805, e controle.

No ambiente 19,3 °C as diferenças foram observadas nos níveis inóculo NI72 e NI96, sendo que no nível NI72 o estande final foi maior quando as sementes foram inoculadas com o isolado CMLAPS805, diferindo significativamente dos estandes finais obtidos com o isolado CMLAPS804 e controle, sendo estes, semelhantes estatisticamente entre si. No nível NI96 o menor valor de estande final foi observado quando as sementes foram inoculadas com o isolado CMLAPS804. O estande final das plantas oriundas das sementes inoculadas com o isolado CMLAPS805 foi intermediário e significativamente menor que o estande final observado nas plantas do tratamento controle (Figura 7).

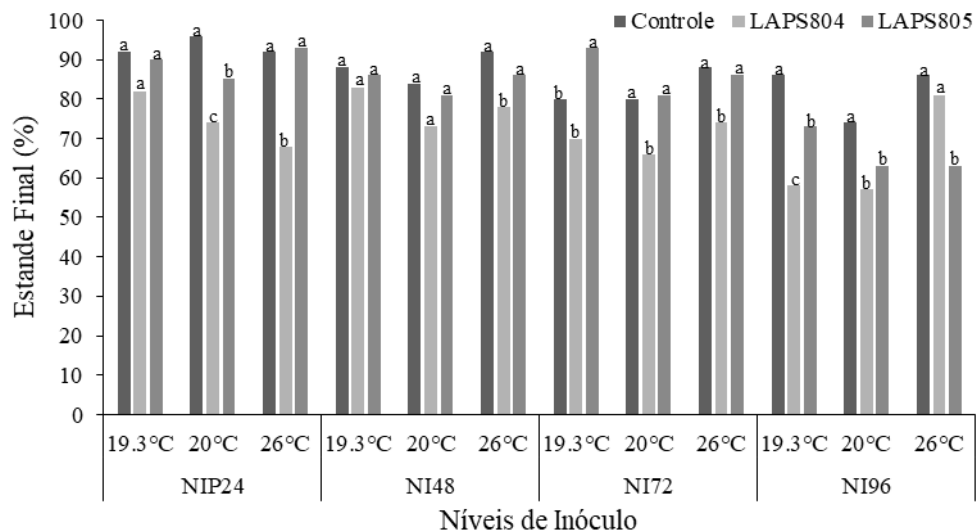


Figura 7. Estande final de plantas de milho oriundas de sementes inoculadas com *Exserohilum turcicum*, isolados CMLAPS804 e CMLAPS805, em quatro níveis de inóculo NI24



(24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h), sob três temperaturas 19,3 °C, 20 °C e 26 °C.

No ambiente de 20 °C não houve diferenças em função dos tratamentos apenas no nível de inóculo NI48. No nível NI24 o maior estande final foi observado no tratamento controle seguido pelo estande observado no isolado CMLAPS805 e o menor estande final foi observado para o isolado CMLAPS804. No nível NI72 não houve diferenças significativas entre o valor do estande final obtido de sementes do tratamento controle e inoculadas com o isolado CMLAPS805. O menor estande ocorreu com o isolado CMLAPS804. Quando no nível NI96, o estande final foi estatisticamente semelhante entre os isolados e menores que o estande observado no controle (Figura 7).

Nos níveis de inóculo NI24, NI48 e NI72 os estandes finais das plantas crescidas no ambiente de 26 °C e inoculadas com o isolado CMLAPS804, foram menores que os estandes obtidos das sementes inoculadas com o isolado CMLAPS805 e controle, que foram semelhantes entre si. No NI96 os estandes foram semelhantes quando a inoculação foi com o isolado CMLAPS804 e controle e maiores que aquele observado no isolado CMLAPS805 (Figura 7).

As variações entre os estandes finais em função dos diferentes níveis de inóculo (24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas) e ambientes (19,3 °C, 20 °C e 26 °C) em cada um dos isolados (CMLAPS804, CMLAPS805 e controle) são apresentadas na Figura 8.

Observa-se tendência de estabilidade entre os estandes finais provenientes do tratamento controle, nos diversos níveis de inóculo quando a temperatura foi de 26 °C. Na temperatura de 20 °C o estande final reduziu a medida que o nível de inóculo aumentou, enquanto que na temperatura de 19,3 °C a tendência foi redução do estande em níveis de inóculos mais baixos (NI24 e NI48) e aumento nos níveis mais altos (NI72 e NI96) (Figura 8).

Os resultados de estande final obtidos das sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804, quando conduzido na temperatura de 26 °C mostram uma tendência de aumento do estande à medida que aumentou o nível de inóculo. Já nos ambientes de 19,3 °C e 20 °C houve uma tendência de redução do estande final a medida em que o nível de inóculo foi aumentado (Figura 8).

Na Figura 8 também são apresentadas as tendências das variações do estande final em função dos níveis de inóculo e temperatura quando o tratamento foi o isolado CMLAPS805. Nos ambientes de 26 °C e 20 °C houve tendência de estabilidade nos valores do estande final

nos níveis de inóculo menores e de redução nos níveis mais altos. No ambiente de 19,3 °C houve tendência de aumento do estande final nos níveis de inóculo menores e de redução nos maiores.

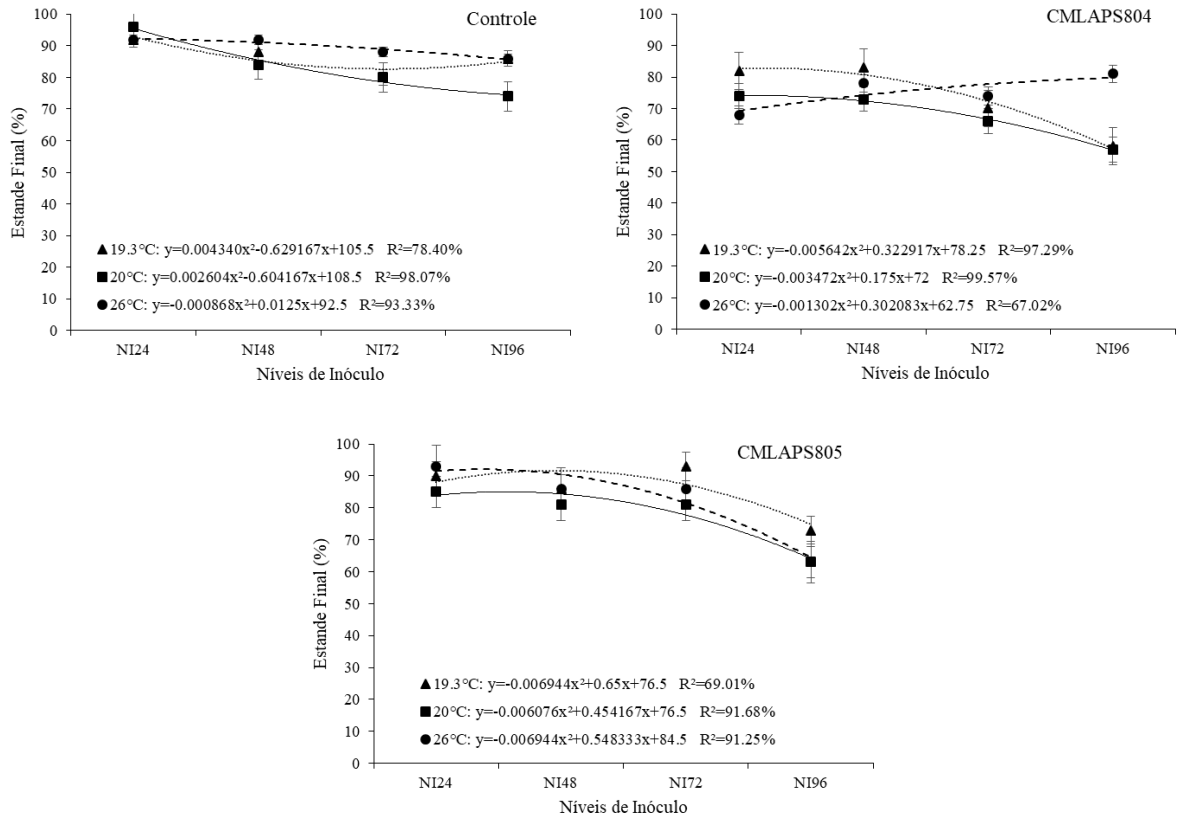


Figura 8. Estande final de plantas de milho oriundas de sementes não inoculadas e artificialmente inoculadas com dois isolados de *Exserohilum turcicum*, CMLAPS804 e CMLAPS805, em quatro níveis de inóculo NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h), em três ambientes de cultivo 19,3 °C, 20 °C e 26 °C.

Com base nos resultados de estandes finais, fica claro que houve uma recuperação do número de plantas nas temperaturas mais baixas em relação às temperaturas mais altas. Por este teste também não se observa clara influência do patógeno no número de plantas emergidas.

Quando comparando as alturas das plantas provenientes das sementes inoculadas com os diferentes níveis de inóculo, apenas houve diferença significativa entre os ambientes de cultivo, sendo que as plantas cultivadas na temperatura de 26 °C apresentaram alturas maiores que as cultivadas na temperatura de 20 °C e estas, maiores que as cultivadas sob a temperatura de 19,3 °C (Figura 9).

