



TATIANA BOTELHO FANTAZZINI

**DESEMPENHO DE SEMENTES E EXPRESSÃO
GÊNICA DA INTERAÇÃO *Fusarium verticillioides*
E MILHO**

LAVRAS- MG

2014

TATIANA BOTELHO FANTAZZINI

**DESEMPENHO DE SEMENTES E EXPRESSÃO GÊNICA DA
INTERAÇÃO *Fusarium verticillioides* E MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de mestre.

Orientador

Dr. Renato Mendes Guimarães

LAVRAS- MG

2014

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

Fantazzini, Tatiana Botelho.

Desempenho de sementes e expressão gênica da interação
Fusarium verticillioides e milho / Tatiana Botelho Fantazzini. –
Lavras : UFLA, 2014.

84 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Renato Mendes Guimarães.

Bibliografia.

1. *qRT-PCR*. 2. Infecção. 3. Restrição hídrica. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.430415

TATIANA BOTELHO FANTAZZINI

**DESEMPENHO DE SEMENTES E EXPRESSÃO GÊNICA DA
INTERAÇÃO *Fusarium verticillioides* E MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de mestre.

Aprovada em 28 de outubro de 2014.

Dra. Renata Silva Mann

UFS

Dr. José da Cruz Machado

UFLA

Dr. João Almir de Oliveira

UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães

Orientador

LAVRAS- MG

2014

*Aos meus pais Mateus e Marisa, pelo exemplo de vida e sabedoria.
Ao meu irmão Tarley, pelo carinho e companheirismo.
Ao vô Tarley, à vó Yonne (in memoriam), ao vô Mario, à vó Terezinha (in
memoriam), meus maiores exemplos de vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que tem realizado em minha vida.

Aos meus pais, Mateus Siqueira Fantazzini e Marisa Mansur Botelho Fantazzini; e meu irmão, Tarley Mansur Fantazzini, pelo amor incondicional.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Renato Mendes Guimarães, pela paciência, dedicação, ensinamento, amizade e confiança.

Aos professores do Setor de Sementes, João Almir Oliveira, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Maria Laene Moreira de Carvalho e Heloísa Oliveira dos Santos, exemplos de ética e dedicação e por contribuírem com meu aprendizado.

Aos pesquisadores Stella Dellyzete Veiga Franco e Antônio Rodrigues Vieira, pelos conselhos e amizade.

Aos pós-doutorandos do Setor de Sementes, em especial Aline da Consolação Sampaio Clemente, Everson Reis Carvalho e Tanismare Tatiana Almeida da Silva, pela ajuda e amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica e aos estagiários do Laboratório, em especial Renato Resende Costa, pelo auxílio na execução dos trabalhos.

Aos membros no NESEM, pela amizade e companheirismo.

Aos meus queridos amigos do laboratório, pela amizade e por terem me proporcionado momentos de muita alegria, em especial às amigas Sophia Mangussi, Izabel Costa Neta, Stefânia Vilas Boas e Joana Fernandes, que sempre estiveram ao meu lado.

À minha amiga Olívia Lopes pela amizade incondicional.

Aos amigos: Bárbara, Raquel, Michelle, Natássia, Vivi, Gabi, Isabela, Dennis, Gabriel Castanheira, Gabriel Teixeira, Vinícios, Renato e Diego, pela paciência, amizade e companheirismo.

Aos funcionários do Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Elenir, Walbert, Elza, Cláudio e Antônio, e à secretária Viviana, pela disposição e paciência em nos auxiliar.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

À Marli, secretária da pós-graduação do Departamento de Agricultura, pela atenção e paciência durante o curso de Mestrado.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA.

RESUMO

As sementes são importantes e eficientes veículos de disseminação de patógenos. Os fungos fitopatogênicos podem associar-se às sementes durante o seu desenvolvimento, após a colheita e durante o armazenamento. Dentre os principais fungos transportados pelas sementes de milho, o *Fusarium verticillioides* se destaca pela frequência com que ocorre, sendo responsável principalmente pela podridão das sementes e redução de estandes. Diante disso, objetivou-se neste trabalho avaliar a expressão de genes associados à presença do fungo *Fusarium verticillioides*, e a sua influência no desempenho de sementes de milho submetidas a diferentes potenciais de inóculo. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central de Análise de Sementes e Laboratório de Patologia de Sementes, da Universidade Federal de Lavras, em Lavras-MG. Foram utilizadas três cultivares de milho híbrido: BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 recém-colhidas, cedidas pela empresa Biomatrix. Primeiramente, as sementes foram colocadas em contato com a colônia fúngica desenvolvida em meio BDA+ manitol no potencial hídrico -2,0MPa. Após o crescimento da colônia, as sementes foram distribuídas sob o meio, permanecendo no substrato por diferentes períodos de contaminação (0, 24, 48, 72 e 96 horas). Em seguida, parte das sementes foi armazenada por sete meses em ambiente não controlado, e em outra parte realizou-se as avaliações. Como testemunhas foram utilizadas sementes tratadas e não inoculadas. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, emergência, índice de velocidade de emergência e teste de frio, enquanto a qualidade sanitária foi determinada pelo *Blotter test* com congelamento. Para a análise de transcritos foi estudada a expressão dos genes *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética, Poliubiquitina e *Zea mays* proteína spatula. Pode-se concluir que o aumento do potencial de inóculo do fungo *F. verticillioides* nas sementes de milho gera uma redução da qualidade fisiológica nos potenciais de 72 e 96 horas, principalmente nas sementes que foram armazenadas por sete meses em ambiente não controlado. Os genes *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética e *Zea mays* proteína spatula se mostraram promissores para a identificação de materiais contaminados com o fungo *F. verticillioides*.

Palavras-chave: *qRT-PCR*. Infecção. Restrição hídrica.

ABSTRACT

Seeds are important and efficient vehicles for the dissemination of pathogens. The phytopathogenic fungi may associate to the seeds during their development, after the harvest and during storage. Among the main fungi carried by the corn seeds, *Fusarium verticillioides* stands by the frequency with which it occurs, being mainly responsible for seed rot and reduced stands. Therefore, this study aimed to evaluate the genes expression associated to the presence of the fungi *Fusarium verticillioides*, and its influence on the corn performance submitted to different inoculum potential. The study was conducted at the Central Laboratory of Seed Analysis and Seed Pathology Laboratory, at Federal University of Lavras-MG. There were used three cultivars of corn hybrid: BM 840 PRO, BM 810 and BM 207 freshly harvested, supplied by the company Biomatrix. First, the seeds were placed in contact with the fungal colonies grown on BDA + manitol in water potential -2.0MPa. After colony growth, seeds were distributed in the middle, remaining on the substrate for different times of contamination (0, 24, 48, 72 and 96 hours). Then, some seeds were stored for seven months under the uncontrolled ambient, and in other part were held the evaluations. As witnesses were used treated seed and not inoculated. The physiological seed quality was assessed by means of the germination tests, first count of germination, emergence, speed rate of emergency and cold test, while the sanitary quality was determined by the *Blotter test* with freezing. For the transcripts analysis were studied the gene expression *Zea mays* clone 276247 hypothetical protein, Polyubiquitin and *Zea mays* protein spatula. It can be concluded that the increase of potential of the fungi inoculum *F. verticillioides* in the corn seeds generates a decrease in the physiological quality potentials of 72 and 96 hours, mainly in the seeds were stored for seven months under uncontrolled ambient. The *Zea mays* genes - clone 276247 - hypothetical protein and *Zea mays* spatula protein showed promise for the identification of contaminated materials with the fungi *F. verticillioides*.

Keywords: *qRT-PCR*. Infection. Water restriction.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Características das sementes de milho utilizadas no experimento e resistência ao fungo *Fusarium verticillioides*¹... 27
- Tabela 2 Sequências dos oligonucleotídeos sintetizados especificamente para amplificar os genes relacionados à infecção de *Fusarium verticillioides*, e genes de referência..... 33
- Tabela 3 Porcentagem média de germinação (G%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes 37
- Tabela 4 Porcentagem média de plântulas normais avaliadas pelo teste de primeira contagem de germinação (PC%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes 40
- Tabela 5 Porcentagem média de emergência (E%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes 43
- Tabela 6 Porcentagem média do índice de velocidade de emergência (IVE%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes 47
- Tabela 7 Porcentagem média de emergência de plântulas no teste de frio (F%) de três cultivares de milho inoculadas com o

isolado de <i>F. verticillioides</i> em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes	51
Tabela 8 Porcentagem média da incidência de <i>Fusarium verticillioides</i> em três cultivares de milho inoculadas com o isolado de <i>F. verticillioides</i> em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes	55
Tabela 9 Incidência de outros fungos (%) em sementes de três cultivares de milho inoculadas com o isolado <i>F. verticillioides</i> em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Porcentagem de plântulas normais de sementes de milho das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento, submetidas a diferentes potenciais de inóculo de *Fusarium verticillioides*.....39
- Figura 2 Porcentagem de sementes de milho germinadas avaliadas pelo teste de primeira contagem das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento, submetidas a diferentes potenciais de inóculo de *Fusarium verticillioides*.....42
- Figura 3 Porcentagem da emergência de plântulas de milho das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 infectadas por *Fusarium verticillioides* com diferentes potenciais de inóculo antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento das sementes.....46
- Figura 4 Porcentagem do índice de velocidade de emergência de sementes de milho das cultivares BM 840 PRO BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento, submetidas a diferentes potenciais de inóculo de *Fusarium verticillioides*.....49
- Figura 5 Porcentagem da emergência de plântulas no teste de frio em sementes de milho das cultivares BM 840, BM 810 e BM 207 infectadas por *Fusarium verticillioides* com diferentes

potenciais de inóculo, antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento das sementes.....	53
Figura 6 Porcentagem da incidência de <i>Fusarium verticillioides</i> em sementes de milho das cultivares BM 840, BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento das sementes, avaliadas pelo teste de sanidade e submetidas a diferentes potenciais de inóculo de <i>F. verticillioides</i>	57
Figura 7 Perfil da expressão por qRT-PCR de <i>Zea mays</i> clone 276247 proteína hipotética, em sementes de milho das cultivares BM 207 (a), BM 810 (b) e BM 840 PRO (c), inoculadas com <i>F. verticillioides</i> , antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes.....	62
Figura 8 Perfil da expressão por qRT-PCR de Poliubiquitina, em sementes de milho das cultivares BM 207 (a), BM 810 (b) e BM 840 PRO (c), inoculadas com <i>F. verticillioides</i> , antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes.....	65
Figura 9 Perfil da expressão por qRT-PCR de <i>Zea mays</i> proteína spatula, em sementes de milho das cultivares BM 207 (a), BM 810 (b) e BM 840 PRO (c), inoculadas com <i>F.</i> <i>verticillioides</i> , antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Fusarium verticillioides</i> associado a sementes de milho.....	17
2.2	Inoculação em sementes	20
2.3	Armazenamento e qualidade fisiológica de sementes de milho.....	22
2.4	Expressão Gênica	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Local	27
3.2	Obtenção do isolado das sementes de milho	27
3.3	Inoculação das sementes com <i>Fusarium verticillioides</i>	28
3.4	Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes de milho	29
3.4.1	Teor de Água	29
3.4.2	Teste de Germinação.....	29
3.4.3	Emergência de Plântulas.....	30
3.4.4	Teste de Frio.....	30
3.4.5	Teste de Sanidade.....	31
3.5	Análise da expressão de genes associados à presença de <i>Fusarium verticillioides</i> por meio da técnica de <i>qRT-PCR</i>	31
3.5.1	Extração e Purificação do RNA	32
3.5.2	Transcrição Reversa para Síntese do cDNA.....	32
3.5.3	Genes Analisados.....	33
3.5.4	Ensaio de <i>qRT-PCR</i>	33
3.6	Análise estatística	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Qualidade das sementes antes e após o armazenamento.....	36

4.2	Análise Transcriptômica	59
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados no mundo, fornecendo produtos para a alimentação humana e animal, além de matéria-prima para a indústria. Devido à importância econômica dessa cultura é crescente a demanda por sementes híbridas de milho com alta qualidade, fazendo com que as empresas produtoras de sementes adotem, muitas vezes, padrões de qualidade mais rígidos do que os estabelecidos pelo sistema de certificação de sementes (GOMES et al., 2000).

Entre os vários fatores que afetam a qualidade sanitária e fisiológica das sementes de milho, os micro-organismos são considerados os mais importantes, por estarem relacionados diretamente com a baixa germinação e vigor, além de acelerar o processo de deterioração durante o armazenamento. As sementes também são importantes veículos de disseminação de patógenos, sendo que a maioria das doenças que incidem na cultura do milho tem seus agentes causais transmitidos por elas.

Os fungos fitopatogênicos podem associar-se a sementes de milho durante o seu desenvolvimento, após a colheita e durante o armazenamento. A espécie fúngica mais comumente associada à semente de milho no Brasil é *Fusarium verticillioides*, sendo que espécies do gênero *Aspergillus* também são frequentemente veiculadas por essas sementes (CASA; REIS, 2003). Essa associação, na maioria das vezes, reduz a qualidade fisiológica das sementes, favorecendo também a dispersão de patógenos a longas distâncias e a transmissão de patógenos da semente à planta.

Esses patógenos que, frequentemente associam-se às sementes de milho, produzem toxinas prejudiciais à saúde humana e animal. O *Fusarium verticillioides* é a principal espécie produtora de fumonisinas, grupo de micotoxinas que ocorrem a sementes de milho, e a produtos à base de milho,

consideradas pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)* cancerígenas para seres humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1993; MARASAS, 1996). Portanto, torna-se necessário, o desenvolvimento de técnicas para a detecção rápida e segura desses patógenos, facilitando assim a tomada de decisões sobre o destino e a distribuição geográfica dos lotes.

Assim, para que sejam desenvolvidos métodos de detecção rápidos para verificar a presença desses micro-organismos em lotes de sementes, a identificação, e o estudo da expressão de genes relacionados à infecção dessas sementes é de fundamental importância no entendimento desses mecanismos.

A técnica de PCR em tempo real tem sido promissora em pesquisas que relacionam os genes de resposta das plantas aos estresses bióticos, podendo assim, ser usada para avaliar a expressão de genes durante a infecção desses patógenos em sementes de milho.

Diante disso, objetivou-se nesta pesquisa avaliar a expressão de genes associados à presença do fungo *Fusarium verticillioides*, e a sua influência no desempenho de sementes de milho submetidas a diferentes potenciais de inóculo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Fusarium verticillioides* associado a sementes de milho

A semente é um dos principais insumos da agricultura que contém o potencial genético da espécie, o que permite a obtenção de alto rendimento. Para que ela possa expressar todo o seu potencial genético, é necessário que seja de alta qualidade fisiológica e sanitária. As sementes de milho são suscetíveis a diversos tipos de fungos durante as diferentes fases de produção, podendo esses causar prejuízos durante o seu desenvolvimento no campo, redução do estande e debilitação das plântulas (CAPPELINI et al., 2005). Vários micro-organismos podem ser encontrados no solo, entre eles, o *Fusarium verticillioides*, principal patógeno associado a sementes de milho, causador da podridão da base do colmo e podridão-da-espiga (NERBASS; CASSA; ANGELO, 2008; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004).

