



JOANA SOUZA FERNANDES

**DESEMPENHO DE SEMENTES DE GENÓTIPOS
DE MILHO INFECTADAS PELO COMPLEXO
Stenocarpella E POTENCIAL DE DETECÇÃO
DOS PATÓGENOS POR MEIO
DE ESPECTROSCOPIA NO
INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

**LAVRAS - MG
2015**

JOANA SOUZA FERNANDES

**DESEMPENHO DE SEMENTES DE GENÓTIPOS DE MILHO
INFECTADAS PELO COMPLEXO *Stenocarpella* E POTENCIAL DE
DETECÇÃO DOS PATÓGENOS POR MEIO DE ESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

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

Orientador

Dr. Renato Mendes Guimarães

Coorientadores

Dr. Cleiton Antônio Nunes
Dra. Heloísa Oliveira dos Santos

**LAVRAS - MG
2015**

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

Fernandes, Joana Souza.

Desempenho de sementes de genótipos de milho infectadas pelo complexo *Stenocarpella* e potencial de detecção dos patógenos por meio de espectroscopia no infravermelho próximo / Joana Souza Fernandes. – Lavras : UFLA, 2015.

84 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Renato Mendes Guimarães.

Bibliografia.

1. *Zea mays* L. 2. Diplodia. 3. NIR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

JOANA SOUZA FERNANDES

**DESEMPENHO DE SEMENTES DE GENÓTIPOS DE MILHO
INFECTADAS PELO COMPLEXO *Stenocarpella* E POTENCIAL DE
DETECÇÃO DOS PATÓGENOS POR MEIO DE
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO**

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

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015.

Dr. Antônio Rodrigues Vieira	EPAMIG
Dr. José da Cruz Machado	UFLA
Dr. Cleiton Antônio Nunes	UFLA

Dr. Renato Mendes Guimarães
Orientador

**LAVRAS - MG
2015**

*Aos meus pais João e Eni, pelo carinho e apoio.
A minha irmã Jovana, pela força e incentivo.
Ao Evaldo, pelo apoio, carinho e companheirismo
incondicionais.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas bênçãos em minha vida, e sempre presente mesmo nos momentos mais difíceis, me dando força para continuar.

Aos meus pais, João e Eni; e minha irmã, Jovana, pelo apoio e carinho.

Ao meu namorado Evaldo pelo exemplo, amor e incentivo incondicionais.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães, pela paciência, dedicação, ensinamentos, confiança e carinho em todos os momentos.

Aos meus coorientadores Cleiton Antônio Nunes e Heloísa Oliveira dos Santos, pelo auxílio nos momentos de dúvidas e ensinamentos compartilhados.

Aos professores do Setor de Sementes, João Almir Oliveira, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Maria Laene Moreira de Carvalho, e aos pesquisadores Sttela Dellysete Franco da Rosa e Antônio Rodrigues Vieira, pelos esclarecimentos e conhecimentos transmitidos durante todo meu período de formação acadêmica.

Aos pós-doutorandos, Adriano Alves e Everson Carvalho, e demais pós-graduandos do Setor de Sementes, em especial, ao Gabriel, Vivi, Tati, Stefânia, e Gabi pelo companheirismo e auxílio nos momentos de dúvidas; e aos alunos de iniciação científica, Gabriel Teixeira, Anna Laura e Rucyan pelo auxílio na execução dos trabalhos.

Aos queridos amigos do laboratório, e do NESem, que foram essenciais durante o curso e me proporcionaram momentos de muita alegria e que estarão sempre no meu coração.

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

Ao professor José da Cruz Machado e aos funcionários do Laboratório de Patologia de Sementes, em especial à Ângela e à Mirian, e a Pós-Doutoranda Carolina, pelo auxílio e paciência.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de bolsa de estudos.

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

À empresa DOW AgroSciences pelo fornecimento das sementes para a realização da pesquisa.