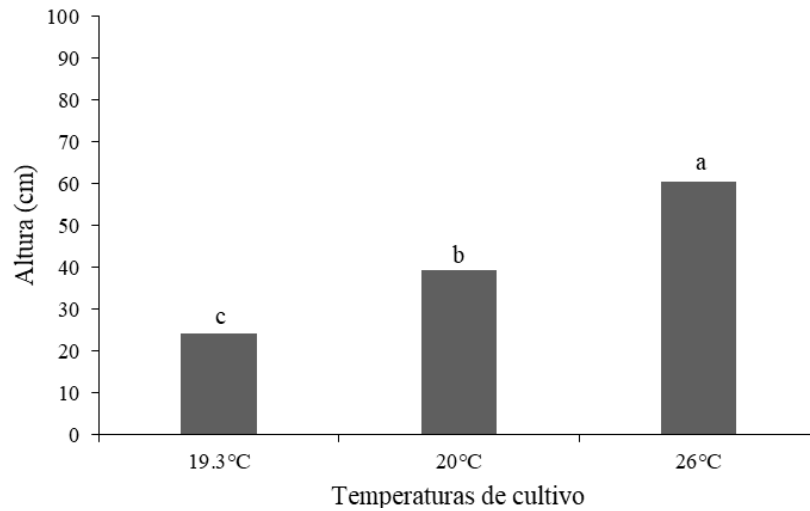


Figura 9. Altura média (cm) de plantas crescidas a partir de sementes de milho inoculadas com os isolados CMLAPS804 e CMLAPS805 de *Exserohilum turcicum* em diferentes níveis de inóculo NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h) em três ambientes de cultivo (19,3, 20 e 26 °C).

Por estes resultados nota-se que a presença do fungo nas sementes, em diferentes níveis de inóculo, não afetou o crescimento das plantas, e que apenas a temperatura influenciou nesse resultado. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de este ser um fungo mais prejudicial nos estágios mais avançados das plantas de milho, não afetando o crescimento e desenvolvimento da plântula emergida (White, 1999).

Para os pesos das plantas frescas quando o experimento foi conduzido a 19,3 °C, somente no nível NI24 houve diferenças no peso de plantas frescas, sendo o menor valor observado quando as sementes foram inoculadas com o isolado CMLAPS804. Os valores para CMLAPS805 e Controle foram semelhantes entre si (Figura 10).

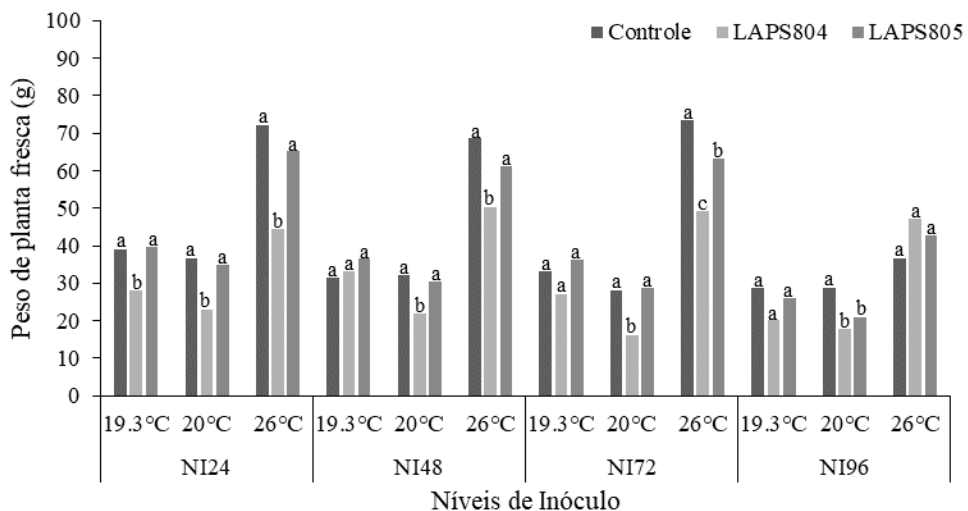


Figura 10. Pesos médios de plantas frescas oriundas de sementes inoculadas com os isolados CMLAPS804 e CMLAPS805 de *Exserohilum turcicum*, em diferentes tempos de contato (NI24-24h, NI48-48h, NI72-72h, NI96-96h), mantidas em diferentes ambientes (19,3 °C, 20 °C e 26 °C).

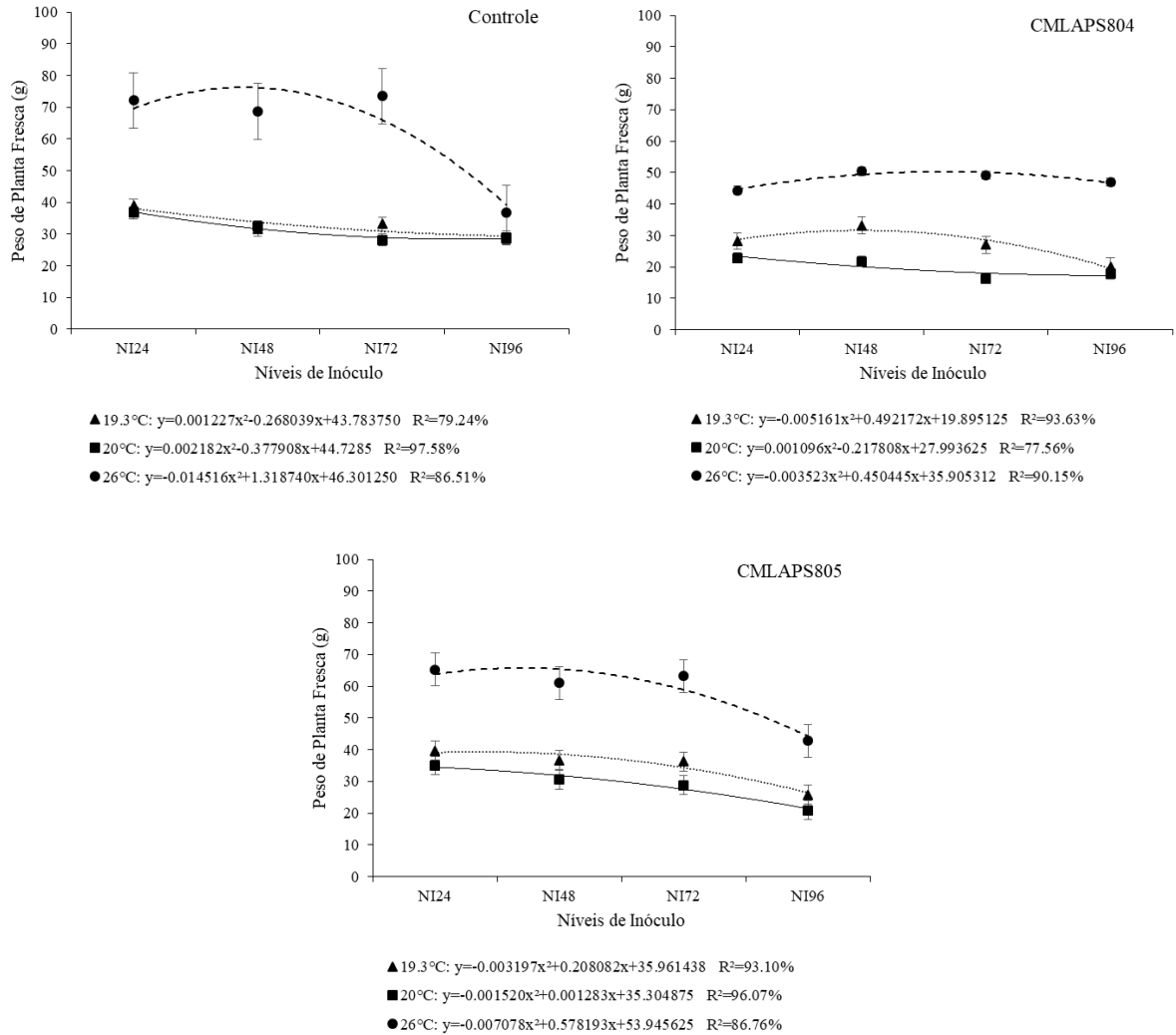
Na temperatura de 20 °C, nos níveis de inóculo de NI24, NI48 e NI72, plantas oriundas de sementes inoculadas com os isolados CMLAPS805 e Controle tiveram seus pesos estatisticamente iguais e maiores que o peso observado nas plantas de CMLAPS804. No NI96, o maior peso de plantas frescas foi observado no Controle, e o menor, observado nas plantas de sementes inoculadas com os isolados, que foram iguais entre si (Figura 10).

No ambiente de 26 °C, em NI24 e NI48, o menor peso de plantas frescas foi observado para o isolado CMLAPS804. Nas plantas inoculadas com o isolado CMLAPS805 e Controle os pesos de plantas frescas foram maiores e semelhantes entre si. No NI72 o menor peso das plantas foi observado para o isolado CMLAPS804, com valor intermediário para o isolado CMLAPS805 e o maior valor observado para o Controle. No nível de inóculo de 96 horas, não houve diferenças entre os tratamentos (Figura 10).