Esse patógeno é capaz de produzir micotoxinas que podem se acumular nas sementes, reduzindo o estande e, conseqüentemente, a produção. Dessa maneira, a presença desse fungo nas sementes é de grande importância, não apenas devido aos danos econômicos, mas também pelo perigo de consumo dos grãos infectados e seus derivados, uma vez que esse patógeno produz micotoxinas cancerígenas, com efeito comprovado, tanto para animais como para o homem (RHEEDER et al., 1992). Para seu controle, deve-se procurar eliminar ou reduzir o inóculo nas suas principais fontes, ou seja, em sementes e restos culturais. Além disso, a diagnose preventiva antes da semeadura, assim como o tratamento químico de sementes, são medidas que auxiliam no combate às principais doenças transmitidas por ele (COSTA et al., 2003).

O *F. verticillioides* apresenta padrões distintos, quanto à taxa de crescimento micelial e características patogênicas, em sementes e plântulas de

milho, podendo representar um risco ao estabelecimento da cultura, pela redução da germinação e emergência de plântulas (KUHNEM-JÚNIOR et al., 2013).

Machado et al. (2013), têm associado a presença de *F. verticillioides* nas sementes com a redução da germinação e emergência das plântulas de milho, principalmente em condições adversas.

Beckert et al. (2001), avaliando a emergência e o desenvolvimento de plântulas de milho, em solo úmido, frio e seco, verificaram que a presença do fungo *Fusarium verticillioides* nas sementes não influenciou a emergência de plântulas em substratos esterilizados. Resultados semelhantes foram encontrados em pesquisa realizada por Ramos et al. (2014), em que a germinação das sementes de milho não foi afetada pela presença do fungo *F. verticillioides*.

O *Fusarium verticillioides* é classificado como um fungo de campo, e requer um teor de umidade em equilíbrio com a umidade relativa de 90-100% para se desenvolver (MILLER, 1995; SINHA; SINHA, 1991). É um fungo típico de regiões quentes e secas, sendo relatado em todos os locais de cultivo de milho, além disso, várias espécies cultivadas são hospedeiras desse fungo, como *Oryza sativa* (arroz), *Glycine max* (soja), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Gossypium hirsutum* (algodão), *Hordeum vulgare* (cevada), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Triticum aestivum* (trigo), entre outros (BRASIL, 2014).

Apesar dos avanços já alcançados no conhecimento sobre a biologia e identificação de *F. verticillioides*, o desenvolvimento de metodologias para sua detecção rápida e precisa em sementes, com base em princípios culturais, morfológicos e moleculares, torna-se de extrema importância em programas de certificação de sementes para a comercialização. Para a detecção molecular de fungos em sementes, é necessário que, os marcadores moleculares, no caso par de *primers*, sejam testados quanto à especificidade e otimizados para o máximo de sensibilidade entre a associação semente/patógeno (DOMBROWSKI et al., 2006).

A detecção e a diagnose precisa de patógenos em sementes é uma das etapas mais importantes do sistema de produção agrícola. Os critérios utilizados para a detecção de fungos em sementes seguem as regras aprovadas pela *International Seed Testing Association (ISTA)* e, em sua maioria, consistem em estimular os micro-organismos a produzirem estruturas típicas de cada fungo, formadas sobre ou ao redor das sementes que permitam a sua identificação, por meio de *Blotter test* ou teste de incubação em substrato de papel filtro embebido em meio de cultura (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION - ISTA, 1981; MACHADO; LANGERAK, 2002; NEERGAARD, 1979).

Com os avanços da biologia molecular, técnicas mais sensíveis e precisas têm sido amplamente utilizadas para a detecção rápida e segura de patógenos em lotes de sementes, e o estudo da expressão de genes específicos da interação semente/patógeno fundamentais para a tomada de decisão quanto ao destino e forma de armazenamento desses lotes.

Detalhes sobre a detecção de *F. verticillioides* em sementes de milho e outras espécies hospedeiras são descritos no Manual de Análise Sanitária de Sementes, que faz parte das Regras para Análise de Sementes publicadas pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2009).

A detecção molecular de patógenos em sementes, por meio do PCR convencional, tem sido relatada em alguns patossistemas. Entre eles se encontram *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (BOTELHO, 2011), *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em milho (BARROCAS et al., 2012), *Magnaporthe grisea* em arroz (CHADHA; GOPALAKRISHNA, 2006) e *Plasmopara hastedii* em sementes de girassol (IOOS et al., 2007).

O PCR em tempo real tem sido promissor na identificação e estudo de genes que possam estar envolvidos no mecanismo de infecção da interação patógeno/semente que na maioria das vezes causam perdas irreparáveis e irreversíveis. Para identificar genes diferencialmente expressos em sementes de

trigo da cultivar Ning 7840, considerada uma das poucas cultivares resistentes à *Giberela*, Kong, Anderson e Ohm (2005) utilizaram o método de hibridização subtrativa supressiva (SSH), seguido de *qRT-PCR*. As sementes de trigo foram infectadas com *F. graminearum* em diferentes potenciais de inóculo (2, 6, 12, 24, 36, 72 e 96 h), e segundo esses autores seis genes relacionados à defesa das sementes ao fungo foram identificados.

Caixeta (2012), trabalhando com *F. verticillioides* por meio da técnica de hibridização subtrativa identificou possíveis genes que podem estar associados à presença do fungo em sementes de milho. Dentre os genes encontrados estão: *Poliubiquitina*, *Proteína Hipotética* e *Proteína Spatula* como potenciais promissores na identificação de sementes infectadas pelo fungo.

2.2 Inoculação em sementes

A disponibilidade de sementes contaminadas é indispensável à condução de diversos estudos na área de patologia de sementes como metodologia de detecção de patógenos, teste de eficiência de tratamento de sementes e epidemiologia de doenças transmitidas por sementes (MACHADO, 1988).

A maioria dos métodos utilizados na inoculação de fungos em sementes, disponibiliza umidade suficiente para o início do processo de embebição e germinação das sementes. Esse fenômeno normalmente gera transformações físicas e/ou fisiológicas que podem dificultar a identificação dos fungos durante a avaliação, podendo não assegurar a infecção pelo patógeno em níveis desejados (TEIXEIRA et al., 2005).

O uso da técnica de restrição hídrica tem sido eficaz no controle da germinação de sementes por meio de substratos próprios para inocular fungos (COSTA, 2003; MACHADO et al., 2004). Esse método permite a inibição ou o retardamento da germinação das sementes, possibilitando a exposição dessas à

colônia do fungo por períodos prolongados, obtendo maior infecção das sementes (TEIXEIRA et al., 2005).

A inoculação de sementes por meio dessa técnica tem sido promissora e bastante eficiente para todos os patossistemas estudados (CARVALHO, 1999; CELANO, 2004; COSTA et al., 2003; MACHADO; LANGERAK, 2002; MACHADO et al., 2004; SOUSA et al., 2008). Porém, a inoculação pelo contato de sementes com colônias de fungos em substrato por meio da técnica de restrição hídrica apresenta limitações.

A exposição das sementes sobre a colônia do patógeno durante um tempo requerido para a infecção maior que 36 horas pode causar danos, de modo que o soluto utilizado na restrição pode tornar-se tóxico ou causar alterações estruturais nas sementes, como a degradação de macromoléculas (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos) e, conseqüente, diminuição das atividades bioquímicas (COOLBEAR, 1995; MACHADO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2002).

Para Machado et al. (2001a), o uso da restrição hídrica em meio BDA + manitol permite que as sementes de milho fiquem expostas aos fungos *Diplodia maydis*, *Fusarium verticillioides* e *Cephalosporium acremonium*, resultando em maior número de plântulas doentes oriundas de sementes inoculadas. O mesmo comportamento foi verificado em experimentos com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Botryodiplodia theobromae* em sementes de algodão (MACHADO; LANGERAK, 2002).

De acordo com Machado et al. (2004), o nível de penetração ou colonização do patógeno nas sementes pode ser controlado de acordo com o tempo de exposição das sementes ao fungo. Em trabalho desenvolvido por Carvalho (1999), as sementes de milho que foram inoculadas com *Stenocarpella maydis* apresentaram um nível de infecção de 67% após 96 horas de exposição à colônia fúngica.

Dessa forma, a utilização da técnica de restrição hídrica como meio de se obter sementes infectadas apresenta vantagens em relação a outros métodos por não depender de aspectos como sazonalidade e de operações morosas que nem sempre mostram resultados satisfatórios (MACHADO et al., 2004).

2.3 Armazenamento e qualidade fisiológica de sementes de milho

O armazenamento de sementes constitui uma forma segura e econômica de conservação da diversidade genética vegetal em bancos de germoplasmas, mantendo-as em um ambiente, no qual as mudanças fisiológicas e bioquímicas sejam mantidas em nível aceitável. Também após o beneficiamento a preservação da qualidade de sementes é de fundamental importância no processo produtivo, pois a qualidade das sementes armazenadas deve ser mantida, no mínimo, até a época de semeadura.

A qualidade fisiológica é adquirida durante o desenvolvimento e pode ser perdida por processos deteriorativos, que podem iniciar durante o armazenamento. De acordo com Pádua e Vieira (2001), lotes de sementes com porcentagem de germinação semelhantes, mas com níveis de vigor diferentes, podem apresentar diferenças na velocidade de deterioração, dependendo das condições de armazenamento.

No armazenamento, as sementes respiram continuamente, consumindo suas reservas e transformando-as em dióxido de carbono, água e calor, sendo que a perda desses compostos químicos durante o armazenamento deve ser reduzida, implantando-se processos de manuseio de sementes que garantam a qualidade do produto armazenado, evitando assim perdas quantitativas e qualitativas (PEDROSA; CIRNE; MAGALHÃES NETO, 1999).

A manifestação da deterioração das sementes está muito associada ao armazenamento, assim, teoricamente, tem início no ponto de maturidade

fisiológica e pode ser acelerada e estendida até o período de pós-semeadura (MARCOS FILHO, 2005).

Segundo Vieira et al. (2002), a deterioração de qualquer semente armazenada pode acontecer de forma rápida ou lenta, dependendo das características ambientais e da própria semente. Delouche (2002), afirmou que a deterioração das sementes é um complexo de mudanças que ocorrem com o passar do tempo, resultando na diminuição do desempenho das mesmas.

Entre as principais alterações envolvidas na deterioração, são observadas alteração da composição química, quebra de proteínas e a oxidação de lipídeos; alteração da integridade de membranas, o esgotamento de reservas, aumento da permeabilidade e desorganização das membranas; alterações enzimáticas e de nucleotídeos (FERREIRA; BORGHETTI, 2004), resultando na redução de germinação e no vigor.

Geralmente, a redução da temperatura, da umidade, e luminosidade, reduz o metabolismo das sementes e evita o ataque de micro-organismos, aumentando sua longevidade (VIEIRA et al., 2002). Isso é observado na pesquisa de Tanaka, Maeda e Almeida (2001), avaliando a associação de fungos e sementes de milho durante 12 meses de armazenamento em câmara fria (14°C, 40% UR) e ambiente não controlado. Esses autores verificaram maior incidência dos principais fungos de campo: *Alternaria alternata*, *Bipolaris maydis*, *Cephalosporium acremonium*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium verticillioides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus spp.* e *Trichoderma spp.*, cuja sobrevivência decresceu ao longo do armazenamento, principalmente em ambiente não controlado. Nessas condições, a sobrevivência de *F. verticillioides* foi diminuindo gradativamente até o final dos 12 meses.

Também em pesquisa realizada por Cappelini et al. (2005), foi verificada uma redução da incidência de *F. verticillioides* em sementes de milho de 98% para 63% quando externamente, e de 41% para 34%, quando

internamente, após 12 meses de armazenamento sob condições ambientes. Matos et al. (2013), verificaram que o tratamento de sementes de milho com a mistura dos fungicidas pyraclostrobin e tiofanato metílico (50 mL i.a. 100 kg¹ de sementes), e carbendazim, thiram e micronutrientes (100 mL i.a. 100 kg¹ de sementes) foi eficiente em manter a qualidade fisiológica das sementes, e reduziu a incidência de *F. verticillioides*, ao longo do período de armazenamento.

Vilela et al. (2010) não observaram diminuição significativa na incidência de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijão infectadas e armazenadas durante 10 meses.

2.4 Expressão Gênica

Com o uso generalizado do milho e aumento da demanda por elevadas produções, existe a necessidade do desenvolvimento de cultivares com maiores rendimentos e melhor resistência ao ataque de patógenos. Para esse fim, os estudos devem ser conduzidos para melhor compreender os mecanismos que governam a infestação e infecção de sementes de milho por fungos e a identificação de genes que expressam de forma específica.

Muitos eventos relacionados ao crescimento, desenvolvimento de plantas ou até mesmo em resposta a vários estímulos, são resultantes da alteração da expressão de genes na planta. Uma maneira de conhecer essa informação expressa pelo genoma é pela análise de RNA. Por meio da quantificação e qualificação dos níveis de transcritos nas células vegetais é possível que genes, diferencialmente expressos possam ser identificados e, conseqüentemente, sua função metabólica possa ser investigada (KUHN et al., 2001).

A capacidade de medir, simultaneamente, a expressão de milhares de genes tem levado ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais complexas, dentre elas o PCR quantitativo em tempo real (*qRT-PCR*), usado recentemente como ferramenta no estudo da expressão gênica e quantificação de sequências específicas em plantas.

O *qRT-PCR* permite que a amplificação seja acompanhada em tempo real, durante a fase exponencial da corrida, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada com precisão. Quando comparado com outras técnicas de avaliação existentes, essa permite uma detecção do ácido nucleico de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON; SAINDRENAN, 2004). Um dos agentes que tem a capacidade de ligar às fitas duplas de DNA capaz de gerar fluorescência é o *SYBRGreen*, permitindo a quantificação de cDNA em tempo real. Esse agente possui tecnologia simples, custo relativamente baixo e sensibilidade quando comparado aos demais (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Para expressar os resultados dos ensaios de quantificação, pode-se utilizar a quantificação relativa, que pode ser deduzida considerando diferenças de *Ct* (*ciclo threshold*). O *Ct* é o número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha-base (*threshold*), entre as amostras e os padrões de expressão constitutiva (BUSTIN, 2000). Para esses padrões são necessários genes de referência endógenos que atendam a três requisitos: ter baixa heterogeneidade entre cultivares, ser específico para a espécie a ser estudada e exibir baixo número de cópias (DING, 2004).

Essa técnica tem sido de grande importância no aprimoramento dos conhecimentos na era pós-genômica, sendo utilizada em estudos com plantas para a determinação do número de inserções de T-DNA em plantas transgênicas (INGHAN et al., 2001; YANG et al., 2005), quantificar o nível de transcritos em órgãos vegetais (HERNANDEZ et al., 2001; WANG et al., 2012), validação de experimentos de microrranjos e monitoramento de biomarcadores

(VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008), quantificar a presença de transgênicos em grãos e sementes (NASCIMENTO, 2010), quantificar a presença de patógenos em sementes (CHILVERS et al., 2007) e tem sido empregado com sucesso na análise da expressão de vários genes na cultura do milho (FU et al., 2012; YANG et al., 2011; ZHAO et al., 2004).