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

RESUMO

Com o uso da técnica de plantio direto, os campos de produção de sementes estão sujeitos a ataques de fungos com maior facilidade. O gênero *Stenocarpella* sp., composto por duas espécies, *S. maydis* e *S. macrospora*, causador da podridão branca da espiga, podridão do colmo, e de manchas foliares pode sobreviver em restos culturais, causando perdas significativas na cultura do milho. O método usado para verificar a presença desse fungo em sementes é lento, trabalhos, cabendo ao setor de controle de qualidade oferece segurança na comercialização de sementes. Objetivou-se nesta pesquisa verificar o desempenho de sementes de genótipos de milho infectadas pelo complexo *Stenocarpella* e potencial de detecção dos patógenos por meio de espectroscopia no infravermelho próximo. O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes de milho de um genótipo suscetível, e outro tolerante ao fungo estudado, da safra 2013/2014, cedidas pela empresa Dow Agrosciences. A colônia fúngica foi desenvolvida em meio BDA+ manitol. Após o crescimento das colônias, as sementes foram distribuídas sob o meio por diferentes potenciais de inóculo, (0, 24, 48, e 72 horas). A determinação da qualidade fisiológica das sementes foi realizada pelos testes de germinação, primeira contagem de germinação, emergência, índice de velocidade de emergência e teste de frio. A qualidade sanitária foi determinada pelo “*Blotter test*” com congelamento. A presença de *Stenocarpella* sp. foi verificada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, análise da isoenzima esterase (EST), e pelo teste de sanidade, os resultados foram usados como referência para a análise de sementes por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR). Para estabelecimento do modelo de calibração foi utilizado o método de regressão por mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS - DA). Pode-se concluir que com o aumento do tempo de exposição das sementes ao inóculo houve uma ligeira redução da qualidade fisiológica. A PCR é um método eficiente na detecção do fungo a nível de gênero. A análise isoenzimática de esterase pode auxiliar na diferenciação de isolados de *S. maydis* e *S. macrospora*, e a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) junto ao método PLS-DA, mostra-se promissora na detecção e diferenciação do fungo estudado.

Palavras-chave: Podridão por Diplodia. *Zea mays* L.. NIR.

ABSTRACT

The tillage technique use, the seed production fields are inclined to fungal attacks more easily. The gender *Stenocarpella* sp., is composed for two species *S. maydis* and *S. macrospora*, causer of white ear rot, stalk rot and leaf spot, they can survive in crop debris causing significant losses in corn. The method used to verify the presence of this fungus in seeds is slow and laborious, so the quality control industry is responsible to provide security in the market of maize seeds. The objective of this research was to verify the performance of maize genotypes seeds infected by the *Stenocarpella* complex and the potential detection of the pathogens by spectroscopy in the near infrared. The research was carried out at the Seed Analysis Laboratory of the Agriculture Department and at the Seed Pathology Laboratory of the Plant Pathology Department, at the Federal University of Lavras (UFLA). Corn seeds were used of a susceptible genotype, and other tolerant to the studied fungus from the harvest 2013/2014, provided by Dow Agrosiences company. The fungal colony was developed on BDA + manitol media. After growth of the colonies, the seeds were distributed in the medium by different inoculum potential (0, 24, 48, and 72 hours). The determination of physiological quality of seeds was performed by germination test, first germination count, emergency, emergency speed index and cold test. The sanitary quality was determined by "Blotter test" with freezing. The *Stenocarpella* sp. presence detected by the Polymerase Chain Reaction (PCR), analysis of the isoenzyme esterase (EST), and the sanity test, the results were used as reference for the seed analysis by spectroscopy in the near infrared (NIR). To establish the calibration model was used the regression method by partial least squares with discriminant analysis (PLS - DA). It can be concluded that with increasing time of the seed exposure to the inoculum there was a slight reduction in the physiological quality. The PCR is an efficient method for fungus detection to the gender level. The isoenzyme esterase analysis can help in the isolates differentiation of *S. maydis* and *S. macrospora*, and the spectroscopy technique in the near infrared (NIR) with the PLS-DA method is promising for the detection and differentiation of the studied fungus.