Com esses resultados pode-se observar que as plantas derivadas de sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804 tem menor peso de planta fresca, reafirmando consistentemente a maior virulência desse isolado.

Na figura 11 estão representadas as tendências das variações nos pesos de plantas frescas, nos ambientes de 19,3 °C, 20 °C e 26 °C nos níveis de inóculo NI24, NI48, NI72 e NI96.

Nas sementes do tratamento controle, os valores do peso de plantas frescas tiveram tendência de redução com o aumento do tempo de condicionamento, nas temperaturas de 19,3



°C e 20 °C. Já na temperatura de 26 °C os valores no peso de plantas frescas foram destacadamente maiores que nas demais temperaturas, com tendência de aumento nos níveis menores e redução nos maiores (Figura 11).

Figura 11. Valores médios do peso das plantas frescas originadas de sementes sem inoculação e inoculadas com dois isolados CMLAPS804 e CMLAPS805 de *Exserohilum turcicum*, por 24, 48, 72 e 96h, correspondendo aos níveis de inóculo NI24, NI48, NI72 e NI96 respectivamente, sob diferentes temperaturas (19,3 °C, 20 °C e 26 °C).

Quando as sementes foram inoculadas com o isolado CMLAPS804, os pesos frescos das plantas aumentaram nos níveis de inóculo menores e diminuíram nos maiores, quando a temperatura do teste foi de 19,3 °C. Na temperatura de 20 °C, o peso das plantas frescas teve tendência de redução na medida em que o nível de inóculo aumentou. Quando conduzido a 26

°C, os pesos de plantas frescas foram maiores em todos os níveis de inóculo, com tendência de aumento nos níveis menores e redução nos maiores (Figura 11).

Em relação ao isolado CMLAPS805 observa-se tendência semelhante nos três ambientes. Houve redução nos valores de peso das plantas frescas com o aumento do nível de inóculo. Em todos os níveis de inóculo os valores de peso de plantas frescas foram menores em temperatura de 20 °C, intermediários em 19,3 °C e maiores em 26 °C (Figura 11).

Na Figura 12 pode-se observar a representação das variações dos pesos das plantas secas quando as sementes não foram inoculadas (Controle) e quando foram inoculadas com os dos isolados de *E. turcicum* nos diferentes níveis de inóculo, e os testes conduzidos nos três ambientes. No tempo de condicionamento de 24h (NI24) e ambiente de 19,3 °C, o menor valor do peso de plantas secas foi observado nas plantas oriundas de sementes com o isolado CMLAPS804. Os valores do Controle e do isolado CMLAPS805 foram maiores e iguais entre si. Nessa mesma temperatura, nos níveis NI48 e NI72, não houve diferenças entre os tratamentos. No NI96, os maiores valores foram observados no controle e, nos isolados, foram menores e semelhantes entre si (Figura 12).

No ambiente de 20 °C e NI24 e NI48 o menor valor do peso de plantas secas foi observado quando as plantas foram originadas de sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804. No controle e quando o inóculo foi CMLAPS805 os valores foram maiores e iguais entre si. No NI72 e ambiente de 20 °C, não houve diferenças entre os tratamentos. Nessa mesma temperatura e em NI96, o maior valor do peso de plantas secas foi observado no Controle e nas sementes inoculadas com os isolados, os valores foram menores e iguais entre si (Figura 12).

No ambiente de 26 °C, nos níveis de NI24 e NI48, o menor valor do peso das plantas secas foi observado nas plantas de sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804. Quando o isolado foi CMLAPS805 e no controle, os valores foram maiores e iguais entre si. No nível NI72, o menor valor também foi observado no isolado CMLAPS804 e as plantas inoculadas com o isolado CMLAPS805 tiveram valor intermediário, e no controle observou-se o maior valor. No NI96 horas não houve diferença entre os tratamentos (Figura 12).

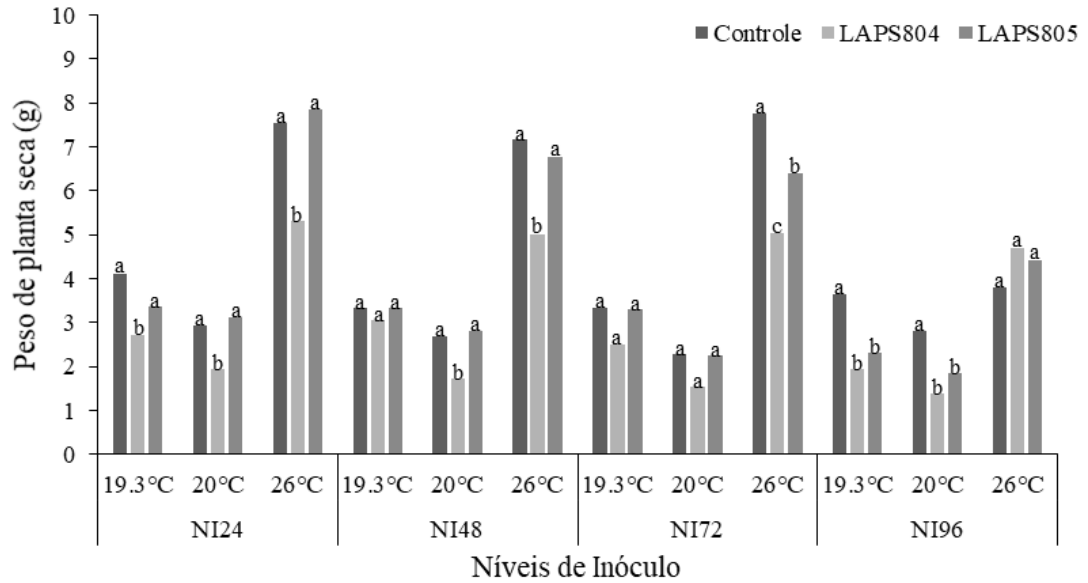


Figura 12. Pesos médios de plantas secas oriundas de sementes inoculadas com dois isolados de *Exserohilum turcicum* (CMLAPS804 e CMLAPS805), em diferentes níveis de inóculo, NI24-24h, NI48-48h, NI72-72h, NI96-96h, mantidas em diferentes temperaturas (19,3 °C, 20 °C e 26 °C).

Na figura 13, observa-se que quando as sementes não foram inoculadas, no ambiente com de 20 °C, os valores do peso de plantas secas, foram menores nos menores tempos de condicionamentos. Em todos os níveis nesse ambiente, os valores foram mais baixos que nas demais temperaturas. Quando o experimento foi conduzido a 19.3 °C, as tendências dos valores foram semelhantes aqueles da temperatura 20 °C, mas com valores intermediários entre as temperaturas 20 °C e 26 °C, em todos os níveis de inóculo. Na temperatura de 26 °C, os valores foram mais altos em relação aqueles observados nas outras temperaturas e as tendências foram de aumento nos níveis menores e acentuada redução nos mais elevados.