Na cultura do milho, a expressão gênica utilizando *qRT-PCR*, foi utilizada por Luo et al. (2008), no intuito de estudarem as características da expressão gênica durante o desenvolvimento das sementes. Foi observado que os genes que conferem a atividade de defesa antifúngica nas sementes apresentam-se de maneira mais significativa 40 dias após a polinização. Já Uzarowska (2009), empregou essa técnica para analisar genes de resistência a vírus. Pôde-se observar um padrão na expressão de genes relacionados à resistência ao mosaico da cana-de-açúcar (SCMV) em milho. Além disso, foram identificados possíveis marcadores para a manipulação de resistência ao SCMV.

Segundo Guillemette, Iacomi-Vasilescu e Simoneau (2004), a técnica de PCR em tempo real foi capaz de detectar a incidência de *Alternaria brassicae* em sementes de crucíferas em níveis a partir de 2%. McNeil et al. (2004) trabalhando com sementes de trigo infectadas com *Tilletia caries*, concluíram que a técnica de *qRT-PCR* é promissora na identificação do fungo.

Diante do exposto, a técnica de PCR em tempo real pode ser uma alternativa em estudos de expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de infecção de sementes por patógenos, as quais estão relacionadas com o início do processo de deterioração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi realizado no Laboratório Central de Análise de Sementes e Laboratório de Patologia de Sementes dos Departamentos de Agricultura e Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Foram utilizadas três cultivares de milho híbrido recém-colhidas, cedidas pela empresa Biomatrix. As sementes foram submetidas ao teste de germinação, para verificar o perfil de cada lote e todos apresentaram germinação superior a 92%. Além disso, as sementes foram submetidas ao teste de sanidade, e apenas os fungos *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., detectados.

Tabela 1 Características das sementes de milho utilizadas no experimento e resistência ao fungo *Fusarium verticillioides*¹

Híbrido	Base Genética	Empresa	Resistência ²
BM 840 PRO	HS	Biomatrix	MR
BM 810	HS	Biomatrix	MS
BM 207	HT	Biomatrix	MS

¹Informações fornecidas pela empresa produtora das sementes

²MR – medianamente resistente; MS – medianamente susceptível

3.2 Obtenção do isolado das sementes de milho

O isolado de *Fusarium verticillioides*, patogênico ao milho, designado para as inoculações, foi obtido a partir das mesmas sementes de milho, pelo método *Blotter test*. Após a identificação das colônias de *F. verticillioides*, essas foram transferidas para placas de Petri (5 cm de diâmetro), contendo BDA (Batata Dextrose Ágar) e mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD à

temperatura de 25° C durante sete dias. Obtidas as culturas puras, foram mantidas em microtubos até sua utilização.

3.3 Inoculação das sementes com *Fusarium verticillioides*

As sementes de milho foram inoculadas com *Fusarium verticillioides* pelo método de restrição hídrica em substrato agarizado (MACHADO et al., 2001a). Para a inoculação foi utilizado potencial hídrico de -2,0 MPa e adição de manitol ao meio BDA (Batata Dextrose Ágar) a 2%, em placas de Petri (15 cm de diâmetro) que foram inoculadas com suspensão de conídios provenientes das culturas puras do fungo. Em seguida as placas foram distribuídas ao acaso em câmara de crescimento do tipo BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante cinco dias para o desenvolvimento das colônias do fungo.

Após esse período, as sementes de milho previamente desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, lavadas e secas foram distribuídas uniformemente, em camada simples, sobre as colônias e mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD com temperatura regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas por: 0, 24, 48, 72, 96 horas. Logo após a exposição nos diferentes potenciais de inóculo, as sementes foram colocadas para secar por 24 horas em condições ambientais de laboratório. Em seguida parte das sementes foi armazenada em embalagens de papel trifoliado, por um período de sete meses em ambiente não controlado, e outra parte foi utilizada nas avaliações após cada período de inoculação.

Como testemunhas foram utilizadas sementes tratadas com o fungicida Derosal Plus®, na dose de 200 a 300 mL para cada 100 kg de sementes, o qual tem como princípio ativo *Carbendazim + Tiram*, a fim de obter sementes com baixa incidência de fungo.

A determinação da qualidade fisiológica das sementes foi feita pelos testes de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), e teste de frio (F), enquanto a qualidade sanitária (S) foi determinada pelo *Blotter test* com congelamento.

3.4 Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes de milho

3.4.1 Teor de Água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105°C durante 24 horas, utilizando-se duas subamostras de cada tratamento, conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em percentagem média (base úmida).

3.4.2 Teste de Germinação

Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes distribuídas sobre substrato rolo de papel umedecido com uma quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso seco do substrato e colocado em germinador à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A contagem das plântulas foi realizada aos quatro e sete dias após a semeadura (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais. A **Primeira Contagem de Germinação (PC)** – foi realizada com o teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais aos quatro dias após a semeadura.

3.4.3 Emergência de Plântulas

A emergência foi realizada com quatro repetições de 50 sementes em bandejas plásticas contendo areia e solo misturados na proporção de 2:1, a uma profundidade de 1,5 cm. Após a semeadura, as bandejas foram distribuídas ao acaso em uma câmara de crescimento vegetal, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. A irrigação do substrato foi realizada a cada dois dias, com o mesmo volume de água para cada bandeja. A emergência das plântulas foi computada quando se estabilizaram, avaliando-se o número de plântulas normais aos dez dias após a semeadura. Os resultados foram expressos em porcentagem. **Índice de Velocidade de Emergência (IVE)** – a partir do início da emergência, foram realizadas avaliações diárias, e computado o número de plântulas emergidas. O cálculo do índice de velocidade de emergência foi feito conforme a fórmula proposta por (MAGUIRE, 1962).

3.4.4 Teste de Frio

A semeadura foi realizada em bandejas plásticas, utilizando como substrato uma mistura de solo e areia na proporção de 2:1. A umidade do substrato foi ajustada para 60% da capacidade de campo. Após a semeadura, as sementes foram cobertas com 3 cm da mistura de solo-areia, e em seguida foram dispostas ao acaso em câmara fria à temperatura de 10°C durante um período de sete dias. Findo esse período, as bandejas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias, efetuando-se a contagem de plântulas normais emergidas (BARROS et al., 1999).

3.4.5 Teste de Sanidade

O teste de sanidade das sementes foi avaliado pelo *Blotter test* com congelamento. As sementes foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% durante um minuto, para eliminar a contaminação superficial pelo fungo *Fusarium verticillioides*. Foram utilizadas oito repetições de 25 sementes distribuídas em placas de Petri (15 cm de diâmetro), contendo três folhas de papel filtro, previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada e esterilizada. As sementes foram incubadas por 24 horas à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, e transferidas para o freezer por mais 24 horas e novamente incubadas à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por cinco dias. Para a identificação da incidência de *Fusarium verticillioides* nas sementes, foi utilizado o microscópio estereoscópio e os resultados expressos em porcentagem de sementes contaminadas.

3.5 Análise da expressão de genes associados à presença de *Fusarium verticillioides* por meio da técnica de *qRT-PCR*

A análise de genes associados à presença do fungo *Fusarium verticillioides* por meio da técnica de *qRT-PCR* foi dividida em quatro etapas: Extração e Purificação do RNA, Transcrição Reversa para Síntese do cDNA, PCR em Tempo Real, e Análise dos Resultados.

Para a extração do RNA, utilizaram-se sementes das três cultivares (BM 840 PRO, BM 810 e BM 207) inoculadas com *F. verticillioides*, e tratadas com o fungicida Derosal Plus (testemunhas), antes e após o armazenamento.

3.5.1 Extração e Purificação do RNA

Para a extração do RNA as sementes de milho foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e com adição do reagente *Pure Link RNA Plant*® (*Invitrogen*), seguindo as especificações do manual do fabricante.

A integridade do RNA foi verificada e visualizada em gel de agarose 1% utilizando-se o corante fluorescente *GelRed*. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro, utilizando-se comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

As amostras de RNA total foram tratadas com *DNase DNA Free* (TURBO DNase - Ambion), seguindo protocolo conforme recomendações do fabricante, para evitar qualquer contaminação com DNA. Para verificar a pureza do RNA, após o tratamento com *DNase*, foi realizada uma PCR convencional com todas as amostras, comprovando a não amplificação do DNA. Nessa reação como controle positivo foi utilizada uma amostra de DNA de sementes de milho e os *primers* dos controles endógenos Ubiquitina e Desidrogenase Alcoólica (*ADH*). As amplificações foram avaliadas em gel de agarose 1,5%, corado com *GelRed*.

3.5.2 Transcrição Reversa para Síntese do cDNA

Após o processo de extração e purificação do RNA, foi realizada a síntese de cDNA. Para isso foi utilizado o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription cDNA*® da *Applied Biosystems*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.5.3 Genes Analisados

Os genes relacionados à infecção das sementes de milho pelo fungo *Fusarium verticillioides* para as análises de expressão pela técnica de *qRT-PCR* (Tabela 2), foram selecionados de acordo com a pesquisa realizada por (CAIXETA, 2012). Como controles endógenos foram utilizados os genes Ubiquitina e Desidrogenase Alcoólica (*ADH*) (SCHOLDBERG, 2009).

Tabela 2 Sequências dos oligonucleotídeos sintetizados especificamente para amplificar os genes relacionados à infecção de *Fusarium verticillioides*, e genes de referência

Gene	Sequência 5'-----3'
<i>Zea mays clone 276247</i>	F CACGGACTACTCCAGGTTCTTCA
<i>Hypothetical protein</i>	R GTGCTGGTCTGGTCGTCCTT
<i>Polyubiquitin</i>	F TGGTTTTTCCAGTCAGGGTCTT
	R CGAGGTACCCTTCACCTTGTTT
<i>Zea mays protein</i>	F ACCGACAAAGTTTCCATGCTAGA
<i>SPATULA</i>	R CCATGACCAGCATCTGAAGCT
<i>Ubiquitina</i>	F AAGGCCAAGATCCAGGACAA
	R TTGCTTTCCAGCGAAGATGA
<i>Desidrogenase Alcoólica (ADH)</i>	F AGGACGCTGAGTTAAGACC
	R CACATTTGGCAGATCAGTGC

(F) sequência do *primer forward* e (R) sequência do *primer reverse*

3.5.4 Ensaio de *qRT-PCR*

Para a análise da expressão gênica quantitativa por *qRT-PCR* foi utilizado o equipamento *ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems)*, e o sistema de detecção *SYBR Green* e o *cDNA* obtido a partir de *RNA* extraído das sementes. As condições térmicas da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a

60°C, e finalizando com 15 segundos a 95°C. Os dados foram coletados e armazenados no programa *7500 Software* (Versão 2.0.1). Para cada reação, foi utilizado 1,0 µL de *cDNA* diluído 1:5, 0,2 µL de cada *primer* e 5,0 µL de *Master Mix SYBRGreen UDG* com *ROX* (*Invitrogen*) para um volume final 10,0 µL/amostra. Os controles negativos e as curvas de *melting* foram incluídos em todas as análises.

Foram utilizadas duas repetições biológicas em três replicatas técnicas, para cada gene em estudo, sendo os resultados normalizados usando o Ciclo *Threshold* (CT) obtidos pela expressão dos genes de referência Ubiquitina e Desidrogenase alcoólica (*ADH*).

O CT foi determinado pelo número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha de base (*threshold*). Foi utilizado o método do CT comparativo. Para isso, previamente, foi realizado um experimento de validação para comprovar que as eficiências de amplificação dos genes-alvo e de referências são similares e bem próximas de 100% (TYAGI; BRATU; KRAMER, 1998). As curvas padrões para os genes em estudo foram geradas a partir das seguintes diluições: 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 e 1:3125. Esse procedimento também permitiu a definição da melhor diluição de *cDNA* utilizada em cada reação, a qual foi de 1:5.

As sementes não armazenadas e tratadas com o fungicida Derosal Plus, para cada gene, foram utilizadas como amostras calibradoras e o método utilizado para medir a expressão relativa foi o Método da Curva Padrão Relativa, descrito no manual do aparelho (*Applied Biosystems*). Para a quantificação da expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real, os valores obtidos correspondentes aos níveis de *mRNA's* das amostras foram comparados relativamente aos valores dos níveis de *mRNA's* de controle. Após a obtenção dos dados brutos, esses foram analisados por meio do programa *7500 Software SDS* (Versão 2.0.1). Para calcular o nível de expressão dos genes de interesse

foram considerados: Ct (aumento exponencial do produto de PCR) do gene-alvo e controle endógeno, $\Delta Ct = Ct \text{ (amostra)} - Ct \text{ (controle endógeno)}$ e o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (amostra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$. Em seguida o nível de expressão foi calculado pela fórmula: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para plotagem dos gráficos utilizou-se o programa SigmaPlot.

3.6 Análise estatística

Para a análise dos resultados dos testes utilizados para a avaliação da qualidade fisiológica foi realizada análise conjunta em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2, sendo cinco tratamentos (potenciais de inóculo – 0, 24, 48, 72 e 96 horas), duas épocas de armazenamento (0 e 7 meses), com quatro repetições. O efeito do potencial de inóculo do fungo foi estudado por meio de uma análise de regressão, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa estatístico SISVAR.

Os dados da expressão relativa foram apresentados na forma de gráficos de barra. A análise dos resultados de expressão de cada gene foi realizada de forma comparativa, sendo utilizadas como calibrador as sementes não armazenadas e tratadas com o fungicida Derosal Plus de cada cultivar (BM 840 PRO, BM 810 e BM 207) para cada gene estudado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água das sementes variou de 11,5% a 12%, não havendo necessidade de uniformização.

4.1 Qualidade das sementes antes e após o armazenamento

Germinação

Com base nos resultados observados para as cultivares BM 840 PRO e BM 207, foi constatada diferença quanto à porcentagem de germinação entre as duas épocas analisadas, a partir de 48 horas de inoculação do fungo *F. verticillioides*. Para a cultivar BM 810, essa diferença foi verificada somente a partir de 72 horas (Tabela 3).

Esse resultado é interessante, pois revela que a qualidade fisiológica das sementes avaliada pelo teste de germinação foi diferente, antes e após o armazenamento das sementes de milho. No entanto, à medida que se aumentou o potencial de inóculo, menores valores de germinação foram observados em sementes armazenadas após sete meses.

O potencial fisiológico das sementes pode ser avaliado, tradicionalmente, pelo teste de germinação, conduzido sob condições favoráveis de temperatura, umidade e luminosidade, e também por testes de vigor, que avaliam o desempenho das sementes sob condições desfavoráveis. Quando associado à presença de patógenos, os testes de vigor podem ser ainda mais sensíveis para identificar diferenças no potencial fisiológico entre lotes com germinação aceitável (RAMOS et al., 2014).