Keywords: Rot by Diplodia. Zea mays L.. NIR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação dos isolados fornecidos pelo Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA. Lavras - MG, 2014.....	29
Tabela 2	Escala de notas atribuídas a intensidade de <i>Stenocarpella sp</i> em sementes de milho. UFLA - MG, 2014.....	32
Tabela 3	Primer utilizado no sistema PCR. UFLA, Lavras - MG, 2014.	34
Tabela 4	Resumo do quadro de análise de variância dos testes fisiológicos de primeira contagem de germinação PC(%), germinação G(%), teste de frio sem solo F(%), emergência de plântulas E(%), e índice de velocidade de emergência (IVE), em sementes suscetíveis inoculadas com <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>S. macrospora</i> em diferentes potenciais de inóculo.....	38
Tabela 5	Resumo do quadro de análise de variância do teste de sanidade S(%), em sementes de milho suscetíveis inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i> submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	39
Tabela 6	Resumo do quadro de análise de variância para incidência e intensidade da doença, em sementes de milho suscetíveis ao fungo <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>S. macrospora</i> submetidas a diferentes potenciais de inóculo.....	39
Tabela 7	Resumo do quadro de análise de variância dos testes fisiológicos de germinação G(%), primeira contagem de germinação PC(%), teste de frio F(%), emergência de plântulas E(%), e índice de velocidade de emergência (IVE), em sementes tolerantes inoculadas com <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>S. macrospora</i> submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	40
Tabela 8	Resumo do quadro de análise de variância para incidência e intensidade da doença, em sementes de milho tolerantes ao fungo <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>S. macrospora</i> submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	40
Tabela 9	Valores médios de primeira contagem de germinação (PC%), e germinação (G%), de sementes de milho suscetíveis e inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i> . Lavras, MG, 2014.	42
Tabela 10	Valores médios de primeira contagem de germinação (PC%), e germinação (G%), de sementes de milho tolerantes e inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i>	43

Tabela 11	Valores médios de germinação no teste de frio (F%), de sementes de milho tolerantes inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i> , submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	46
Tabela 12	Valores médios de emergência de plântulas de sementes de milho tolerantes e inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i> , submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	48
Tabela 13	Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes suscetíveis e inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i> , submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	50
Tabela 14	Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, suscetíveis, inoculadas com o fungo <i>S. macrospora</i> , submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	53
Tabela 15	Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, suscetíveis e inoculadas com o fungo <i>S. maydis</i> , submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	53
Tabela 16	Incidência de <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>S. macrospora</i> em sementes tolerantes de milho no Blotter test na leitura aos quatorze dias, (dados sem transformação).	57
Tabela 17	Intensidade da doença em sementes de milho suscetíveis, inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i> submetidas a diferentes potenciais de inóculo, (dados sem transformação).	58
Tabela 18	Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, tolerantes e inoculadas com o fungo <i>S. macrospora</i> , submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	59
Tabela 19	Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, tolerantes e inoculadas com o fungo <i>S. maydis</i> , submetidas a diferentes potenciais de inóculo.	59
Tabela 20	Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com <i>S. maydis</i> com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração.	68
Tabela 21	Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com <i>S. macrospora</i> com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração.	69
Tabela 22	Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis não inoculadas e inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S.</i>	

	<i>macrospora</i> com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração.....	70
Tabela 23	Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com <i>S. maydis</i> com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração.	71
Tabela 24	Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com <i>S. macrospora</i> com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração.	72
Tabela 25	Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho tolerantes não inoculadas e inoculadas com <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i> com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração.....	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Porcentagem de plântulas normais de sementes de milho suscetíveis ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas à diferentes potenciais de inóculo, obtidas no teste de Germinação (G%), e primeira contagem de germinação (PC%). Lavras, MG, 2014.41
- Figura 2 Porcentagem de plântulas normais de sementes de milho suscetíveis ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas a diferentes potenciais de inóculo, obtidas no teste de frio. Lavras, MG, 2014...44
- Figura 3 Porcentagem de emergência de plântulas de sementes de milho suscetíveis ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas a diferentes potenciais de inóculo. Lavras, MG, 2014.47
- Figura 4 Índice de velocidade de emergência de plântulas de sementes de milho tolerantes ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas a diferentes potenciais de inóculo. Lavras, MG, 2014.51
- Figura 5 Ocorrência de *Stenocarpella* sp. na primeira leitura do Blotter test, em sementes suscetíveis ao fungo, submetidas a diferentes potenciais de inóculo. Lavras, MG, 2014.52
- Figura 6 Incidência de *Stenocarpella* sp. na leitura de quatorze dias do “Blotter test” de sementes suscetíveis, submetidas a diferentes potenciais de inóculo.55
- Figura 7 Porcentagem de intensidade da doença em sementes de milho suscetíveis submetidas a diferentes potenciais de inóculo com o fungo *Stenocarpella* sp.56
- Figura 8 Porcentagem de incidência de *Stenocarpella* sp. em sementes tolerantes de milho, submetidas a diferentes potenciais de inóculo.57
- Figura 9 Intensidade da doença em sementes tolerantes de milho submetidas a diferentes potenciais de inóculo, inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*.58
- Figura 10 Atividade da enzima esterase (EST) em sementes de milho suscetíveis e tolerantes inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* e submetidas a diferentes potenciais de inóculo.61
- Figura 11 Amplificação do DNA genômico de sementes de milho inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* submetidas à diferentes potenciais de inóculo. Linhas 1, 2, 3, e 4 representam a amplificação do DNA de sementes suscetíveis ao fungo,