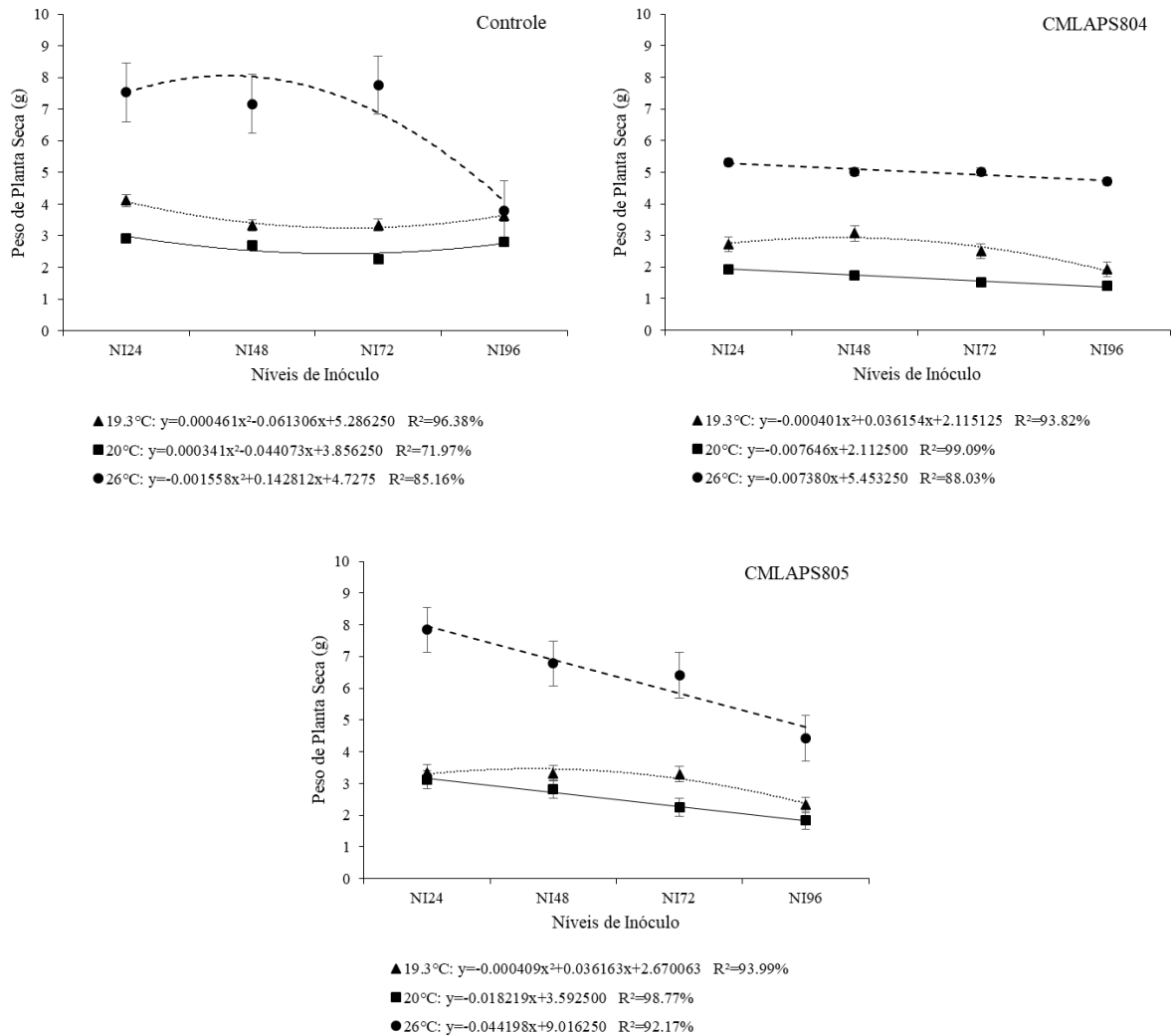


Figura 13. Peso das plantas secas crescidas a partir de sementes de milho não inoculadas (A) e inoculadas com os isolados CMLAPS804 (B) e CMLAPS805 (C) de *Exserohilum turcicum* em diferentes níveis de inóculo NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h) sob três ambientes de cultivo (19,3, 20 e 26 °C).

Nas plantas oriundas de sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804, observa-se no ambiente de 19,3 °C tendências de redução dos valores de peso de plantas secas. Ocorreram variações crescentes nos níveis de inóculo mais baixos e decrescentes nos mais altos. Nos ambientes de 20 °C e 26 °C a tendência dos valores do peso de plantas secas foi linear decrescente à medida que aumentou o tempo de inoculação. Os valores observados quando o experimento foi conduzido a 20 °C foram os mais baixos em todos os níveis de inóculo e os valores a 26 °C foram os mais altos (Figura 13).

As tendências dos valores de plantas secas oriundas de sementes inoculadas com o isolado CMLAPS805 estão apresentadas na Figura 13. No ambiente de 19,3 °C, os valores



foram intermediários entre os dois outros ambientes de cultivo e com leve tendência de aumento em níveis de inóculo mais baixos e decréscimo nos mais altos. Nos ambientes de 20 °C e 26 °C, a tendência foi linear decrescente com o aumento dos níveis de inóculo. Essa tendência foi mais acentuada na temperatura de 26 °C e os valores do peso de plantas secas maiores, em relação as outras temperaturas, em todos os níveis de inóculo. Os valores de plantas secas foram os menores quando o cultivo foi no ambiente de 20 °C.

A influência do fungo em relação ao peso da planta seca segue padrão semelhante entre as temperaturas e os níveis de inóculo utilizados em relação aos demais testes deste trabalho.

Em relação ao índice de doença (ID), observado nas plantas de milho avaliadas, percebe-se no ambiente de cultivo de 19,3 °C, que nos níveis NI24 e NI48, os danos causados pelos isolados não diferiram entre si, e que nos níveis NI72 e NI96, os danos causados pelo isolado CMLAPS804 foram significativamente maiores que os danos do isolado CMLAPS805. Na temperatura de 20 °C, somente no nível NI72 é que se notou diferença significativa entre os danos causados pelos isolados, sendo que os danos causados pelo isolado CMLAPS804 foram maiores. Quando foi avaliado os danos no ambiente de 26 °C, nota-se que nos níveis NI24 e NI72, o isolado CMLAPS804 também foi mais prejudicial às plantas, porém no nível NI48 não houve diferença entre os isolados e no maior nível, o isolado CMLAPS805 causou maiores prejuízos às plantas.

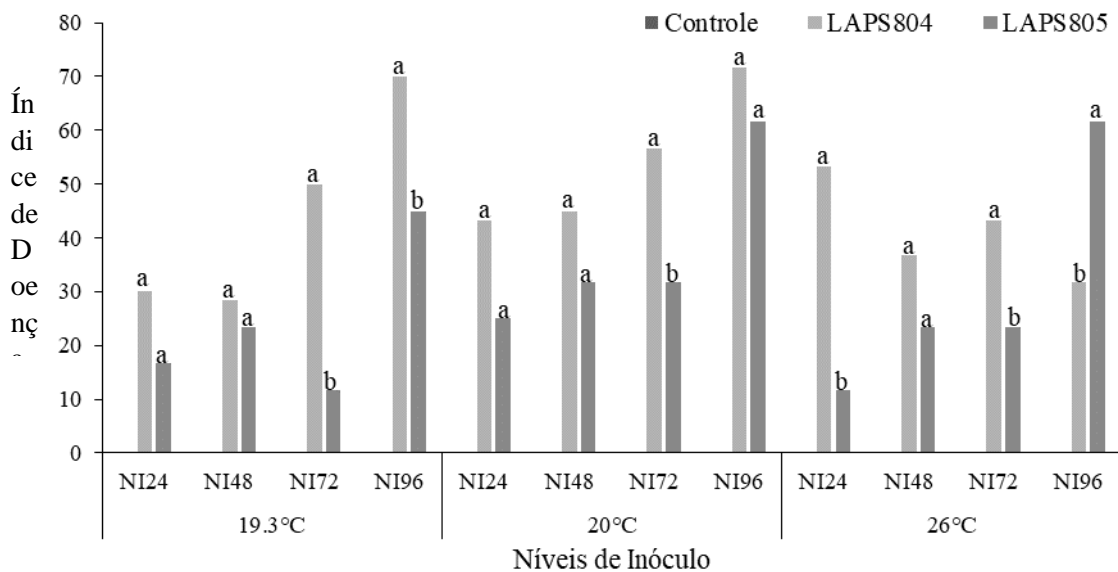


Figura 14. Índice de doença (ID) de plantas de milho originadas de sementes inoculadas com os isolados CMLAPS804 e CMLAPS805 de *Exserohilum turcicum* em diferentes níveis de inóculo NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h) sob três temperaturas de cultivo (19,3, 20 e 26 °C).

A associação de *E. turcicum* com sementes de milho pode provocar danos como morte em pré-emergência, perdas no poder germinativo, e posteriormente na fase mais avançada de desenvolvimento das plantas, manchas foliares. Pela literatura há registros sobre prejuízos às plantas de milho por ocasião da floração (Fernandes e Oliveira, 2000). Do ponto de vista epidemiológico vale salientar que a semente é um abrigo para a sobrevivência de inúmeros patógenos, além de atuar como um veículo para disseminação de inóculo.

## 5. Conclusões

*E. turcicum* interage com sementes de milho e a partir daí gera danos variados e severos à germinação e ao vigor das sementes, afetando a emergência de plantas em diferentes condições de cultivo, pela redução do estandes e pesos das plantas, em função do nível de inóculo presente nas sementes.

Os efeitos de *E. turcicum* na qualidade das sementes de milho, na forma infectante, são crescentes e proporcionais aos níveis de inóculo do patógeno nas sementes.

Em condições de cultivo em temperaturas mais baixas a atuação de *E. turcicum* é mais prejudicial ao desempenho das sementes infectadas.

O desempenho das sementes de milho é afetado pela variação genotípica de *E. turcicum* sendo o isolados CMLAPS804 mais agressivo do que o isolado CMLAPS805.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOOSALIS, M.G., SUMMER, D.R. & RAO, A.S. Overwintering of conidia of *Helminthosporium turcicum* on corn residues and in soil in Nebraska. *Phytopathology*, St. Paul, v. 57, p. 990-996. 1967.

BOTELHO, L.S.; ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Seed Science*, v.35, n.2, p.153-160, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA, 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Manual de análise sanitária de sementes. Brasília: MAPA, 2009b. 200 p.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Principais doenças na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2000. 80p.

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

FULLERTON, R. A. and FLETCHER, J. D. 1974. Observations on the survival of *Drechslera turcicum* in maize debris in New Zealand. *N. Z. J. Agric. Res.* 17: 153-155.

GUIMARÃES, M. R. F., SIQUEIRA, C. S., MACHADO, J. C., FRANÇA, S. K. S. & GUIMARÃES, G. C. (2017). Evaluation of inoculum potential of pathogens in seeds: relation to physiological quality and DNA quantification by qPCR. *Journal of Seed Science*, 39(3), 224-233. <https://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v39n3163901>

HILHORST, J.; LEPRINCE, O. Germination: Topics I to IV. Lavras: UFLA, 1998. Seed Physiology Course Symposium, UFLA/WAV, Lavras. Oct. 1998.