Tabela 3 Porcentagem média de germinação (G%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Cultivar	Épocas	Potencial de Inóculo (horas)				
		0	24	48	72	96
BM 840 PRO	0	99 a	96 a	98 a	92 a	85 a
	7	100 a	99 a	84 b	66 b	54 b
CV (%)	5,37					
BM 810	0	96 a	89 a	89 a	62 a	58 a
	7	93 a	93 a	89 a	42 b	21 b
CV (%)	6,25					
BM 207	0	93 a	85 a	91 a	79 a	69 a
	7	91 a	88 a	78 b	58 b	23 b
CV (%)	8,50					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Em relação ao teste de germinação (Figura 1 a), foi observado que para as sementes das cultivares BM 840 PRO, BM810 e BM 207 não armazenadas e inoculadas com o fungo *F. verticillioides*, o aumento do potencial de inóculo gerou redução linear no percentual de germinação, de aproximadamente 100% para 87%, de 99% para 58% e 94% para 72%, respectivamente.

Provavelmente, esse fato ocorreu devido ao fungo *F. verticillioides* apresentar um crescimento rápido e agressivo, podendo causar a morte das sementes antes mesmo da germinação.

Já para as sementes que foram inoculadas e armazenadas por um período de 7 meses (Figura 1 b), percebe-se também queda linear nas porcentagens de germinação, com queda mais acentuada em relação às sementes não armazenadas (Figura 1 a). A cultivar BM 810 teve sua germinação reduzida de aproximadamente 100% para 28%. Já as cultivares BM 840 PRO e BM 207 a

redução foi próxima de 100% para 55% e de aproximadamente 100% para 34%, respectivamente.

Pode-se afirmar que a redução da germinação ocorreu após um estresse provocado pela alta incidência desse micro-organismo nas sementes, e também pelas condições de armazenamento, contribuindo para a sua rápida deterioração e, conseqüente perda de qualidade.

Alguns trabalhos relatam a interferência de *F. verticillioides* na qualidade final, quando associado às sementes. Caixeta (2012) observou uma diminuição da porcentagem de germinação das sementes de milho à medida que se aumentou o tempo de contato dessas sementes com o fungo. Em outro estudo, observou-se que em sementes de pepino inoculadas com o patógeno provocou a redução da germinação dessas sementes (MENEZES et al., 2011).

Comportamento semelhante também foi encontrado por vários autores, Yang et al. (2011) trabalhando com sementes de cevada infectadas com *F. graminearum*, observaram que a germinação dessas sementes foi prejudicada e ocasionou a morte de plântulas e podridão de raízes. Costa et al. (2003) verificaram que o aumento do tempo de exposição das sementes com o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* diminui a germinação das mesmas. Barbosa et al. (2013) afirmaram que após o ponto de maturidade fisiológica ou no armazenamento, a presença de micro-organismos patogênicos reduz o potencial fisiológico e a qualidade sanitária das sementes. Além disso, essa presença também está associada ao decréscimo do poder germinativo e menor desenvolvimento de plântulas (MUNIZ et al., 2004).

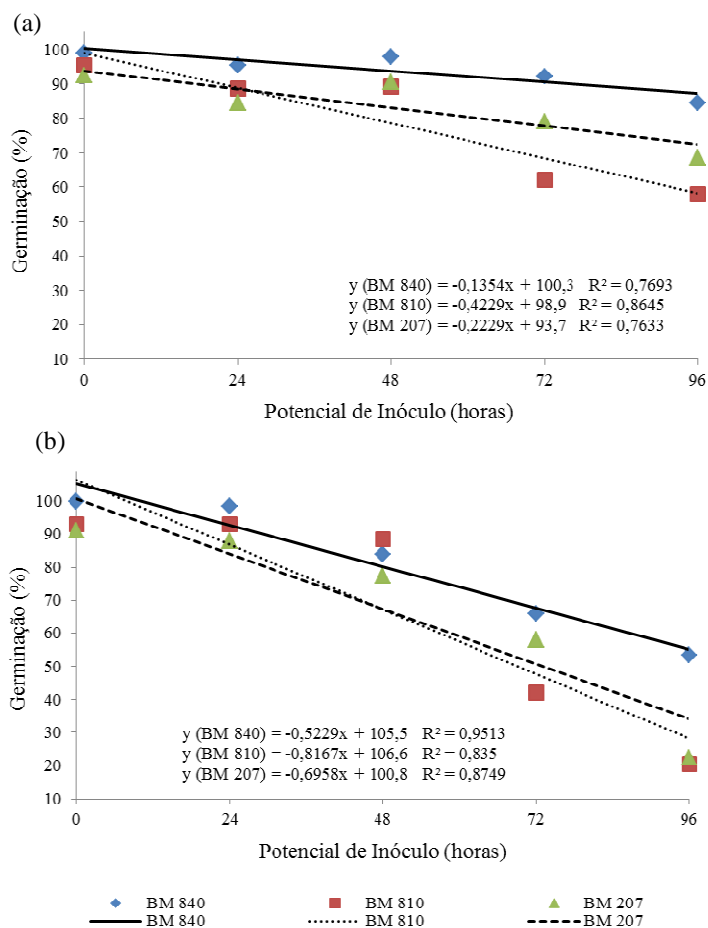


Figura 1 Porcentagem de plântulas normais de sementes de milho das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento, submetidas a diferentes potenciais de inóculo de *Fusarium verticillioides*

Primeira Contagem de Germinação

Os resultados da porcentagem de plântulas normais ao quarto dia para as cultivares BM 840 PRO e BM 207, foram semelhantes em relação àqueles apresentados na (Tabela 3). Observou-se diferença estatística entre as épocas (0 e 7) a partir de 48 horas de inoculação, e para a cultivar BM 810 essa diferença foi observada após 72 horas (Tabela 4).

Segundo Goulart e Fialho (1998) a alta incidência de *F. verticillioides* pode provocar redução do poder germinativo em sementes de milho. Também, Lucca Filho (1984) afirma que as espécies de *Fusarium* podem contribuir para a redução do poder germinativo, sendo essa redução mais acentuada ao longo do armazenamento das sementes.

Tabela 4 Porcentagem média de plântulas normais avaliadas pelo teste de primeira contagem de germinação (PC%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Cultivar	Épocas	Potencial de Inóculo (horas)				
		0	24	48	72	96
BM 840 PRO	0	94 a	83 a	91 a	83 a	69 a
	7	92 a	89 a	75 b	41 b	33 b
CV (%)	7,74					
BM 810	0	94 a	84 a	85 a	61 a	56 a
	7	91 a	88 a	82 a	34 b	16 b
CV (%)	6,12					
BM 207	0	87 a	81 a	88 a	77 a	67 a
	7	88 a	81 a	74 b	54 b	22 b
CV (%)	9,18					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados da primeira contagem de germinação das sementes antes do armazenamento (Figura 2 a), observou-se diferentes efeitos do potencial de inóculo para as cultivares estudadas. Para a cultivar BM 840 PRO o comportamento foi de terceiro grau. Quando as sementes foram tratadas e não inoculadas a porcentagem de germinação na primeira contagem foi de 93% de plântulas normais. Pode-se observar que a partir de 9 horas de inoculação há uma redução do número de sementes germinadas, sendo mantida até 32 horas. Após esse período é observado maior efeito da inoculação na porcentagem de plântulas normais devido ao maior tempo de exposição dessas sementes ao fungo. Já para a cultivar BM 810 o efeito do tempo de exposição das sementes com o fungo *F. verticillioides* foi linear, ou seja, o aumento do tempo de exposição dessas sementes ao inóculo diminui a porcentagem de plântulas normais. Após 96 horas de inoculação, somente 68% das plântulas apresentaram-se normais. Para a cultivar BM 207 foi verificado efeito quadrático, partindo de 85% (sementes tratadas e não inoculadas), alcançando o máximo 86% em 18 horas de inoculação, e a partir desse tempo houve um decréscimo da porcentagem de plantas germinadas ao quarto dia.

Na Figura 2 b estão apresentados os resultados das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 após 7 meses de armazenamento. Para todas as cultivares estudadas observa-se uma tendência linear. As sementes inoculadas com o fungo *F. verticillioides* tiveram redução da porcentagem de plantas germinadas à medida que se aumentou o período de exposição destas ao patógeno, diminuindo de 99% para 32% na cultivar BM 840 PRO, de 100% para 22% na cultivar BM 810, e de 95% para 32% na BM 207, entre as sementes não inoculadas com as inoculadas.

Segundo Caixeta (2012), sementes de milho inoculadas com *F. verticillioides* reduziram a porcentagem de plantas germinadas quando se aumentou o tempo de exposição destas ao patógeno.

Em trabalho com sementes de algodão realizado por Machado et al. (2004), os autores concluíram que o uso da inoculação de fungos através da restrição hídrica aumenta o número de sementes mortas, devido ao alto índice alcançado por meio dessa técnica.

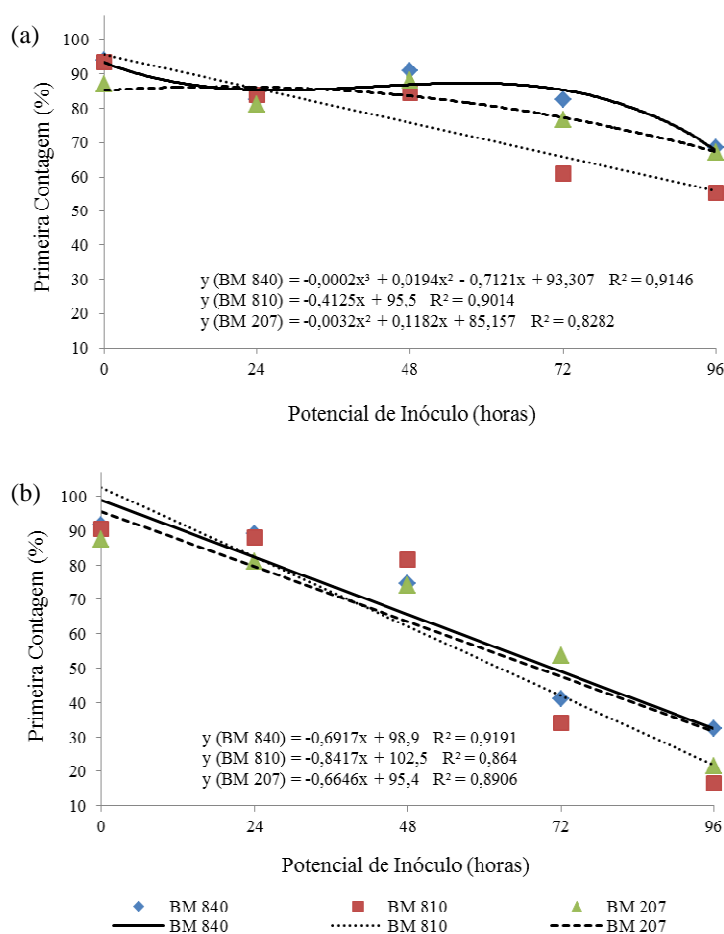


Figura 2 Porcentagem de sementes de milho germinadas avaliadas pelo teste de primeira contagem das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento, submetidas a diferentes potenciais de inóculo de *Fusarium verticillioides*.

Emergência

Os resultados observados para a emergência de plântulas (Tabela 5) foram semelhantes para as cultivares BM 840 PRO e BM 810, uma vez que não houve diferença significativa entre as épocas nos diferentes potenciais de inóculo de (0, 24 e 48 horas). Observou-se que houve redução da emergência para as sementes inoculadas com o fungo somente a partir de 72 horas. Em relação a cultivar BM 207 a diferença foi constatada mais cedo, em 48 horas de inoculação.

Tabela 5 Porcentagem média de emergência (E%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Cultivar	Épocas	Potencial de Inóculo (horas)				
		0	24	48	72	96
BM 840 PRO	0	97 a	96 a	94 a	92 a	65 a
	7	100 a	97 a	94 a	51 b	41 b
CV (%)	5,62					
BM 810	0	97 a	95 a	92 a	89 a	78 a
	7	97 a	95 a	94 a	66 b	49 b
CV (%)	5,30					
BM 207	0	92 a	83 a	91 a	84 a	78 a
	7	94 a	89 a	70 b	46 b	31 b
CV (%)	8,83					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Pelos resultados representados na Figura 3 a, referente à emergência, verifica-se que o efeito dos diferentes potenciais de inóculo nas sementes que não foram armazenadas proporcionou diferenças para as plântulas de todas as cultivares. O modelo que se ajustou à cultivar BM 840 PRO foi o quadrático,

sendo a maior emergência próxima de (100%) observada no potencial de inóculo de 26 horas. O percentual de plântulas com lesões foi mais baixo no potencial de inóculo de 96 horas, provavelmente em função de um maior número de sementes mortas. Já para as cultivares BM 810 e BM 207 o efeito foi linear, o aumento do período de exposição das sementes ao patógeno provocou uma redução da qualidade e consequente aumento do número de plântulas anormais e com lesões.

Em relação à emergência de plântulas após 7 meses de armazenamento das sementes, observou-se o mesmo efeito para todas as cultivares, BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 (Figura 3 b). À medida que se aumenta o período de inoculação das sementes ao fungo *F. verticillioides*, há uma redução do vigor, principalmente ao final das 96 horas, indicando assim, como nos testes de germinação e primeira contagem que a presença desse fungo em sementes de milho pode causar danos irreversíveis e muito agressivos dependendo do tempo de exposição e do nível de infecção alcançado. De acordo com Eira e Marcos Filho (1990) um dos mais importantes sintomas da perda de qualidade fisiológica é a lentidão do processo de germinação das sementes, acompanhada pelo aumento do período decorrido entre a germinação da primeira e da última semente de um lote e, consequente desuniformidade entre plântulas de um mesmo lote. Além disso, quanto maior o tempo requerido para a emergência das plântulas, maiores são os riscos oferecidos por estresses abióticos e bióticos no campo (KHAN; ABAWI; MAGUIRRE, 1992).

Pode-se observar também, nas Figuras 3a e 3b, a influência do condicionamento osmótico em relação ao aumento do potencial de inóculo, na maioria das cultivares, sendo possível verificar que o efeito foi negativo a partir de 24 horas de exposição, exceto para cultivar BM 840 PRO não armazenada, que teve todas as suas plântulas emergidas (100%) no potencial de 26 horas, podendo observar um efeito “*priming*” sobre as sementes dessa cultivar.

No âmbito da tecnologia de sementes o condicionamento osmótico é utilizado para aumentar a velocidade e a uniformidade da germinação de sementes, mas ele pode ser afetado por fatores como temperatura, luz, secagem, disponibilidade de oxigênio e contaminação microbiana (ROVIERI et al., 1999). Por isso os efeitos entre espécies, cultivares e lotes podem ser variáveis (ALI; SOUZA MACHADO; HAMILL, 1990; BRADFORD et al., 1990; BROCKLEHURST; DEARMAN, 1983; CANTLIFFE; ELBALLA, 1994).

Machado et al. (2001a), trabalhando com sementes de milho, verificaram que um maior período de contato dessas sementes com o fungo *F. verticillioides* apresenta maior percentual de plantas com lesões por esse patógeno. Isso foi observado pelos resultados dos testes de emergência das plântulas e de germinação. Também em trabalho realizado por Machado et al. (2004) eles observaram que sementes de algodão inoculadas em diferentes potenciais hídricos (-0,8 e -1,0 MPa) e com a presença do patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, houve redução do número de plântulas emergidas em relação àquelas sementes que não foram inoculadas.