inoculadas com *S. maydis*, em quatro potenciais de inoculo (0, 24, 48, e 72 horas respectivamente). Linhas 5, 6, 7 e 8, representam a amplificação do DNA de sementes suscetíveis inoculadas com *S. macrospora* nos mesmos potenciais de inóculo. Linhas 9, 10, 11, e 12, representam o DNA de sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis*, e as linhas 13, 14 15, e 16, representam o DNA das sementes tolerantes inoculadas com *S. macrospora* sob os mesmos potenciais de inóculo descritos anteriormente. Linha M – 200 pb ladder DNA (Amersham, E.U.A). Linha A – DNA genômico do isolado de *S. maydis*. Linha B – DNA genômico do isolado de *S. macrospora*. 64

Figura 12 Representação dos espectros no infravermelho próximo obtidos de sementes de milho suscetíveis e tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* após processamento por correção multiplicativa de sinais: A – Sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. maydis*; B – Sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora*; C – Sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*; D – Sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis*; E – Sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora*; F – Sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*. 66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	<i>Stenocarpella</i> sp. associado à sementes de milho	19
2.2	Métodos de inoculação em sementes	21
2.3	Atividade enzimática e deterioração de sementes	22
2.4	Identificação de <i>Stenocarpella</i> sp. por meio da técnica de PCR.....	23
2.5	Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Condução do experimento.....	28
3.2	Obtenção dos isolados das sementes de milho	28
3.3	Inoculação das sementes com <i>Stenocarpella maydis</i> e <i>Stenocarpella macrospora</i>	29
3.4	Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes.....	29
3.4.1	Teste de germinação.....	30
3.4.2	Emergência de plântulas	30
3.4.3	Teste de Frio sem solo.....	31
3.4.4	Teste de sanidade	31
3.4.5	Incidência de <i>Stenocarpella</i> sp. em sementes	32
3.4.5.1	Intensidade de <i>Stenocarpella</i> sp. em sementes	32
3.5	Atividade isoenzimática	33
3.6	Extração de DNA	33
3.6.1	Amplificação da PCR.....	34
3.7	Espectroscopia no infravermelho próximo.....	34
3.7.1	Calibração e Validação do Método de Espectroscopia no Infravermelho Próximo	35
3.8	Análise estatística	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Qualidade fisiológica e sanitária de sementes após inoculação.....	38
4.1.2	Germinação e Primeira contagem de germinação	40
4.1.3	Teste de Frio	44

4.1.4	Emergência de plântulas	46
4.1.5	Índice de velocidade de emergência (IVE).....	49
4.1.6	Sanidade de sementes	51
4.1.6.1	Incidência (aos quatorze dias) e Intensidade de <i>Stenocarpella</i> sp...	54
4.2	Atividade isoenzimática	60
4.3	Detecção de <i>Stenocarpella</i> sp. por meio da técnica de PCR	62
4.4	Espectroscopia no infravermelho próximo	65
5	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

No cenário agrícola mundial, a cultura do milho tem grande importância pela sua extensão de áreas cultivadas, usos e sua produção anual. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), para a safra de 2015, estima-se algo em torno de 76.611,0 a 78.948,2 mil toneladas de milho produzidas, (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014). Fatores como o emprego na alimentação humana e animal, grandes áreas cultivadas e preço do produto, caracterizam o aumento da demanda de sementes híbridas de milho com alta qualidade.