HORBACH, R., NAVARRO-QUESADA, A.R., KNOGGE, W., DEISING, H.B. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*. 2011;168:51–62.

KLOPPERS, R.; TWEER, S. (2009) Northern corn leaf blight fact sheet. PANNAR Seed (Pty) Ltd

KOECK, M., HARDHAM, A.R., DODDS, P.N. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell Microbiol.* 2011;13 (12):1849-1857. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01665.x

KRZYZANOWKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

Lipps, P.E & Mills, D. Northern corn leaf blight. Ohio State University. 2002. Extension fact sheet 1087, OH-43210

LUTTREL, E.S. The perfect state of *Helminthosporium turcicum*, *Phytopathology* 48:281-287. 1958.

MACHADO, J. C. et al. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. Proceedings... Angers: ISTA, 2001. p. 62.

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

MCKINNEY, H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, Washington, v.26, n.3, p.195-217, jan., 1923.

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

NWANOSIKE, M. R. O., MABAGALA, R. B., KUSOLWA, P. M. (2015). Effect of northern leaf bight (*Exserohilum turcicum*) severity on yield of maize (*Zea mays* L.) in Morogoro, Tanzania. *International Journal of Science and Research* 4(9):466-475.

RAMATHANI, I.; BIRUMA, M.; MARTIN, T., DIXELIUS, C & OKORI, P. Disease severity, incidence and races of *Setosphaeria turcica* on sorghum in Uganda. *Eur. J. Plant Pathol.* DOI: 10.1007/s10658-011-9815-1.2011

SANCHEZ, J. A.; ORTA, R.; MUÑOZ, B. C. Tratamientos pregerminativos de hidratacion deshidratacion de las semillas y sus efectos em plantas de interes agrícola. *Agronomia Costarricense*, San José, v. 25, n. 1, p. 67-92. 2001.

SIQUEIRA, C. S.; BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; SILVA, U. A.; DIAS, I. E. Effects of *Stenocarpella maydis* in seeds and in the initial development of corn. *Journal of Seed Science*, v.36, p.79-86, 2014. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v36n1/a10v36n1.pdf>

TUITE, J. 1969. *Plant Pathological Methods*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN.

WHITE, D.G. *Compendium of corn diseases*. Third edition. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA.1999.

ZANCAN, W. L. A; MACHADO, J. C.; BAUTE, N. L.; SOUSA, B. F. M de. Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions. *Biosci. J.*, Uberlândia, v.31, n.3, p.775-784, May/June, 2015.

**ARTIGO 3****TRANSMISSÃO DE *Exserohilum turcicum* A PARTIR DE SEMENTES DE MILHO  
EM CONDIÇÕES CONTROLADAS DE CULTIVO**

TRANSMISSION OF *Exserohilum turcicum* FROM CORN SEEDS INOCULATED AND  
CULTIVATED UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Preparado de acordo com a Journal of Seed Science (versão preliminar)

Marina de Resende Faria Guimarães<sup>1</sup>, José da Cruz Machado<sup>1</sup>, Carolina da Silva Siqueira<sup>1</sup>

1. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia de Sementes, Caixa Postal 3037, CEP 37200-900 Lavras, MG, Brasil. E-mail: mari16na@gmail.com, machado@ufla.br e kerolpet@gmail.com

## RESUMO

Amplamente difundido pelas áreas em que o milho é cultivado, o patógeno *Exserohilum turcicum* causa uma das doenças mais importantes nesta cultura denominada mancha túrcica. A transmissão deste fungo por meio das sementes ainda é pouco esclarecida e diante da sua importância, se faz necessário este estudo. Desta forma, o objetivo neste trabalho foi avaliar o potencial de transmissão de *E. turcicum* a partir de sementes de milho para plantas, utilizando diferentes níveis de inóculo do fungo nas sementes e diferentes ambientes de cultivo com temperaturas médias de 20 e 26 °C. A inoculação das sementes foi realizada por meio da metodologia de condicionamento hídrico, por 24, 48, 72 e 96 horas, correspondendo aos níveis de inóculo NI24, NI48, NI72 e NI96 respectivamente. Após a inoculação, as sementes foram distribuídas em copos plásticos contendo substrato comercial misturado com areia e ao final de 28 dias, as plantas obtidas a partir dessas sementes foram avaliadas quanto a presença do patógeno por métodos biológicos e por PCR. A porcentagem de morte em pré-emergência aumentou com o aumento do nível de inóculo nas sementes, independente do isolado e do ambiente de cultivo. A taxa de transmissão total do patógeno em estudo foi de 55,27%, ocorrida no maior nível de inóculo presente na semente.

Termos para indexação: patologia de sementes, nível de inóculo, mancha túrcica, milho

## ABSTRACT

Widely spread in areas where corn is grown, the pathogen *Exserohilum turcicum* causes one of the most important diseases in this culture, called turcicum leaf blight. The transmission of this fungus through the seeds is still poorly understood and given its importance, this study is necessary. Thus, the aim of this work was to evaluate the potential transmission of *E. turcicum* from corn seeds to plants, using different levels of the fungus inoculum in the seeds and different cultivation temperatures (20 and 26 °C). Seed inoculation was performed by hydric conditioning methodology for 24, 48, 72 and 96 hours, corresponding to NI24, NI48, NI72 and NI96 inoculum levels respectively. After inoculation, the seeds were distributed in plastic cups containing substrate and after 28 days, the plants obtained from these seeds were evaluated for the presence of the pathogen by biological methods and by PCR. The percentage of pre-emergence death increased with the increase in the inoculum level in the seeds, regardless of the isolate and temperature. The total rate of transmission of the pathogen under study was 55.27%, which occurred at the highest inoculum level present in the seed.

Index terms: seed pathology, inoculum level, turcicum blight, corn



## INTRODUÇÃO

A mancha túrcica, causada pelo fungo hemibiotrófico *Exserohilum turcicum*, é uma das doenças mais importantes relacionadas à cultura do milho e no Brasil, seu problema tem sido maior em cultivos de safrinha (Casela et al., 2006). Encontrada em diversas partes do mundo em todas as áreas onde essa espécie é cultivada, essa doença apresenta sintomas iniciais nas folhas inferiores mais velhas como lesões elípticas com o centro necrótico e halo clorótico (Munkvold e White, 2016) e posteriormente progride para a parte superior da planta. Perdas significativas têm sido reportadas quando se tem alta intensidade da doença, particularmente se a doença se estabelece antes ou logo após à floração (Nwanosike et al., 2015).

A exemplo do que ocorre com inúmeros outros patossistemas, a presença de patógenos nas sementes de milho constitui a principal fonte de inóculo uma vez que por meio delas, os patógenos são levados a distâncias consideráveis além de afetar o estabelecimento da cultura e causar prejuízo no desempenho das sementes de formas variadas (Reis e Casa, 1998; Talamini et al., 2001). A transmissão de patógenos via sementes é conceituada em patologia de sementes como a passagem do fitopatógeno que está infectando as sementes para os órgãos das plantas oriundas do processo de germinação, e este processo é importante por garantir a continuidade do ciclo vital dos patógenos ao assegurar-lhes a fonte nutricional necessária ao seu crescimento e esporulação (Langaro, 1998, Reis e Casa, 1998).

A transmissão de patógenos por meio das sementes depende de características específicas da interação patógeno-hospedeiro e diversos são os fatores que influenciam tal processo, como a quantidade e posição do inóculo nas sementes, a temperatura, umidade, genótipo do patógeno, entre outros (Tanaka e Machado, 1985)

De acordo com a literatura, a transmissão de *E. turcicum* por meio das sementes é ainda pouco esclarecida, sendo assumida somente por um estudo (McGee, 1988). De Rossi (2012) utilizando sementes infectadas artificialmente para descrever e quantificar o processo de transmissão da semente para a planta, não obteve sucesso na detecção dos fungos nos órgãos aéreos de plântulas de milho.

Diante da importância das sementes na disseminação das doenças de milho, se faz necessário o estudo da transmissão deste patógeno por este meio. Desta forma, o objetivo neste trabalho foi avaliar o potencial de transmissão de *E. turcicum* a partir de sementes de milho para plantas, tendo-se como base para esta demonstração o uso de diferentes níveis de inóculo do fungo nas sementes e diferentes condições ambientais de cultivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Patologia de Sementes, situado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **Origem e multiplicação dos isolados de *Exserohilum turcicum* e perfil das sementes:**

Foram utilizados dois isolados de *E. turcicum* denominados CMLAPS804 e CMLAPS805, isolado de sementes de milho e da coleção micológica do Instituto Biológico de São Paulo, respectivamente. Os isolados foram repicados inicialmente em placas de Petri contendo meio de cultura Lactose Caseína Hidrolisada Ágar (LCHA) (Tuite, 1969) e mantidos em câmara do tipo BOD à temperatura de  $25\pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas. Previamente ao início dos trabalhos, as sementes de milho, híbrido comercial RB9006PRO suscetível à mancha túrcica do milho, foram submetidas a teste de germinação e sanidade, para avaliar os perfis fisiológicos e sanitários do lote selecionado (Brasil, 2009a, 2009b). Verificou-se que as sementes apresentavam 94% de germinação e que as sementes estavam livres de *E. turcicum*, apresentando com 21% das sementes com *Penicillium sp.* e 31,5% com *Fusarium verticillioides*.