Trabalhando com sementes de soja inoculadas através da técnica de restrição hídrica com *Sclerotinia sclerotiorum*, com um potencial de -1,0 MPa Machado et al. (2001b) verificaram a morte de todas as sementes no teste de emergência de plântulas.

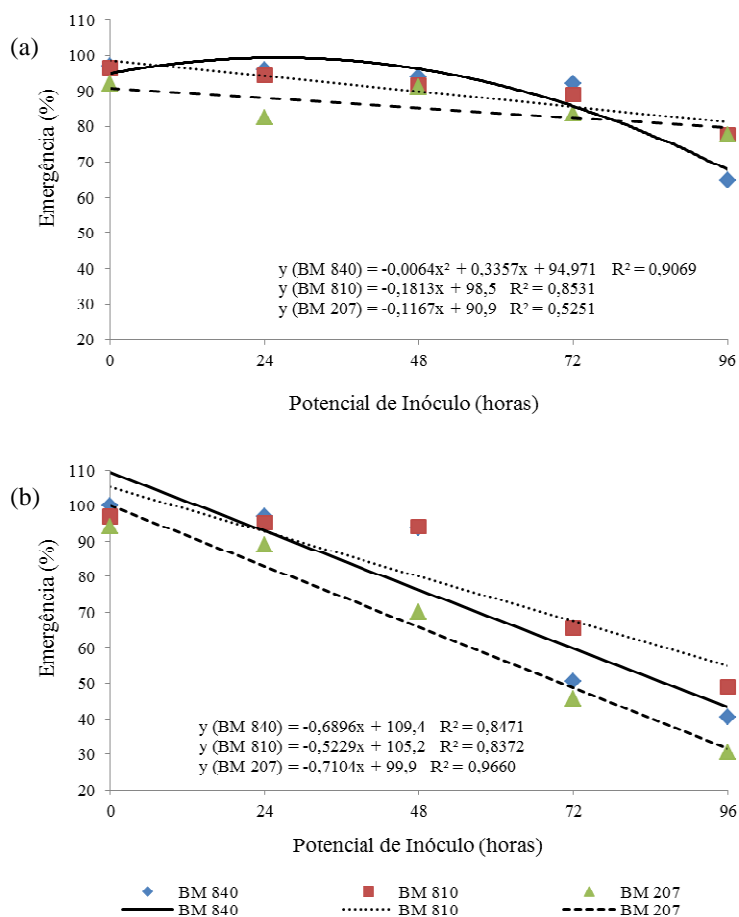


Figura 3 Porcentagem da emergência de plântulas de milho das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 infectadas por *Fusarium verticillioides* com diferentes potenciais de inóculo antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento das sementes

Índice de velocidade de emergência

Em relação ao teste de IVE, de um modo geral as cultivares apresentaram resultados semelhantes. Pode-se observar que para todas as cultivares nos potenciais de inóculo de (0, 72 e 96 horas) houve diferença significativa em relação às épocas estudadas, sendo superiores na época 0. Já para os potenciais de (24 e 48 horas) a cultivar BM 840 PRO apresentou maior índice de velocidade de emergência quando armazenadas por 7 meses. E a cultivar BM 810 foi a única que não se diferenciou no potencial de 24 horas, independente da época (Tabela 6).

Tabela 6 Porcentagem média do índice de velocidade de emergência (IVE%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Cultivar	Épocas	Potencial de Inóculo (horas)				
		0	24	48	72	96
BM 840 PRO	0	16 a	12 b	11 b	11 a	8 a
	7	13 b	15 a	14 a	6 b	5 b
CV (%)	6,43					
BM 810	0	16 a	15 a	13 b	12 a	11 a
	7	14 b	15 a	15 a	10 b	7 b
CV (%)	6,13					
BM 207	0	15 a	11 b	12 a	10 a	10 a
	7	12 b	14 a	10 b	6 b	4 b
CV (%)	10,93					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na Figura 4 a, estão representados os resultados do IVE. Foi verificado que a inoculação do fungo *F. verticillioides* nos diferentes potenciais (0, 24, 48,

72 e 96 horas) proporcionou diferenças significativas para todas as cultivares antes do armazenamento. O modelo de regressão que se ajustou aos dados da cultivar BM 207 foi o de segundo grau. Em sementes não inoculadas, o índice de velocidade de emergência foi de 14%, mas com o aumento da exposição das sementes ao inóculo os valores reduziram no potencial de 24 horas, esse valor caiu para 12%, o mínimo 10% foi verificado com o potencial de 77 horas. Para as cultivares BM 840 PRO e BM 810 a tendência foi linear, ocorrendo uma diminuição do estabelecimento de plântulas à medida que se aumentou a quantidade de horas das sementes em contato com o patógeno.

Com base nos resultados do IVE (Figura 4 b), foi observado comportamento diferente para as sementes armazenadas da cultivar BM 207 em relação às sementes não armazenadas (Figura 4 a). Após o período de armazenamento, essas sementes apresentaram uma diminuição linear do vigor com o aumento do período de inoculação, sendo verificado maior vigor nas não inoculadas (14%). Para as cultivares BM 840 PRO e BM 810, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático. Apesar de ter uma queda do vigor devido a estresses causados pela inoculação do fungo e pelas condições naturais do armazenamento, também foi observado que o índice de velocidade de emergência para a cultivar BM 840 PRO foi máximo 14% próximo a 19 horas. Já para a cultivar BM 810 o máximo alcançado foi 15% em 28 horas de inoculação. Essa maior velocidade na emergência é um componente relevante para o vigor, pelo fato de proporcionar um rápido estabelecimento das plântulas. Sementes com maior IVE possuem melhor desempenho e, conseqüentemente, maior capacidade de resistir a alguns tipos de estresses que possam ocorrer, além de escapar da infecção causada por alguns agentes patogênicos (DAN et al., 2010). O *Fusarium verticillioides* apresenta diferentes padrões, quanto à taxa de crescimento micelial e características patogênicas em sementes e plântulas de milho, podendo representar um risco para o estabelecimento da cultura, pela

redução da germinação e emergência de plântulas (KUHNEM JÚNIOR et al., 2013). Segundo Albuquerque e Carvalho (2003), *F. verticillioides* é o patógeno mais detectado em sementes de milho, e pode interferir no potencial fisiológico, reduzindo o estande de plântulas no campo.

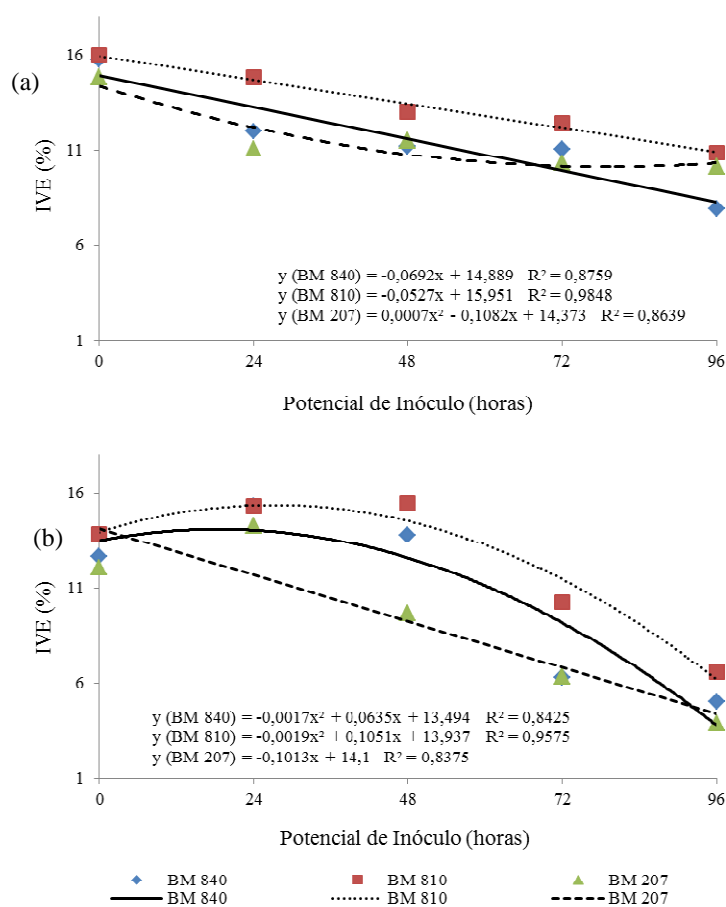


Figura 4 Porcentagem do índice de velocidade de emergência de sementes de milho das cultivares BM 840 PRO BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento, submetidas a diferentes potenciais de inóculo de *Fusarium verticillioides*

Teste de Frio

Os resultados observados para o teste de frio (Tabela 7) foram semelhantes em todas as cultivares nas duas épocas estudadas. Não houve diferença significativa entre as épocas para os potenciais 0 e 24 horas de inoculação do fungo *F. verticillioides* nas sementes. A partir de 48 horas essa diferença já pode ser verificada para todas as cultivares. Menor vigor foi observado nas plântulas da cultivar BM 207 nos potenciais de inóculo 48, 72 e 96 horas quando as sementes foram armazenadas por sete meses, apresentando médias de 50%, 29% e 8%, respectivamente. Verifica-se também que, em todas as cultivares, quando comparadas as médias de emergência de plantas no teste de frio antes e após o armazenamento, ocorreu perda da qualidade de sementes a partir de 48 horas, com reduções significativas de emergência de plantas naquelas que foram armazenadas.

Para avaliar o vigor das sementes de milho a maioria das empresas tem utilizado o teste de frio. O princípio do teste está relacionado com a exposição das sementes a uma baixa temperatura, alta umidade e aos agentes patogênicos, devido à utilização de terra proveniente de áreas de cultivo de milho (LOVATO; NOLI; LOVATO, 2005; WOLTZ et al., 1998). Esse teste é considerado um teste de resistência, pois o lote de sementes que melhor resistir às condições adversas é considerado o de maior potencial fisiológico. Além disso, o teste de frio fornece informações sobre a capacidade das sementes de superar as condições de estresses causados no campo (VIEIRA; CARVALHO, 1994).

Tabela 7 Porcentagem média de emergência de plântulas no teste de frio (F%) de três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Cultivar	Épocas	Potencial de Inóculo (horas)				
		0	24	48	72	96
BM 840 PRO	0	100 a	98 a	91 a	94 a	80 a
	7	98 a	96 a	55 b	34 b	18 b
CV (%)	8,12					
BM 810	0	98 a	82 a	92 a	84 a	61 a
	7	95 a	89 a	49 b	42 b	19 b
CV (%)	9,26					
BM 207	0	89 a	85 a	63 a	71 a	62 a
	7	93 a	78 a	50 b	29 b	8 b
CV (%)	11,0					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o teste de frio (Figura 5 a) foram constatados comportamentos distintos entre as cultivares não armazenadas e contaminadas com *F. verticillioides*. Na cultivar BM 810 pode-se observar que a partir de 23 horas de exposição das sementes ao fungo há uma diminuição do vigor, sendo mantido até próximo de 81 horas. Após esse período foi observado menor vigor dessas plântulas devido à permanência das sementes com o inóculo por um maior tempo. Já para as cultivares BM 840 PRO e BM 207 o efeito do potencial de inóculo em relação ao vigor das plântulas apresentou um comportamento linear. Após 96 horas de inoculação das sementes de milho das cultivares (BM 810 e BM 207) com o fungo, verificou-se menor porcentagem de plântulas normais avaliadas no teste de frio. Isso permite inferir que o fungo *F. verticillioides* é prejudicial à qualidade das sementes a partir de certo nível de infecção.

Na Figura 5 b, estão representados os resultados do teste de frio para aquelas sementes que foram armazenadas durante 7 meses em condições não controladas. Para todas as cultivares a tendência foi linear, com a diminuição do vigor das sementes à medida que se aumenta a permanência das mesmas ao inóculo. Para a cultivar BM 840 PRO a média estimada, sem inoculação do fungo, foi de aproximadamente 100%, ao passo que, com a inoculação de 72 horas o valor foi de 38%, chegando a 16% de plântulas vigorosas com 96 horas. Nas sementes da cultivar BM 810 o comportamento foi semelhante, as sementes que não foram inoculadas tiveram 99% das plântulas vigorosas, e àquelas inoculadas com 72 e 96 horas apresentaram 39% e 19%, respectivamente. E a cultivar BM 207 na ausência de inoculação apresentou 95% de plântulas vigorosas, mas após 96 horas de inoculação esse valor foi reduzido para 7%.

Ramos et al. (2014) trabalhando com sementes de milho de três híbridos diferentes, concluíram que o fungo *F. graminearum* reduziu o vigor das sementes quando essas foram expostas a períodos de até 8 dias, a 10°C. Avaliando o vigor de lotes de sementes contaminadas por *F. graminearum*, pelo teste de frio, Cícero e Vieira (1994) concluíram que a presença desse fungo nas sementes por um período de sete dias em câmara fria reduziu o desempenho dos lotes em função do nível de infecção.

Em trabalho com sementes de triticale, Medina, Tanaka e Parisi (2009) verificaram uma redução da viabilidade de *F. graminearum* nas sementes, em função do tempo de exposição a baixas temperaturas (10°C e 30% UR).

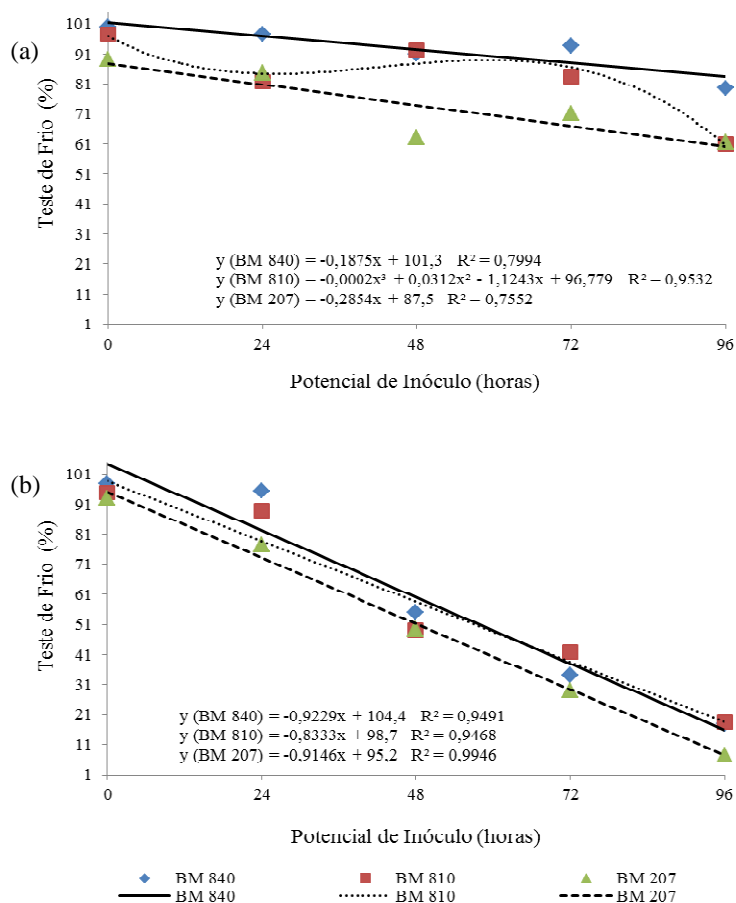


Figura 5 Porcentagem da emergência de plântulas no teste de frio em sementes de milho das cultivares BM 840, BM 810 e BM 207 infectadas por *Fusarium verticillioides* com diferentes potenciais de inóculo, antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento das sementes

Teste de Sanidade

De acordo com a incidência de *Fusarium verticillioides* nas sementes de milho da cultivar BM 840 PRO, inoculadas com o referido patógeno, pode-se observar menor média 38% no potencial de inóculo de 24 horas, após o armazenamento. Mas, com o aumento do potencial de inóculo, essas médias não se diferenciaram entre as épocas estudadas. Já para a cultivar BM 810, verificou-se diferença significativa entre as sementes não armazenadas com àquelas armazenadas nos potenciais de 24 e 48 horas. Pode-se inferir que até certo nível de infecção há uma redução da porcentagem de incidência desse patógeno nas sementes de milho, após 7 meses de armazenamento em ambiente não controlado. Para a cultivar BM 207, a medida que se aumenta o período de exposição das sementes ao patógeno (24, 48 e 72 horas), observa-se uma diminuição da incidência de *F. verticillioides* após o armazenamento, exceto para as sementes que não foram inoculadas 0 horas e para as inoculadas por 96 horas, que não apresentou diferenças estatísticas (Tabela 8).