### **Obtenção de sementes de milho com diferentes níveis de inóculo:**

Para este estudo utilizou-se a metodologia de condicionamento hídrico (Machado et al., 2001) para gerar diferentes níveis de inóculo de *E. turcicum*. As sementes foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, lavadas três vezes com água destilada e secas entre folhas de papel germitest em sala climatizada a 20 °C por 48 horas. Colônias de culturas monospóricas dos dois isolados de *E. turcicum* foram preparadas previamente, em placas de Petri de 15cm, com meio LCHA acrescido de manitol com potencial hídrico ajustado a -1,4 MPa, conforme fornecido pelo software SPPM (Michel e Radcliffe, 1995). Decorridos 15 dias de cultivo dos isolados, em BOD à  $25\pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas, as sementes foram colocadas em contato com as colônias fúngicas, em camadas simples com a face do escutelo voltada para a colônia. As sementes permaneceram em contato com as colônias por períodos estabelecidos em 24, 48, 72 e 96 horas, que corresponderam aos níveis de inóculo de NI24, NI48, NI72 e NI96. Após o período de incubação, as sementes foram transferidas para bandejas, entre folhas de papel germitest por 48 horas em sala climatizada para sua secagem. A avaliação do efeito isolado do restritor hídrico foi realizada pelo tratamento controle onde

as sementes foram colocadas em placas de Petri contendo apenas o meio LCHA acrescido de manitol pelos mesmos períodos mencionados para a inoculação do fungo.

**Teste de sanidade:** A realização deste teste, “blotter com congelamento” teve como finalidade avaliar o percentual de incidência do fungo nas sementes inoculadas e comprovar a eficácia da metodologia utilizada para o patossistema em foco. O teste foi conduzido por meio da distribuição das sementes sobre substrato de papel de filtro embebido em substrato de ágar água (20g de ágar/L), em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, usando-se oito repetições de 25 sementes por placa. As placas com as sementes foram mantidas em câmara incubadora sob luz fluorescente branca, fotoperíodo de 12 h, a 20 °C pelo período inicial de 24h, seguida por mais 24h em congelador (-20 °C), e depois distribuídas novamente em câmara de incubação de sementes, por mais cinco dias. Ao final deste período, as sementes foram examinadas individualmente ao microscópio estereoscópio e microscópio ótico, verificando-se a incidência do fungo *E. turcicum* (BRASIL, 2009b).

**Avaliação da transmissão de *E. turcicum* em câmara de cultivo vegetal:** Cem sementes de milho de cada tratamento foram individualmente distribuídas em copos plásticos de 200mL contendo uma mistura de areia e substrato comercial autoclavado (Topstrato HA hortaliças) na proporção 1:1. Vinte e cinco copos foram distribuídos em bandejas, correspondendo a uma repetição. O experimento foi realizado em câmaras de cultivo vegetal com duas temperaturas, 20±2 e 26±2 °C, e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK T10 40 W 6500K FL40T10-6 60 Hz)/12 horas escuro. Diariamente foi avaliada a emergência de plantas sintomáticas e assintomáticas da doença em estudo, e realizada a irrigação para que o substrato se mantivesse úmido. Plantas sintomáticas foram coletadas e fragmentos de tecidos das áreas sintomáticas assepticamente incubados em placas de Petri contendo meio LCHA para a confirmação da presença de *E. turcicum* nos tecidos coletados. Decorridos 28 dias da semeadura, todas as plantas assintomáticas foram colhidas e fragmentos, de aproximadamente 2 cm, na altura do colo (C) e na última inserção das folhas (F) foram retirados de cada planta. Os fragmentos foram desinfestados em álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto, lavados três vezes, por 1 minuto, em água destilada esterilizada e colocados em papel filtro esterilizado para secar. Todos os fragmentos foram depositados em placas de Petri com meio LCHA e incubados à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 10 dias, os fragmentos foram avaliados individualmente em microscópio estereoscópio para a observação de possíveis estruturas fúngicas de *E. turcicum*. A presença de *E. turcicum* em pelo menos um

dos fragmentos examinados de uma mesma planta foi suficiente para confirmar a transmissão do fungo da semente para a planta.

**Confirmação da presença de *E. turcicum* em partes de plantas assintomáticas por meio da técnica de PCR:** Pelo menos vinte por cento dos fragmentos de plantas assintomáticas, de cada tratamento, foram submetidos à análise em PCR. Para isso, realizou-se a extração de DNA de cada fragmento de 2 cm da região do colo (C) e da última inserção de folhas (F) utilizando-se o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O par de *primers forward* ESF: 5'-GCCGGCTGCCAATTGTTTTA-3' e *reverse* ESR: 5'-CCCATGTCTTTTGCGCACTT-3' (石姐姐 et al., 2016), específicos para *E. turcicum*, foram utilizados para detectar a presença do fungo nos tecidos. A amplificação foi realizada em 25 µL de reação contendo 12,5 µL de Onetaq, 10 µM de cada primer *forward* e *reverse* e 2 µL do DNA. As condições de ciclo foram de 94 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C de desnaturação por 45 segundos, anelamento a 63 °C por 45 segundos, extensão de 72 °C por 45 segundos, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Foi utilizada uma alíquota de 15 µL dos produtos da PCR para analisá-los em gel de agarose a 1% em tampão TBE, corado com GelRed<sup>®</sup>, a 80V por aproximadamente 1 hora. Os géis com os produtos da PCR foram observados no equipamento L-Pix HE, transluminador UV (Loccus Biotecnologia, Brasil).

O cálculo da taxa de transmissão total do fungo a partir das sementes foi realizado utilizando-se a fórmula modificada daquela descrita por Teixeira e Machado (2003) e Siqueira et al. (2014):

$$TT = \frac{ISMPE + IPMPE + IPES + IPENS}{100} \times 100$$

Onde:

TT = Taxa de transmissão total (%)

ISMPE = Índice sementes mortas em pré-emergência

IPMPE= Índice plantas mortas em pós-emergência

IPES= Índice de plantas emergidas sintomáticas

IPENS= Índice de plantas emergidas assintomáticas

**Delineamento experimental e análise estatística dos dados.** O experimento foi realizado em blocos ao acaso, em esquema fatorial triplo 2x2x4, sendo 2 isolados, 2 ambientes de cultivo e 4 níveis de inóculo, com quatro repetições por tratamento. As análises estatísticas foram

realizadas no programa Sisvar<sup>®</sup> versão 5.6 (Ferreira, 2011). Para as variáveis morte em pré-emergência e taxa de transmissão com avaliação de plantas sintomáticas e assintomáticas, as análises de variância foram corrigidas por meio da transformação dos dados em raiz quadrada de (dados+1) por conter muitos valores iguais a zero. Quando significativas, as médias das variáveis qualitativas foram comparadas por Scott Knott ( $p \leq 0,05$ ) e as quantitativas procedeu-se o ajuste de modelos de regressão linear. Para a taxa de transmissão total, consideraram-se todos os percentuais das taxas de transmissão de plantas sintomáticas, assintomáticas e morte em pré-emergência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise de variância para a morte de sementes e plântulas em pré-emergência, taxas de transmissão em plantas sintomáticas e assintomáticas, e para taxa de transmissão total de sementes para plantas, quando as sementes foram inoculadas com os dois isolados de *E. turcicum*, revelaram uma interação tripla não significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Pela análise dos fatores relacionados à morte em pré-emergência isoladamente, verificou-se diferença significativa entre os dois isolados utilizados. As sementes inoculadas com o isolado CMLAPS804 apresentaram 17% de morte em pré-emergência, que diferiu significativamente do isolado CMLAPS805, com valor de 11,12%. Observou-se uma tendência de aumento do número de sementes e plântulas mortas em pré-emergência na proporção de aumento dos níveis de inóculo de *E. turcicum* nas sementes em ambos isolados, nas duas temperaturas de cultivo (Figura 1).

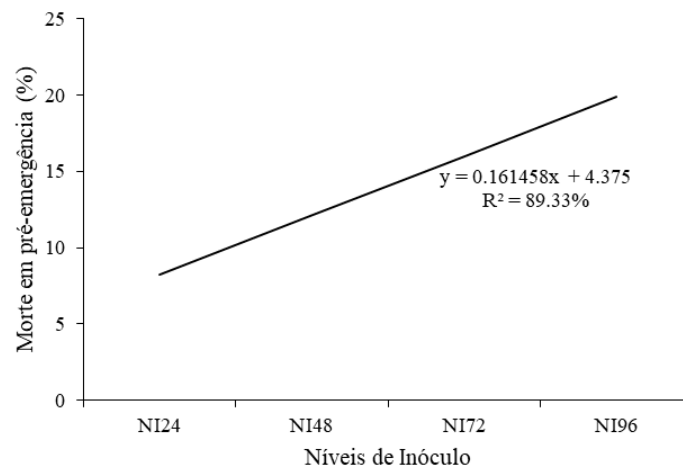


Figura 1. Percentual de morte de sementes de milho em pré-emergência, em decorrência da presença do fungo *Exserohilum turcicum*, em relação a dois isolados, CMLAPS804 e

CMLAPS805, em diferentes níveis de inóculo, NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h) em duas temperaturas de cultivo, 20 °C e 26 °C.

O percentual de mortes em pré-emergência de sementes e plântulas variou entre 8,25% e 21,5%. Trabalhos semelhantes nesta mesma linha de estudo com outros patossistemas, como *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* em milho, *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão mostraram que os patógenos podem ser mais prejudiciais aos seus hospedeiros a partir de sementes inoculadas, causando maior número de mortes de sementes/plântulas em pré-emergência em níveis de inóculo semelhantes aos utilizados neste estudo com *E. turcicum* (Siqueira et al., 2014; Siqueira et al., 2016; Gadaga et al., 2020).

Com base nas avaliações realizadas neste estudo, fica claro que o *E. turcicum* pode ser transmitido a partir de sementes para as plantas emergidas com sintomas e sem sintomas, fato comprovado em todos os tratamentos utilizados para este tipo de avaliação no presente caso. No caso da taxa de transmissão a partir de plantas sintomáticas, foi observada diferença significativa apenas entre as temperaturas de cultivo, sendo que 1,29% das plantas apresentaram sintomas na temperatura de 20 °C, enquanto que na temperatura de 26 °C, este índice foi de 1,04%. Após a infecção do patógeno os sintomas são expressos pelas lesões foliares, e as condições ideais para a ocorrência da doença são proporcionadas em temperaturas em torno de 20 °C e com um mínimo de 8 horas de molhamento foliar (Vitti et al., 1993). As baixas taxas de transmissão observadas nas plantas sintomáticas podem ser explicadas com o fato de este ser um patógeno que exhibe sintomas mais comumente nos estágios mais avançados de desenvolvimento da planta, implicando em uma maior incidência após a floração. Os sintomas observados nas plantas foram representados por folhas retorcidas com algumas lesões em formato elíptico e com coloração cinza-amarronzada.

Pelo exame biológico e molecular das plantas assintomáticas emergidas das sementes inoculadas, verificou-se que *E. turcicum* estava associado aos tecidos da região do colo e da última inserção foliar de algumas plantas de milho. Em relação à taxa de transmissão do fungo para plantas assintomáticas a partir de sementes inoculadas, embora não tenha havido diferença significativa entre os valores, observou-se uma tendência ao aumento da porcentagem de transmissão na proporção direta com o aumento dos níveis de inóculo nas sementes (Figura 2A). Observa-se que na temperatura de 20 °C as médias da porcentagem de transmissão do isolado CMLAPS805, embora não significativas estatisticamente, foram maiores em todos os níveis de inóculo, enquanto que na temperatura de 26 °C, nos níveis de inóculo NI24, NI72 e NI96, as maiores porcentagens de transmissão foram observadas com o

isolado CMLAPS804. Foi possível verificar que a taxa de transmissão em plantas assintomáticas obtida no menor nível de inóculo, na temperatura de 26 °C, foi maior que a taxa de transmissão observada no maior nível de inóculo da temperatura de 20 °C. Independente do isolado utilizado, a taxa de transmissão a partir de plantas assintomáticas foi significativamente maior na temperatura de 26 °C, quando atingiu o valor de 33,99% de transmissão, diferindo da temperatura de 20 °C com apenas 20,23% de taxa de transmissão. A maior taxa de transmissão de *E. turcicum* para plantas assintomáticas foi observada no nível de inóculo mais alto, na maior temperatura estudada, com valor igual a 43,5%. A técnica de PCR foi eficiente para detectar o patógeno nos fragmentos das plantas assintomáticas, o que não ocorreu pelo teste biológico, em que o fungo não foi detectado (Figura 2B).

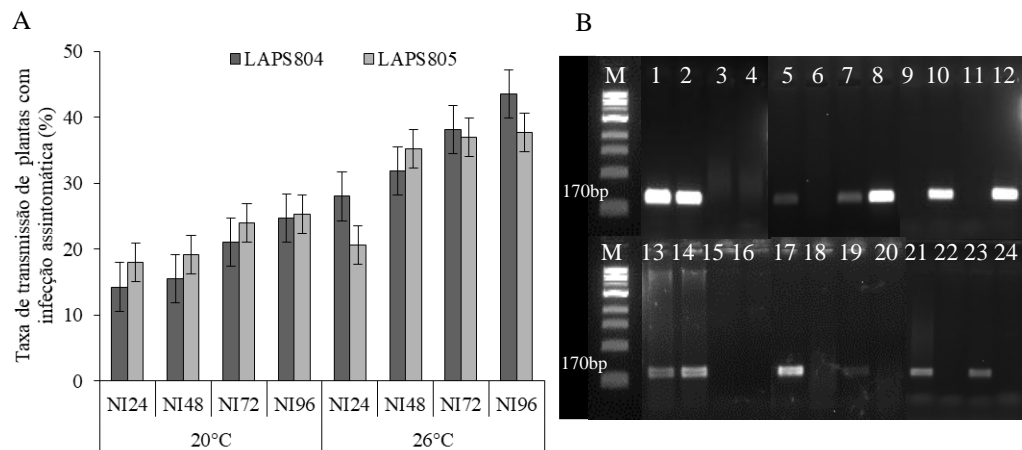


Figura 2. (A) Taxas de transmissão de *Exserohilum turcicum* para plantas assintomáticas a partir de sementes inoculadas com dois isolados, CMLAPS804 e CMLAPS805, em diferentes níveis de inóculo, NI24 (24h), NI48 (48h), NI72 (72h) e NI96 (96h) em duas temperaturas de cultivo, 20 °C e 26 °C e (B) Controles positivos da PCR (CMLAPS804 – 1 e 2; e CMLAPS805 – 13 e 14), água (3, 4, 15 e 16), marcador (M), alguns resultados positivos de plantas oriundas de sementes inoculadas com CMLAPS804 e mantidas a 20 °C (5, 7 e 8) e a 26 °C (10 e 12) e inoculadas com CMLAPS805 e mantidas a 20 °C (17 e 19) e a 26 °C (21 e 23).

A taxa de transmissão de um patógeno de sementes à sua progênie deve considerar o número de sementes/plântulas mortas pela ação do patógeno somada às plantas emergidas com alguma infecção comprovada pelo patógeno (Machado, 1994). No caso em estudo, para a transmissão total de *E. turcicum* os maiores valores foram observados nos maiores níveis de inóculo, independente do isolado ou da temperatura em que o experimento foi conduzido. Houve uma tendência de aumento da taxa de transmissão total com o aumento dos níveis de inóculo do fungo nas sementes (Figura 3). A taxa de transmissão total observada nesse

patossistema variou de 29,26% a 55,27%. Em comparação com outros patossistemas nesta mesma linha de trabalho, nos quais foi empregada a mesma metodologia de estudo com *E. turcicum*, observa-se que a taxa de transmissão deste patógeno a partir de sementes de milho, foi em geral, mais baixa. Enquanto que a máxima transmissão observada em patossistemas como *Stenocarpella maydis* e *Colletotrichum lindemuthianum* foi de 90,5% e 92% respectivamente, nesse patossistema em estudo, a máxima transmissão observada foi de 55,27%. (Gadaga, 2020; Siqueira et al., 2016; Zancan et al., 2015). Vale ressaltar que inúmeros outros fatores devem ser considerados nesta discussão, uma vez que neste trabalho o grau de variação de populações do fungo e do milho, foi relativamente limitado, com o uso de apenas dois isolados e um híbrido. Importante destacar também que *E. turcicum* é um patógeno que uma vez presente nos tecidos das sementes de milho pode ser transmitido em níveis elevados por esta via, conforme demonstrado neste trabalho, e a partir daí causar danos expressivos no desempenho da cultura do milho.

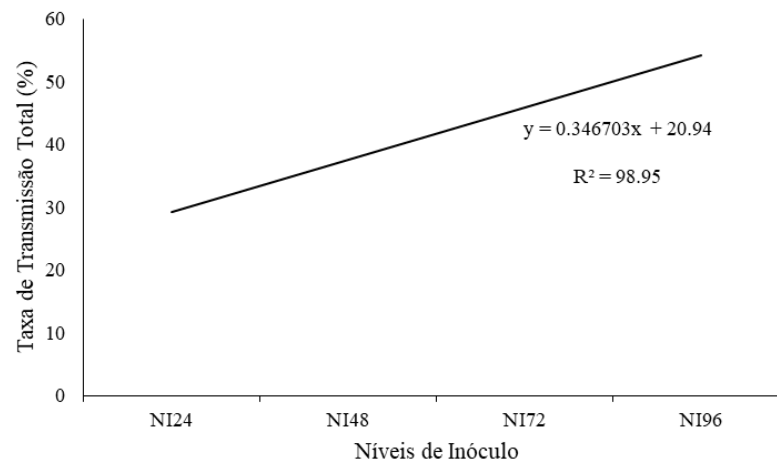


Figura 3. Taxas de transmissão total de *Exserohilum turcicum* a partir de sementes inoculadas com dois isolados, CMLAPS804 e CMLAPS805, em diferentes níveis de inóculo, NI24, NI48, NI72 e NI96 correspondendo a tempos de contato das sementes com o fungo por 24h, 48h, 72h e 96h, em duas temperaturas de cultivo, 20 °C e 26 °C, considerando as avaliações de morte em pré-emergência e taxas de transmissão em plantas sintomáticas e assintomáticas.