Tanaka, Maeda e Almeida (2001) estudando o comportamento de *F. verticillioides* durante 12 meses de armazenamento em ambiente não controlado, verificaram que a sobrevivência do fungo em sementes de milho foi gradativamente reduzida ao longo do período de armazenamento. Entretanto, foi ressaltado pelos autores que o armazenamento das sementes em ambiente não controlado, embora tenha provocado redução de *F. verticillioides*, a presença dele poderia acelerar o processo de deterioração dessas sementes.

Tabela 8 Porcentagem média da incidência de *Fusarium verticillioides* em três cultivares de milho inoculadas com o isolado de *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Cultivar	Épocas	Potencial de Inóculo (horas)				
		0	24	48	72	96
BM 840 PRO	0	0 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	7	0 a	38 b	99 a	100 a	100 a
CV (%)	5,13					
BM 810	0	0 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	7	1 a	84 b	84 b	97 a	99 a
CV (%)	5,30					
BM 207	0	1 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	7	1 a	86 b	94 b	95 b	99 a
CV (%)	6,30					

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Na Figura 6 a, observa-se que a incidência do fungo *F. verticillioides* nas sementes de milho das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207, não armazenadas e inoculadas com o referido patógeno nos diferentes potenciais de inóculo (0, 24, 48, 72 e 96 horas) foi elevada, sendo crescente com aumento do tempo de exposição das sementes ao fungo. Para todas as cultivares, o modelo que se ajustou aos dados foi o de segundo grau, sendo alcançado maior nível de infecção (100%) em 65 horas de inoculação. Como o *F. verticillioides* também é um fungo de campo, as sementes já apresentavam certa porcentagem de infecção mesmo antes da inoculação. Como esse patógeno possui rápido crescimento e penetra facilmente nos tecidos das sementes, após os tempos de exposição das sementes das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 ao fungo, foram observados níveis de infecção de 92% das sementes.

Para as sementes das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207 que foram armazenadas por um período de 7 meses em ambiente não controlado, o efeito do potencial de inóculo em função da incidência do fungo *F. verticillioides* foi significativo (Figura 6 b). Para as cultivares BM 810 e BM 207, o maior nível de infecção das sementes (100%) foi alcançado em 72 e 68 horas, respectivamente. Já a cultivar BM 840 PRO, apresentou comportamento linear, com valor máximo de incidência (100%) em 96 horas de inoculação. Pela análise desses resultados fica evidente que o tempo de permanência das sementes ao fungo *F. verticillioides* variou de acordo com a cultivar estudada.

Em estudo conduzido por Ramos et al. (2014), foi verificado que o período de 16 horas de contato das sementes de milho com os fungos *F. verticillioides* e *F. graminearum* foi suficiente para que esses patógenos infecionassem as sementes. Segundo Galli et al. (2005), o contato das sementes de milho com *F. graminearum*, por 32 horas, foi suficiente para a obtenção de sementes infectadas. Caixeta (2012) concluiu que a técnica de restrição foi eficiente na infecção das sementes de milho pelo fungo *F. verticillioides* em 96 horas. Também de acordo com Caixeta (2012) a infecção das sementes de milho foi crescente e a qualidade fisiológica decrescente na faixa de 96 horas de inoculação com *F. verticillioides*.

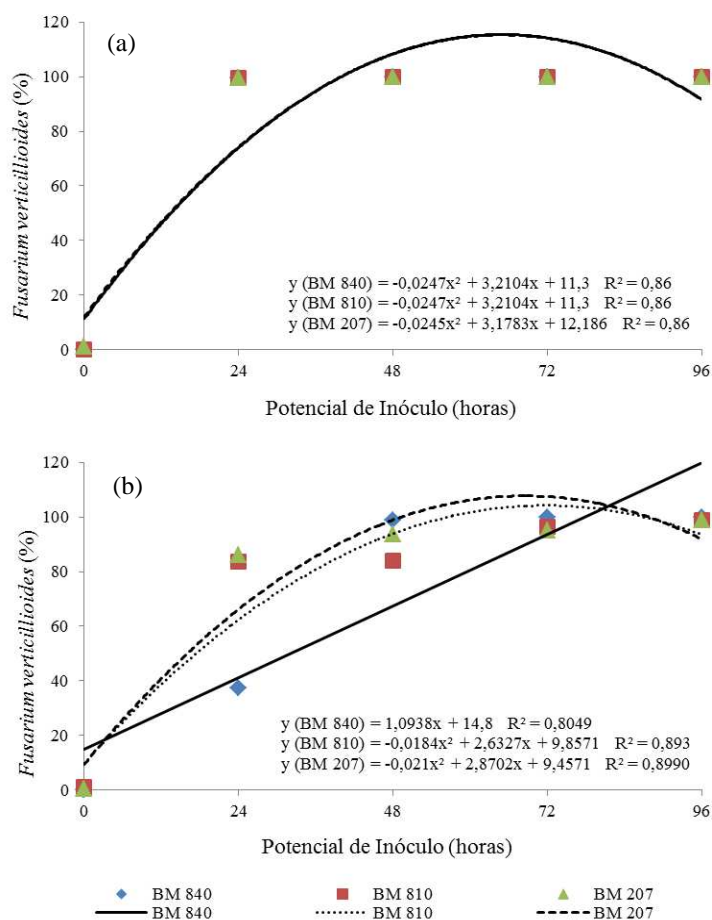


Figura 6 Porcentagem da incidência de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho das cultivares BM 840, BM 810 e BM 207 antes do armazenamento (a) e (b) após o armazenamento das sementes, avaliadas pelo teste de sanidade e submetidas a diferentes potenciais de inóculo de *F. verticillioides*

Outros Fungos

Na Tabela 9 pode-se observar os resultados da incidência de outros patógenos em sementes de milho das diferentes cultivares, em função do potencial de inóculo do fungo *F. verticillioides* nas sementes, nas duas épocas estudadas. Observou-se pelo teste de sanidade que *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. foram os fungos mais frequentes nas sementes nas diferentes épocas analisadas. Barrocas (2008), estudando os efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão, também observou o desenvolvimento de *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., e relacionou esse fato ao menor número de plântulas obtidas nos lotes estudados.

Em geral pode-se observar maior incidência de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. após o armazenamento dessas sementes, independente da cultivar. Observa-se também que para as cultivares BM 840 PRO e BM 207 maior incidência ocorreu no potencial de inóculo de 96 horas antes do armazenamento e após o armazenamento das sementes, respectivamente.

Para a cultivar BM 810, é verificada uma menor incidência do fungo *Rhizopus* sp. após o armazenamento das sementes, sendo observado somente 1% da incidência do fungo no potencial de 96 horas. Além disso, também pode ser observado que para as três cultivares estudadas não houve incidência de *Rhizopus* sp. no potencial de inóculo de 24 horas, independente de armazenadas ou não as sementes. Neste trabalho nos potenciais de 48, 72 e 96 horas foi possível observar maior desenvolvimento de outros fungos após o armazenamento. Esse fato é esperado, visto que as condições de umidade e temperatura durante o armazenamento são favoráveis ao desenvolvimento fúngico.

Tabela 9 Incidência de outros fungos (%) em sementes de três cultivares de milho inoculadas com o isolado *F. verticillioides* em diferentes potenciais de inóculo, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Cultivar	Épocas	Potencial de Inóculo (horas)				
		0	24	48	72	96
<i>Rhizopus</i> sp.						
BM 840 PRO	0	0	0	0	1	4
	7	0	0	3	2	0
BM 810	0	0	0	1	1	0
	7	0	0	0	0	1
BM 207	0	0	0	1	1	0
	7	0	0	0	1	2
<i>Aspergillus</i> sp.						
BM 840 PRO	0	0	0	0	1	4
	7	0	0	3	2	0
BM 810	0	0	0	1	1	0
	7	0	0	0	0	1
BM 207	0	0	0	1	1	0
	7	0	0	0	1	2
<i>Penicillium</i> sp.						
BM 840 PRO	0	0	0	0	1	4
	7	0	0	3	2	0
BM 810	0	0	0	1	1	0
	7	0	0	0	0	1
BM 207	0	0	0	1	1	0
	7	0	0	0	1	2

4.2 Análise Transcriptômica

Nas Figuras 7,8 e 9 a, b e c, encontram-se os zimogramas referentes à expressão dos genes *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética, Poliubiquitina e *Zea mays* proteína spatula, em sementes das três cultivares: BM 207, BM 810 e BM 840 PRO, sendo representadas como: sementes tratadas e não inoculadas

(0-207), (0-810) e (0-840); sementes inoculadas com *F. verticillioides* por 24 horas (24-207), (24-810) e (24-840); sementes inoculadas com *F. verticillioides* por 48 horas (48-207), (48-810) e (48-840); sementes inoculadas com *F. verticillioides* por 72 horas (72-207), (72-810) e (72-840); e sementes inoculadas com *F. verticillioides* por 96 horas (96-207), (96-810) e (96-840). Como testemunha foram utilizadas sementes tratadas e não armazenadas das três cultivares para cada gene estudado.

Os resultados da análise quantitativa da expressão do gene *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética, em sementes não armazenadas e armazenadas das cultivares BM 840 PRO, BM 810 e BM 207, estão representados na (Figura 7 a, b e c). Pode-se observar que de um modo geral, a expressão do gene é crescente com o armazenamento e com o aumento do potencial de inóculo do fungo *F. verticillioides* nas sementes, para as três cultivares estudadas.

Em relação às sementes da cultivar BM 207 tratadas e não armazenadas (0-207) pode-se observar que esse gene se expressou em todos os tratamentos, e que sua expressão é crescente à medida que se aumenta o potencial de inóculo (Figura 7 a). Após o armazenamento das sementes, foi observada maior expressão do gene no tratamento (96-207).

Para a cultivar BM 810 (Figura 7 b) observou-se crescente expressão do gene *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética nas sementes inoculadas, sendo direta a relação da expressão e os potenciais de inóculo, independente das sementes serem armazenadas ou não. Os maiores picos de expressão gênica do *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética foram encontrados após o armazenamento das sementes. A mesma tendência foi observada na cultivar BM 840 PRO (tratadas e não armazenadas). Pode-se observar que ao longo do período de infecção das sementes há um aumento na expressão desse gene, exceto para o tratamento (96-840) que reduz a expressão. Essa diminuição da

expressão pode estar relacionada com o processo de deterioração e morte das sementes pela alta incidência do fungo (Figura 7 c).

Esse resultado é muito promissor, pois o gene *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética se expressou em todos os tratamentos, o que pode tornar esse gene um importante marcador para a identificação de materiais infectados com o fungo *F. verticillioides*. O fato desse gene ter sido expresso nas sementes inoculadas de todas as cultivares, faz com que ele tenha um potencial ainda maior para ser um bom marcador da presença do fungo, pelo fato de permitir a identificação mais rápida do fungo e otimização do tempo.

Pelos resultados pode-se inferir que essa proteína pode desempenhar papel importante na resposta ao estresse causado pelo fungo. Portanto, mais estudos são necessários para descrever essa proteína e caracterizar sua função. Dentre os trabalhos envolvendo proteínas hipotéticas destacam-se aqueles relacionados à colonização de *Trichoderma harzianum* em sementes e raízes de tomate (MEHRABI-KOUSHKI; ROUHANI; MAHDIKHANI-MOGHADDAM, 2012), identificação de genes envolvidos no desenvolvimento de fibras de bambu (RAI et al., 2011), identificação de genes em sementes de pinhão-manso (NATARAJAN et al., 2010), genes expressos nas fases iniciais de desenvolvimento de sementes de *Brassica napus* (DONG et al., 2004), e a expressão diferencial de genes na formação de esclerócios de *Morchella conica* (CHEN et al., 2014).

Caixeta (2012) pesquisando a expressão diferencial de genes relacionados à infecção de patógenos em sementes de milho, concluiu que a expressão da proteína hipotética do milho foi elevada para todos os tratamentos em relação à testemunha. Hou et al. (2013) trabalhando com plantas de trigo, observaram através da análise de *qRT-PCR* que a expressão do gene TaSRHP proteína hipotética do trigo foi afetada pelo sal, seca, frio, e outros tipos de

estresses, indicando que esse gene pode aumentar a tolerância das plantas ao estresse abiótico.

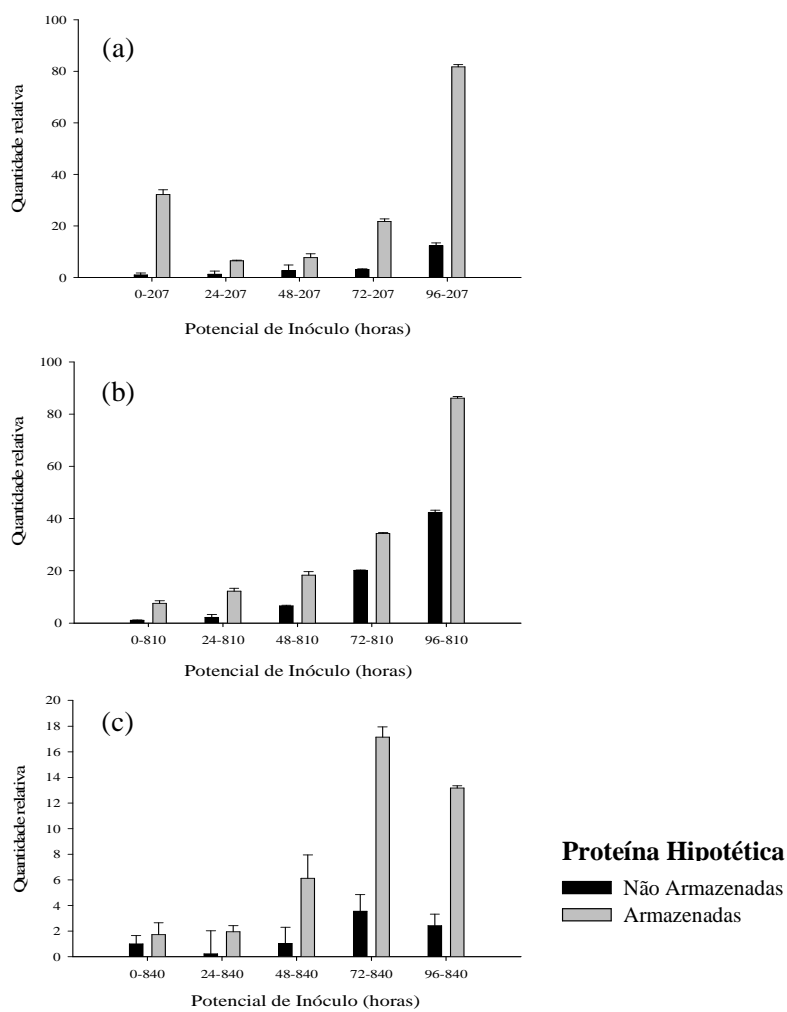


Figura 7 Perfil da expressão por qRT-PCR de Zea mays clone 276247 proteína hipotética, em sementes de milho das cultivares BM 207 (a), BM 810 (b) e BM 840 PRO (c), inoculadas com *F. verticillioides*, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

As expressões relativas do gene Poliubiquitina variaram entre as cultivares. Na cultivar BM 207 (Figura 8 a), maior índice de expressão foi observado na testemunha (sementes não inoculadas), e duas vezes maior nas sementes armazenadas em relação as não armazenadas. Já para as sementes que foram inoculadas com o fungo *F. verticillioides*, não foram observadas diferenças entre os tratamentos.

Para a cultivar BM 810 são observados maiores níveis de expressão da Poliubiquitina em sementes armazenadas e não inoculadas e inoculadas com o fungo por 24 horas em relação às sementes não armazenadas. Nos demais tratamentos observou-se alta expressão do gene, porém sem diferença entre eles (Figura 8 b). Nesse caso, o gene não pode ser considerado um bom marcador na identificação da presença do fungo *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. Provavelmente, esse gene se expressa devido ao estresse causado pelo armazenamento, não sendo possível relacionar sua expressão apenas pela presença do fungo.

Pelos resultados, pode-se observar expressão reduzida do gene Poliubiquitina para a cultivar BM 840 PRO, independente do tratamento (Figura 8 c). Esses resultados corroboram aos encontrados por Caixeta (2012) que estudando a expressão desse mesmo gene em sementes de milho concluiu que a sua expressão foi de 2 a 2,5 vezes maior para as sementes inoculadas com *Fusarium verticillioides*, indicando esse gene como um gene promissor para a identificação desse fungo.

De acordo com Liu et al. (1996), transcritos de poliubiquitina se acumulam nas células animais e vegetais após um choque de calor, sendo confirmado em pesquisa realizada com sementes de arroz (WANG; JIANG; OARD, 2000), e sementes de milho (CHRISTENSEN et al., 1992).

Além disso, os genes da poliubiquitina estão presentes em pouca quantidade na maioria das espécies, sendo que dentro de uma espécie, os genes

podem diferir quanto à sequência de nucleotídeos e/ou número de repetições de 228 nucleotídeos que codificam o monômero ubiquitina (LIU et al., 1996).

Segundo Christensen et al. (1992), sondas de oligonucleotídeos específicos confirmam que Ubi-1 e Ubi-2 são expressas a 25 °C, e são induzidas em temperaturas elevadas em plântulas de milho. Em pesquisa realizada por Takimoto et al. (1994) foi observado que a expressão do gene Ubi-1 em plantas transgênicas de arroz não é regulada sistematicamente, mais células individuais respondem de forma independente ao calor ou estresse físico. Além de mudar sua resposta ao estresse, a expressão de Ubi-1 é dependente do ciclo celular. A poliubiquitina é ativa nos tecidos que consistem de células que se dividem rapidamente no interior das sementes, e seus padrões de expressão têm sido raramente estudados em níveis teciduais e celulares em organismos transgênicos (TAKIMOTO et al., 1994).

Inglis et al. (2014), estudando a expressão de genes relacionados ao estresse de plântulas de *Astronium fraxinifolium* após a germinação em condições de microgravidade, através da hibridização subtrativa e análise de EST, observaram alguns genes diferencialmente expressos como proteínas de choque térmico, proteínas envolvidas no metabolismo da glutatona e a poliubiquitina. Aranda et al. (1996), ao examinarem a invasão do vírus *PSbMV* em embriões imaturos de ervilha, observaram maior expressão dos genes HSP70 e a poliubiquitina no momento em que houve início da replicação do vírus.

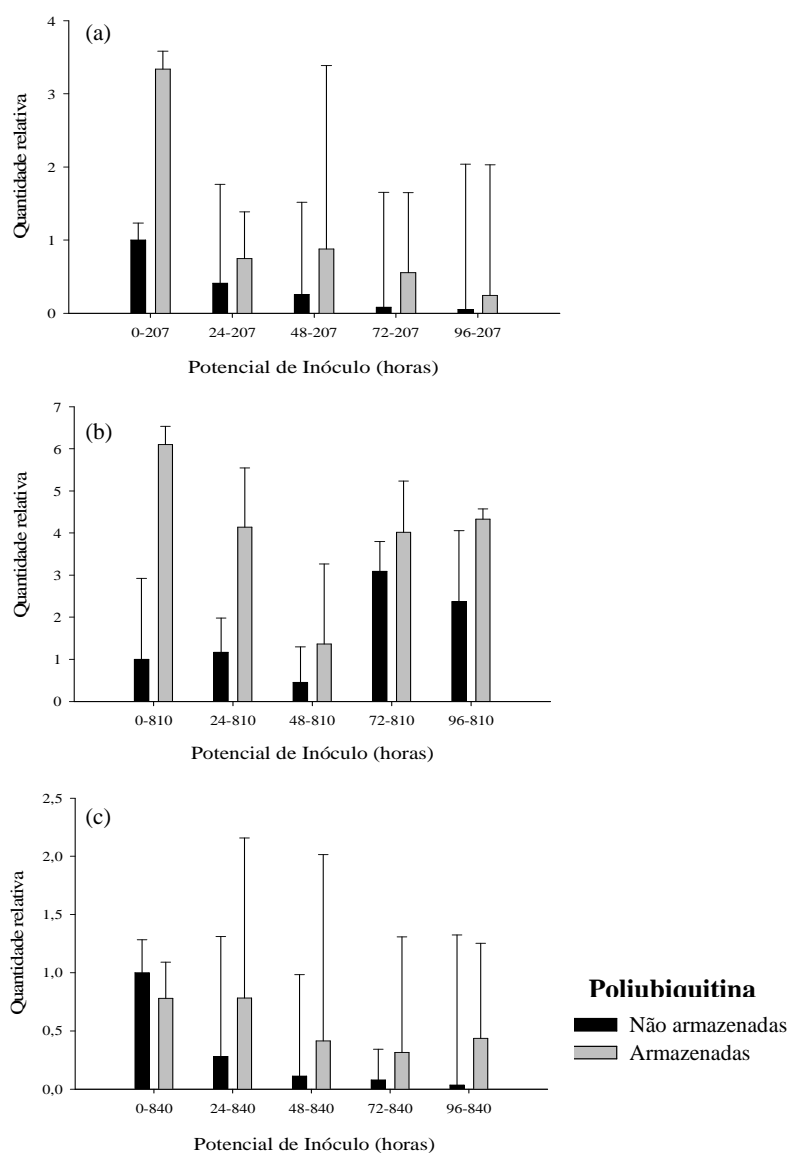


Figura 8 Perfil da expressão por qRT-PCR de Poliubiquitina, em sementes de milho das cultivares BM 207 (a), BM 810 (b) e BM 840 PRO (c), inoculadas com *F. verticillioides*, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

Os níveis de expressão da *Zea mays* proteína spatula foram analisados nas diferentes cultivares em cada potencial de inóculo (Figura 9 a, b e c). Em relação ao potencial de inóculo, na cultivar BM 207, a expressão gênica da *Zea mays* proteína spatula foi crescente nos três potenciais (48, 72 e 96 horas) em relação às sementes não inoculadas. No entanto, no potencial de 24, a expressão reduz (Figura 9 a). Essa diminuição da expressão pode estar relacionada a uma baixa infecção do patógeno, não sendo suficiente para aumentar a expressão desse gene nas sementes dessa cultivar.

Na cultivar BM 810, foi observada maior expressão das sementes inoculadas não armazenadas e armazenadas nos potenciais (24, 48, 72 e 96 horas) em relação as não inoculadas. Os maiores picos de expressão gênica da *Zea mays* proteína spatula foram encontrados nos tratamentos 24 horas não armazenadas e 72 horas armazenadas. No potencial de inoculação de 24 horas, a expressão do gene foi maior nas sementes não armazenadas, mas com o armazenamento dessas sementes, observa-se uma menor expressão (Figura 9 b). Essa redução da expressão pode estar relacionada à diminuição da incidência do fungo após o armazenamento, o qual foi confirmado no teste de sanidade.

Para a cultivar BM 840 PRO, os resultados da análise quantitativa da expressão do gene *Zea mays* proteína spatula estão representados na (Figura 9 c). Observa-se um aumento na expressão das sementes não armazenadas e inoculadas até 72 horas, diminuindo após esse período. Com relação ao armazenamento pode-se observar que a expressão foi maior nas sementes não armazenadas no potencial de 48 e 72 horas. Nesses tratamentos também foi observada redução da germinação após sete meses de armazenamento, o que pode ter contribuído para a diminuição da expressão. Nos demais tratamentos não foram observadas grandes diferenças.

De acordo com Groszmann et al. (2010), o gene *Spatula* (STP) codifica um fator de transição bHLH presente em fungos, plantas e animais, o qual promove o crescimento e desenvolvimento de tecidos resultantes das margens do carpelo, incluindo o septo e o canal de transmissão. Além disso, esse gene também está ligado à repressão da germinação de sementes, sendo um regulador potente da expansão dos cotilédones, inibindo folhas e pétalas. Isso explica as variações na expressão dos cotilédones do gene *Zea mays* proteína *spatula* nos tratamentos inoculados com o fungo, pois esses tiveram a germinação inibida pela presença de um restritor hídrico (manitol) durante os períodos de inoculação de *F. verticillioides* nas sementes.

A SPT tem sido bastante estudada durante o desenvolvimento floral, na germinação e no desenvolvimento de cotilédones e folhas (JOSSE et al., 2011), durante o crescimento de raízes (MAKKENA; LAMB, 2013), e durante o crescimento vegetativo em resposta à temperatura (SIDAWAY-LEE et al., 2010). Tisza et al. (2010) trabalhando com genes envolvidos no desenvolvimento de frutos não climatéricos identificaram vários transcritos diferencialmente expressos em quatro estágios de maturação de morango, sendo que um deles, o FaSPT, apresentou elevada homologia com o gene SPT de *Arabidopsis thaliana*. Nessa mesma pesquisa, pode-se concluir que o gene FaSPT é reprimido pela auxina em frutos verdes, além disso, apresenta diferentes padrões de expressão em vários estágios de maturação dos frutos quando tratados com etileno.

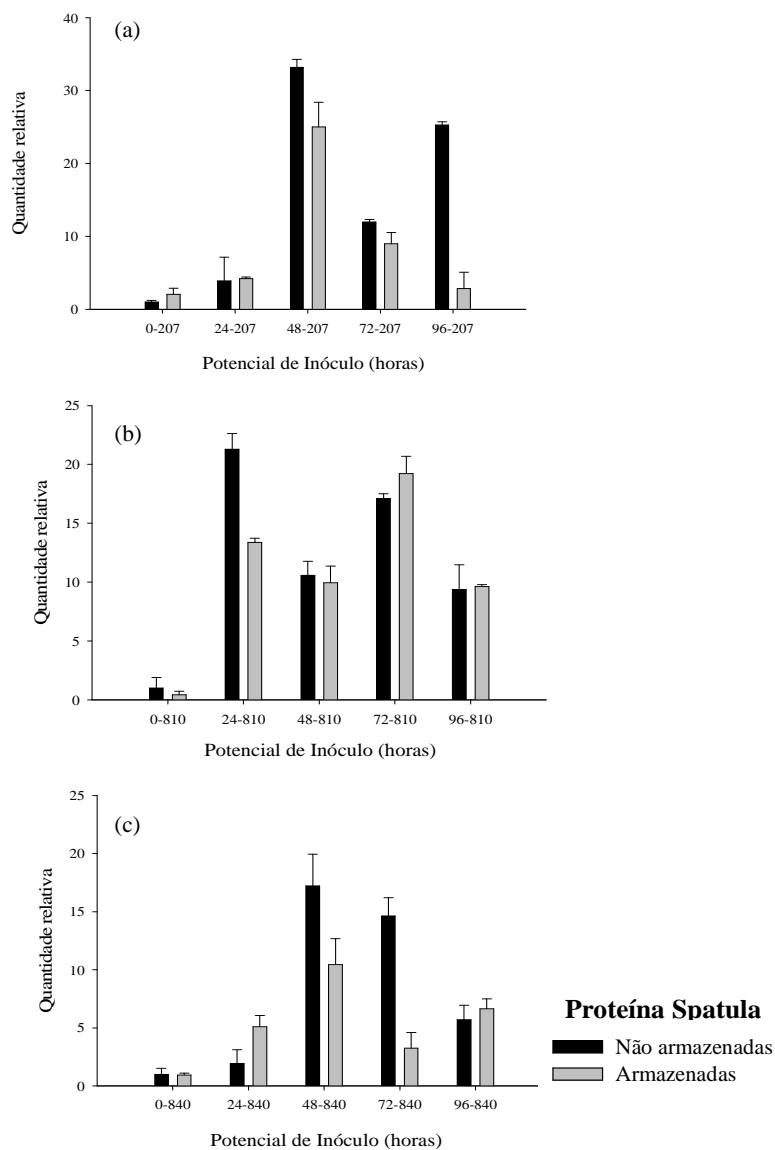


Figura 9 Perfil da expressão por qRT-PCR de *Zea mays* proteína spatula, em sementes de milho das cultivares BM 207 (a), BM 810 (b) e BM 840 PRO (c), inoculadas com *F. verticillioides*, antes e após o armazenamento (0 e 7 meses) das sementes

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa foi possível estudar alguns genes que se expressam em sementes de milho infectadas pelo fungo *F. verticillioides*. Esses genes foram selecionados a partir de um estudo feito por Caixeta (2012) através da metodologia de biblioteca subtrativa.

Durante os períodos de infecção do patógeno nas sementes observou-se alterações nas expressões dos genes estudados, provavelmente devido a diferentes níveis de infecção alcançados.