## Conclusões

O fungo *E. turcicum* é transmitido de sementes às plantas de milho em intensidades variáveis em função dos níveis de inóculo do patógeno nas sementes e das condições de ambiente de cultivo do milho.



A máxima transmissão total a partir de sementes artificialmente inoculadas, observada neste patossistema, foi de 55,27%.

O fungo foi detectado tanto em tecidos de plantas sintomáticas como assintomáticas, oriundas de sementes portadoras do patógeno na forma infectante.

A taxa de transmissão de *E. turcicum* a partir de sementes de milho não apresentou variações estatísticas significativas entre as faixas de temperatura utilizadas neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA, 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. Manual de análise sanitária de sementes. Brasília: MAPA, 2009b. 200 p.

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

DE ROSSI, R. L. *Exserohilum turcicum* em milho: caracterização morfológica e patológica, associação a sementes e sensibilidade a fungicidas. Passo Fundo, 2012. Dissertação (mestrado). Universidade de Passo Fundo, 2012.

GADAGA, S. J. C.; SIQUEIRA, C. S.; MACHADO, J. C.. Transmission potential of *Colletotrichum lindemuthianum* (race 65) in association with bean seeds under controlled conditions. J. Seed Sci., Londrina, v.42, e202042025, 2020.

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2317-15372020000100122&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372020000100122&lng=en&nrm=iso)>.

LANGARO, N. C. Detecção, transmissão e controle de *Drechslera avenae* em sementes de aveia branca. 1998. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 1998.

MACHADO, J. C. *et al.* Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26, 2001, Angers. Proceedings... Angers: ISTA, 2001. p. 62.

- MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 2, p. 229-263, 1994.
- MCGEE, D. C. 1988. Maize Diseases: A Reference Source for Seed Technologists. St. Paul, MN: APS Press. 150pp. in Mezzalama, M. 2012. Seed Health: Fostering the safe distribution of maize and wheat seed: General guidelines. Third edition. Mexico, D. F.: CIMMYT.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. Agronomy Journal, v. 87, n. 1, p. 131-136, 1995.
- MUNKVOLD, G.P., WHITE, D.G.: Compendium of Corn Diseases. 4rd Ed. - The American Phytopathological Society, St. Paul 2016.
- NWANOSIKE, M. R. O., MABAGALA, R. B., KUSOLWA, P. M. Effect of Northern Leaf Blight (*Exserohilum turcicum*) Severity on Yield of Maize (*Zea Mays* L.) in Morogoro, Tanzania. International Journal of Science and Research. 2015; 4(9):465-474.
- REIS, E.M. & CASA, R.T. Patologia de cereais de inverno. Passo Fundo. Aldeia Norte Editora. 1998. 88p.
- SIQUEIRA, C.S.; BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; CORRÊA, C.L. Transmission of *Stenocarpella maydis* by maize seeds. Revista Ciência Agronômica, v.47, n.2, p.393-400, 2016. <http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/2764/1374>
- SIQUEIRA, C.S.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; ALMEIDA, M.F. Potential for transmission of *Stenocarpella macrospora* from inoculated seeds to maize plants grown under controlled conditions. Journal of Seed Science, v.36, n.2, p.154-161, 2014. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v36n2/v36n2a03.pdf>
- TALAMINI, V.; POZZA, E.A.; MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, F.A. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. Transmitidas por sementes. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.10, p.219-248, 2001.
- TANAKA, M.A.S. & MACHADO, J.C. Patologia de sementes. Informe Agropecuário 11:40-46. 1985.

Teixeira , H; Machado , J.C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. *Ciência e Agrotecnologia*, v.25, n.5, p.1045-1052, 2003.

<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v27n5/a11v27n5.pdf>

TUITE, J. 1969. Plant Pathological Methods. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN.

VITTI, A. J.; BERGAMIN FILHO, A. & AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre ferrugem comum e helmintosporiose do milho. *Fitopatologia Brasileira* 18: 314. 199

ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; BAUTE, N.L.; SOUSA, B.F.M. Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions. *Bioscience Journal*, v.31, n.3, p.775-784, 2015.

<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/26090/16463>

石妞妞, 杜宜新, 阮宏椿, 陈福如, 杨秀娟, 甘林. *Exserohilum turcicum* molecular detection primers and quick detection method. 2016

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

O conhecimento das interações de patógenos com sementes, com foco em avaliações de efeitos do patógeno no desempenho das sementes, sua transmissibilidade, sobrevivência e detecção em amostras de sementes, entre outros aspectos, é de suma importância para o estabelecimento de estratégias de manejo de doenças que são originadas de sementes em culturas que são propagadas por esta via.

As relações entre *Exserohilum turcicum* e sementes de milho, embora sejam referenciadas em alguns relatos de literatura têm sido pouco esclarecedoras em alguns aspectos, o que tem gerado dúvidas sobre o papel das sementes no ciclo da mancha foliar túrcica, restringindo, por conseguinte a organização de esquemas de controle desta doença nas condições brasileiras. Sabe-se que o fungo tem sido encontrado em sementes de lotes comerciais em níveis variados e que a doença pode ocorrer em áreas novas localizadas em regiões antes isentas desta doença, apresentando padrões de ocorrência típicas de inóculo originado de sementes.

Nesta tese, o intuito foi produzir informações mais detalhadas ou pontuais sobre alguns aspectos da interação de *E. turcicum* com sementes de milho, seguindo se um modelo

já aplicado em outros casos pela equipe de pesquisa envolvida neste tipo de estudos na Universidade Federal de Lavras. Foram propostos três alvos de estudo relacionados a detecção rápida e precisa do fungo em amostras de sementes, sua transmissão e efeitos a partir de sementes infectadas, por meio de ensaios conduzidos em condições controladas.

No Capítulo 2, referente a checagem e adequação de técnicas de detecção do fungo em sementes de milho, foi possível verificar que as técnicas moleculares, por meio de PCR convencional e PCR em tempo real, com foco voltado para especificidade e sensibilidade, foram eficazes na detecção do fungo em sementes, com potencial de adoção em Programas de controle de qualidade de sementes de milho, além de sua aplicação em Programas de quarentena vegetal para o presente caso. Por meio de ajustes na metodologia de detecção proposta, como a pré-incubação das sementes por períodos superiores a 72 horas, a sensibilidade das técnicas foi da ordem de 0,25%, o que corresponde a detecção da presença do patógeno em uma semente de uma amostra de trabalho composta de 400 sementes. É importante salientar que a adoção desta metodologia pelos sistemas oficiais de controle de qualidade de sementes, requer a aprovação prévia destes procedimentos metodológicos por meio de testes comparativos de aferição, cujo modelo de execução é baseado em modelos estatísticos já conhecidos para esta finalidade.

O foco nos Capítulos 3 e 4, foi avaliar o grau de efeitos do patógeno presente nos tecidos das sementes, em diferentes níveis de inóculo no desempenho das sementes representada pela germinação e vigor e a taxa de transmissão sob duas temperaturas de cultivo em ambiente controlado. Ficou claro o potencial de danos do patógeno partindo-se das sementes infectadas. Houve uma proporcionalidade dos efeitos danosos com o aumento dos níveis de inóculo do patógeno nas sementes de milho. Em comparação com estudos similares realizados com a maioria de outros patossistemas, os danos neste estudo podem ser considerados menos severos, provavelmente em razão da natureza hemibiotrófica deste fungo, que em condições controladas de inoculação artificial empregada provavelmente não reproduzem ou asseguram as condições mais favoráveis a este tipo de inoculação conforme ocorre com fungos fitopatogênicos necrotróficos.

Sobre transmissão do patógeno via sementes, ficou também evidenciado que a taxa de transmissão do fungo é variável em função do nível de inóculo inicialmente presente nas sementes e das condições de cultivo com duas temperaturas distintas, 20 e 26 °C. Este estudo evidenciou que a taxa de transmissão do patógeno variou na faixa de 29,26% e 55,27%, sendo as maiores taxas registradas nos níveis de inóculo mais elevados nas sementes. Ficou claro também que a transmissão de *E. turcicum* a partir de sementes de milho pode ocorrer de

forma assintomática em plantas emergidas até a época de avaliação, ou seja, 30 dias após a semeadura.

Por fim, vale registrar que estudos mais minuciosos que levem em conta uma maior amplitude de fatores inerentes às sementes, ao patógeno e ao ambiente devem ser conduzidos para um conhecimento mais sólido sobre os eventos e implicações que estão envolvidos na interação de *E. turcicum* e sementes de milho. Aspectos genéticos do hospedeiro, variabilidade do patógeno, eficácia do tratamento sanitário de sementes, mecanismos de transmissão do patógeno de planta a sementes, entre outros, devem merecer atenção especial em futuros estudos deste patossistema.