O gene *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética, cuja função é desconhecida, teve maiores expressões após o armazenamento e também nos últimos períodos de inoculação do fungo nas sementes, podendo estar ligado ao estresse provocado tanto pelo armazenamento quanto pela presença do fungo. Já o gene Poliubiquitina que se acumula nas células vegetais e animais após um choque de calor, não apresentou variação entre os tratamentos inoculados com o *F. verticillioides*, portanto não é um marcador eficiente na detecção do patógeno nas sementes de milho. Na análise da expressão do gene *Zea mays* proteína spatula, pode-se observar expressão desse gene em todas as cultivares estudadas.

A partir dos resultados deste trabalho infere-se que as condições de infecção nas quais as sementes são expostas podem induzir a expressão de alguns genes que não são expressos em condições favoráveis, o que torna possível a separação de sementes infectadas e não infectadas.

Diante disso, existe a necessidade de prosseguir com os estudos, no sentido de elucidar mecanismos que auxiliem na construção de kits de detecção rápida desse fungo em sementes de milho.

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a inoculação das sementes de milho por meio da técnica de restrição hídrica utilizando manitol como restritor é altamente eficaz na obtenção de sementes infectadas.

A presença do fungo *Fusarium verticillioides* e do restritor hídrico manitol a -2,0 MPa provocam efeitos negativos na qualidade das sementes armazenadas.

Houve uma redução da qualidade fisiológica das sementes inoculadas com *Fusarium verticillioides* na faixa de 72 a 96 horas, tanto antes quanto após o armazenamento.

Para a qualidade sanitária, maior incidência de *Fusarium verticillioides* foi observada nas sementes não armazenadas. Após o armazenamento, a incidência diminuiu de acordo com o período de exposição das sementes ao patógeno.

Os genes *Zea mays* clone 276247 proteína hipotética e *Zea mays* proteína spatula são potenciais marcadores moleculares na identificação de sementes de milho infectadas por *Fusarium verticillioides*.

O gene Poliubiquitina não apresentou diferença na expressão entre as sementes de milho armazenadas e não armazenadas e infectadas com o fungo *F. verticillioides*, sendo esse não promissor na identificação desse patógeno em sementes de milho.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. C. F.; CARVALHO, N. M. Effect of the type of environmental stress on the emergence of sunflower (*Helianthus annuus* L.), soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and maize (*Zea mays* L.) seeds with different levels of vigor. **Seed Science & Technology**, Zürich, v. 31, n. 2, p. 465-479, 2003.
- ALI, A.; SOUZA MACHADO, V.; HAMILL, A. S. Osmoconditioning of tomato and onion seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 43, n. 3/4, p. 213-224, July 1990.
- ARANDA, M. A. et al. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression. Associated with plant virus replication, **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 26, p. 15289-15293, 1996.
- BARBOSA, R. M. et al. Chemical control of pathogens and the physiological performance of peanut seeds. **International Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 11, n. 2, p. 322-326, 2013.
- BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas.** 2008. 110 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- BARROCAS, E. N. et al. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 218-224, 2012.
- BARROS, A. S. R. et al. Teste de frio. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Londrina: ABRATES, 1999. Cap. 5, 1999.
- BECKERT, O. P. et al. Emergência de sementes de milho em condições desolo úmido e frio e de solo seco. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 27, n. 1, p. 77-80, 2001.

BOTELHO, L. S. **Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 156 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BRADFORD, K. J.; STEINER, J. J.; TRAWATHA, S. E. Seed priming influence on germination and emergence of pepper seed lots. **Crop Science**, Madison, v. 30, n. 3, p. 718-721, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 16 maio 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399 p.

BROCKLEHURST, P. A.; DEARMAN, J. Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. II : seedling emergence and plant growth. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 102, n. 3, p. 585-593, 1983.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of m RNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 25, n. 2, p. 169-193, Oct. 2000.

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

CANTLIFFE, D. J.; ELBALLA, M. Improved germination of carrot at stressful high temperature by seed priming. **Proceedings of the Florida State Horticulture Society**, Lake Alfred, v. 107, p.121-128, 1994.

CAPPELINI, L. T. D. et al. Effect of *Fusarium moniliforme* on the quality of maize seeds. **Científica**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 185-191, 2005.

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

CARVALHO, M. A. C. et al. Variações na metodologia do teste de frio para avaliação do vigor em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 74-80, 2000.

CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças na cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Ed.). **Milho: estratégias de manejo e alta produtividade**. Piracicaba: Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento da Produção Vegetal, 2003. p. 1-18.

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

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Detection of *Magnaporthe grisea* in infested rice seeds using polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 3, p. 1147-1153, Apr. 2006.

CHEN, L. J. et al. Gene expressing difference in sclerotial formation of *Morchella conica*. **Indian Journal of Microbiology**, Mumbai, v. 54, n. 3, p. 274-283, 2014.

CHILVERS, M. I. et al. A real-time quantitative PCR assay for *Botrytis* spp. That cause neck rot onion. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 5, p. 599-608, May 2007.

CHRISTENSEN, A. H. et al. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplast by electroporation, **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, p. 675-689, 1992.

CÍCERO, S. M.; VIEIRA, R. D. Teste de frio. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, 1994. p. 151-164.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1995. p. 223-275.

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

DAN, L.G.M. et al. Qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com inseticidas sob efeito do armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 131-139, 2010.

DELOUCHE, J. C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Revista Seed News**, Pelotas, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2002.

DING, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 52, p. 3371-3377, 2004.

DOMBROWSKI, J. E. et al. A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. **Crop Science**, Madison, v. 46, n. 11, p. 1064-1070, 2006.

DONG, J. et al. Gene expression at early stages of Brassica napus seed development as revealed by transcript profiling of seed-abundant cDNAs. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 3, p. 483-491, 2004.

EIRA, M. T. S.; MARCOS FILHO, J. Condicionamento fisiológico de sementes de alface : II desempenho sob estresse hídrico salino e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 12, n. 1, p. 28-45, 1990.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FU, J. et al. Isolation and characterization of maize PMP3 genes involved in salt stress tolerance. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, Feb. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031101>>. Acesso em: 15 out. 2013.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicola* and *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 5, p. 367-371, May 2004.

GALLI, J. A. et al. Effect of *Fusarium graminearum* and infection index on germination and vigor of maize seeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 470-474, 2005.

GOMES, M. S. et al. Efeito da heterose na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 7-17, 2000.

GOULART, A. C. P.; FIALHO, W. F. B. Ocorrência de fungos em Sementes de milho “BR 201” produzidas na região de Dourados, MS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 79, 1998.

GROSZMANN, M. et al. Regulation of tissue-specific expression of SPATULA, a bHLH gene involved in carpel development, seedling germination, and lateral organ growth in *Arabidopsis*. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 61, p. 1495-1508, Feb. 2010.

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

HERNANDEZ, M. et al. A rapessed-specific gene, Acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 3622-3627, 2001.

HOU, X. et al. A novel ABA-Responsive TaSRHP gene from wheat contributes to enhanced resistance to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 31, p. 791-801, Aug. 2013.

INGHAM, D. J. et al. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. **Biotech**, Rockville, v. 31, p. 132-141, 2001.

INGLIS, P. W. et al. Expression of stress-related genes in zebrawood (*Astronium fraxinifolium*, Anacardiaceae) seedlings following germination in microgravity. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 1, p. 81-92, 2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances**: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, 1993. v. 56, p. 445-446.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook on seed health testing**. Zurich, 1981. (Working sheets, section 2).

IOOS, R. et al. Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara hastedii* in sunflower seeds. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, n. 9, p. 209-218, Apr. 2007.

JOSSE, E. M. et al. A della in disguise: spatula restrains the growth of the developing *Arabidopsis* seedling, **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 4, p. 1337-1351, 2011.

KHAN, A. A.; ABAWI, G. S.; MAGUIRRE, J. D. Integrating matricconditioning and fungicidal of table beet seed to improve stand establishment and yield. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 1, p. 231-237, 1992.

KONG, L.; ANDERSON, J. M. A.; OHM, H. W. Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. **Genome**, Ottawa, v. 48, n. 1, p. 29-40, 2005.

KUHNEM JÚNIOR, P. R. et al. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013.

KUHN, H. et al. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 27, n. 6, p. 503-528, 2001.

LIU, L. et al. Characterization chromosomal mapping and expression of different ubiquitin fusion protein genes in tissues from control and heat-shocked maize seedlings. **Biochemistry and Cell Biology**, Dallas, v. 4, n. 1, p. 9-19, 1996.

LOVATO, A.; NOLI, E.; LOVATO, A. F. S. The relationship between three cold test temperatures, accelerated ageing test and field emergence of maize seed. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 33, n. 1, p. 249-253, 2005.

LUCCA FILHO, O. A. Diagnóstico da patologia de sementes de milho no Estado do Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 1., 1984, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CENA/USP/CNEN; Brasília: ABRATES, 1984. p. 102-104.

LUO, M. et al. Characterization of gene expression. Profiles in developing kernels of maize (*Zea mays*) inbred. **Plant Breeding**, Westport, v. 127, p. 569-578, 2008.

MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001b.

MACHADO, J. C. et al. Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 3, 213-217, 2013.

MACHADO, J. C. et al. Use of water Restriction technique in seed pathology. In: SEED PAROLOGY SYMPOSIUM ON SEED PATHOLOGY, 4., 2002, Zurich. **Proceedings...** Zurich: ISTA, 2002. p.15.

MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, p. 62-67, 2004.

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

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J. General incubation methods for routine seed health analysis. In: MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. (Ed.). **Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis**. Bassersdorf: ISTA, 2002. p. 48-80.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1998. 107 p.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MAKKENA, S.; LAMB, R. S. The bHLH transcription factor SPATULA regulates root growth by controlling the size of the root meristem. **BMC Plant Biology**, London, v. 13, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/1>>. Acesso em: 23 jun. 2014.

MARASAS, W. F. O. Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. In: JACSON, L. S.; DE VRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B (Ed.). **Fumonisin in food**. New York: Plenum, 1996. p. 1-17.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MATOS, C. S. M. et al. Health and physiological quality of corn seeds treated with fungicides and assessed during storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 10-16, 2013.

MCNEIL, M. et al. Real-time PCR assay for quantification of *Tilletia caries* contamination of UK wheat seed. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 53, n. 6, p. 741-750, Dec. 2004.

MEDINA, P. F.; TANAKA, M. A. S.; PARISI, J. J. D. Sobrevivência de fungos associados ao potencial fisiológico de sementes de triticale (*X. triticosecale* Wittmack) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 17-26, 2009.

MEHRABI-KOUSHKI, M.; ROUHANI, H.; MAHDIKHANI-MOGHADDAM, E. Differential display of abundantly expressed genes of *Trichoderma harzianum* during colonization of tomato-germinating seeds and roots. **Current Microbiology**, New York, v. 65, n. 5, p. 524-533, 2012.

MENEZES, V. O. et al. Detecção e influência de *Fusarium* spp. na qualidade fisiológica de sementes de pepino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 193-199, 2011.

MIGUEL, M. H. et al. Teste de frio para avaliação do potencial fisiológico de sementes de algodão. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 741-746, 2001.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal Stored Products Research**, Missouri, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MUNIZ, M. F. B. et al. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de melão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 144-149, 2004.

NASCIMENTO, V. E. **Fluxo gênico e métodos de detecção e quantificação de milho geneticamente modificado**. 2010. 117 p. Teste (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

NATARAJAN, P. et al. Gene Discovery from *Jatropha curcas* by sequencing of ESTs from normalized and full-length enriched cDNA library from developing seeds. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 606, 2010.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Macmillan, 1979. v. 2.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Qualidade do tratamento comercial de sementes de milho com fungicidas na safra de 2006/07. **Revista de Ciência Agroveterinárias**. Lages, v. 7, n. 1, p. 30-36, 2008.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p. 10-13, jul./dez. 2004.

PÁDUA, G. P.; VIEIRA, R. D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 255-262, 2001.

PEDROSA, J. P.; CIRNE, L. E. M. R.; MAGALHÃES NETO, J. M. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 1, p. 121-123, 1999.

RAI, V. et al. Identification of genes involved in bamboo fiber development, **Gene**, Amsterdam, v. 478, n. 1/2, p. 19-27, June 2011.

RAMOS, D. P. et al. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 1, p. 24-31, jan./mar. 2014.

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

RHEEDER, J. P. et al. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 353-357, 1992.

RIBEIRO, U. P. et al. Determinação do potencial osmótico e do período de embebição utilizados no condicionamento fisiológico de sementes de algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 911-917, set./out. 2002.

ROVIERI, J. S. C. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas de sementes de pimentão submetidas ao condicionamento osmótico, utilizando diferentes agentes osmóticos e meios de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 217-223, 1999.

SCHOLDBERG, T. A. et al. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 2903-2911, 2009.

SIDAWAY-LEE, K. et al. Spatula links daytime temperature and plant growth rate. **Current Biology**, London, v. 20, n. 16, p. 1493-1497, 2010

SINHA, K. K.; SINHA, A. K. Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *A. flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal Stored Products Research**, Missouri, v. 27, n. 1, p. 65-68, 1991.

SOUSA, M. V. et al. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 41-48, jan./fev. 2008.

TAKIMOTO, I. et al. Non-systemic expression. Of a stress-responsive maize Polyubiquitin gene (Ubi-1) in transgenic rice plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 1007-1012, Nov. 1994.

TANAKA, M. A. S.; MAEDA, J. A.; ALMEIDA, I. H. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 501-508, 2001.

TEIXEIRA, H. et al. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infestadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p.109-114, 2005.

TISZA, V. et al. Characterization of FaSPT, a SPATULA gene encoding a bHLH transcriptional factor from the non-climacteric strawberry fruit. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 10-11, p. 822-826, 2010.

TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature and Biotechnology**, New York, v. 16, n. 1, p. 49-53, Jan. 1998.

UZAROWSKA, A. et al. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. **BMC Plant Biology**, California, v. 15, n. 9, Feb. 2009.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, Natick, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

VIEIRA, A. H. et al. **Técnicas de produção de sementes florestais**. Porto Velho: Embrapa, 2002.

VIEIRA, B. G. T. L. et al. Alternative procedure for the cold test for soybean seeds. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 5, p. 540-545, 2010.

VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.164 p.

VILELA, M. et al. Qualidade de sementes de feijoeiro infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e viabilidade do fungo durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 54-59, 2010.

WANG, J. et al. Analysis of differential transcriptional profiling in wheat infected by *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* using Gene Chip. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, p. 381-387, 2012.

WANG, J.; JIANG, J.; OARD, J. H. Structure, expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, Limerick, v. 156, p. 201-211, 2000.

WOLTZ, J. M. et al. Corn cold test germination as influenced by soil moisture, temperature and pathogens. **Seed Technology**, Ithaca, v. 20, n. 1, p. 56-70, 1998.

YANG, F.; SVENSSON, B.; FINNIE, C. Response of germinating barley seeds to *Fusarium graminearum*: the first molecular insight into *Fusarium* seedling blight. **Plant Physiology and Biochemistry**, Versailles, v. 49, n. 2, p. 1362-1368, 2011.

YANG, G. et al. Identification and characterisation of candidate genes involved in chilling responses in maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 127-141, July 2011.

YANG, L. T. et al. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, p. 759-763, 2005.

ZHAO, T. et al. Expression of the maize Galactinol Synthase gene family: (I) expression of two different genes during seed development and germination. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, p. 634–646, 2004.