Nos últimos anos houve aumento de lavouras implantadas sob o sistema de plantio direto, que reduz as operações de preparo de solo aumentando e mantendo a umidade. Além de vantagens com relação à manutenção física do solo, esse aumento da umidade predispõe as plantas ao ataque de microrganismos, um dos fatores que afetam diretamente a qualidade fisiológica e sanitária na produção de sementes, estas que são o principal veículo de transmissão de patógenos. Dentre os microrganismos causadores de fitopatologias destacam-se os fungos, que não são detectáveis facilmente em sementes antes do plantio, o que facilita o veículo de transmissão por sementes no estabelecimento da cultura.

Os fungos que geralmente colonizam sementes são divididos em fungos de campo e de armazenamento. Os fungos de campo necessitam de uma alta umidade relativa para crescerem, a exemplo do complexo *Diplodia*, nome comum dado aos fungos causadores da podridão do colmo e da podridão branca da espiga. Os restos culturais são ideais para a sobrevivência do inóculo, até a colonização da planta. Duas espécies de *Stenocarpella*, nome científico do complexo *diplodia*, podem causar a doença, sendo *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton, causadora da podridão branca da espiga, e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton, causadora da podridão do colmo e de manchas foliares (BRUNELLI et al., 2005).

As doenças da espiga, como comumente são chamadas, causam danos consideráveis na produção, principalmente em períodos com muitas chuvas, o que reduz a qualidade das sementes e aumenta a presença de toxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Siqueira et al. (2014), estudando os efeitos de *S. maydis* nos estádios iniciais de desenvolvimento de plântulas de milho e em sementes concluíram que quanto maior o tempo de exposição das sementes à colônia fúngica, maiores foram os efeitos negativos desses organismos, causando redução no vigor das sementes, na velocidade de emergência das plântulas, no estado final e no desenvolvimento inicial das plântulas de milho. Assim, a presença do complexo *Stenocarpella* sp. nas sementes tem grande importância, não somente devido aos danos econômicos que acarreta, mas também pelo perigo do consumo das sementes infectadas e seus derivados. Portanto, torna-se necessário, o desenvolvimento de técnicas para detecção rápida e segura desses patógenos, para agilizar a tomada de decisões relacionadas ao destino e distribuição geográfica dos lotes de sementes.

Nesse caso, objetivou-se com esta pesquisa avaliar o desempenho de sementes de genótipos de milho infectadas pelo complexo *Stenocarpella* e potencial de detecção dos patógenos por meio de espectroscopia no infravermelho próximo junto ao método de regressão por mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA), referenciada pelos resultados obtidos nas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), análise da isoenzima esterase (EST) e no teste de sanidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Stenocarpella* sp. associado a sementes de milho

A sanidade das sementes de milho é um dos principais fatores que condicionam o seu desempenho no campo, o estabelecimento de bons estandes e consequentemente, boa produtividade. Dentre os agentes patogênicos que podem associar-se às sementes de plantas, os fungos formam o maior grupo, seguido das bactérias e, em menor proporção, dos vírus e dos nematoides (MACHADO, 2001b).

Os fungos *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berkeley) Saccardo; *D. zae* (Schweinitz) Leveille] e *S. macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle] pertencem à Classe Ascomycetes e Ordem Dothideales. Estas duas espécies apresentam no campo, em seu ciclo biológico, somente a forma anamórfica (imperfeita ou assexuada), e podem causar podridão do colmo, da espiga e mancha foliar em plantas de milho (SUTTON, 1980).

A ocorrência das doenças causadas pelo gênero *Stenocarpella* sp. é variada e depende das precipitações pluviais e da temperatura, ocorrendo em todas as regiões de cultivo, devido à eficiente transmissão desses patógenos pelas sementes. Normalmente, a doença causada por *S. maydis* é mais severa e afeta com maior frequência as espigas, ocorrendo em regiões com altitudes acima de 700 m, temperaturas moderadas e, sobretudo, altas umidades relativas, e menos severa em regiões quentes, com altitudes abaixo de 500 m, quando ocorre o aparecimento de *S. macrospora* (FREITAS, 2006). De acordo com Casa, Reis e Zambolim (2003), *Stenocarpella maydis* apresenta picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados, com coloração marrom-escura a preta, paredes grossas, diâmetro de 150-300 µm e um ostíolo protuberante papilado. Os conidióforos são usualmente ausentes. Apresentam células conidiogênicas enteroblásticas, filídicas, cilíndricas, formadas nas células internas da parede do picnídio. Os conídios são pardos-oliva a pardos, cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente

curvados, medindo 15-34 x 5-8 μm , bicelulados e comumente com 1 septo (0-2). *Stenocarpella macrospora* apresenta picnídio e conídios semelhantes aos descritos para *S. maydis*, porém seus esporos são 2-3 vezes maiores, medindo 44-82 x 7,5-11,5 μm e apresentando 1-2 septos (1-3) (SUTTON, 1980). De acordo com Reis, Casa e Bresolin (2004), a diferenciação das espécies de *Stenocarpella* é possível apenas pela mensuração e observação dos septos das estruturas reprodutivas em microscópios através do preparo de laminais no “Blotter test” o que torna o método de identificação e diferenciação desse fungo oneroso e pouco prático.

Em meio de cultura de BDA (batata- dextrose- ágar), os fungos apresentam crescimento micelial rápido, com micélio aéreo e cotonoso, cobrindo a placa de Petri de 90 mm de diâmetro em 5-6 dias. Com 10 dias as colônias das duas espécies apresentam cor branca. Aos 15 dias, a colônia de *S. maydis* apresenta cor superficial salmão-escura, enquanto que *S. macrospora* permanece com a coloração superficial branca. Mario e Reis (2001), verificaram que as colônias de *S. macrospora* permanecem brancas a beje 15 dias após a incubação das sementes em “Blotter Test”, enquanto que *S. maydis*, originalmente branca, tornam-se pardo-escuras. Esse tipo de observação não confere a diferenciação segura das espécies do complexo *Stenocarpella*, pois a diagnose visual é subjetiva, sujeita a características do isolado fúngico, e a mudanças do ambiente. (LATTERELL; ROSSI, 1983).

Reis, Casa e Bresolin (2004), ao avaliarem reação de híbridos de milho à podridão branca, inocularam uma mistura de isolados de *S. maydis*, mas observaram maior incidência de *S. macrospora* do que de *S. maydis* nos grãos. Casa, Reis e Zambolim (2006) também relataram a recuperação de somente uma espécie em sementes apodrecidas quando, na verdade, as duas haviam sido inoculadas, o que demonstra a dificuldade em separar as espécies fúngicas mesmo quando inoculadas artificialmente.

No plantio, o controle da podridão do colmo e da espiga deve ser feito pelo uso de semente sadia e/ou pelo tratamento de semente com fungicida que leve a erradicação do fungo. O tratamento de sementes de milho com fungicidas têm como objetivo controlar fungos associados à semente e protegê-las contra aqueles do solo (PINTO, 1998), prevenindo a deterioração da semente e evitando a transmissão do patógeno para as plântulas, reduzindo assim, a intensidade de podridões.

Amplamente distribuída em todos os locais onde o milho é cultivado no Brasil, a ocorrência do fungo *Stenocarpella* sp. é mais frequente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, com intensidade e severidade variadas entre as regiões e dentro da mesma região (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2003; PINTO, 2004) afetando também as regiões produtoras de sementes de milho.

2.2 Métodos de inoculação em sementes

Considera-se que a podridão de semente e a morte de plântulas causada por *Stenocarpella* sp. tenham a semente como a sua principal fonte de inóculo. Quando a semente é hidratada, ao entrar em contato com a água do solo, o micélio do fungo, que se encontra no endosperma ou no embrião, reassume sua atividade vital e passa a crescer do interior à superfície da semente (TEIXEIRA et al., 2005). Ao crescer sobre a semente, o fungo acaba alcançando a radícula e o coleóptilo das plantas, e pela colonização do coleóptilo atinge a superfície do solo.

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 modificações físicas e/ou fisiológicas que podem dificultar a identificação dos fungos durante a avaliação, além de não assegurar a infecção pelo patógeno em níveis desejados (TEIXEIRA et al., 2005). Segundo Machado et al. (2001a) o uso da restrição hídrica em meio BDA + manitol permitiu que as sementes de milho ficassem

expostas aos fungos *Diplodia maydis*, *Fusarium verticillioides* e *Cephalosporium acremonium*, resultando em um 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, 2004).

Segundo Machado et al. (2001a), a utilização da restrição hídrica como meio de se obter sementes infectadas apresenta vantagens sobre outros métodos por não depender de aspectos como sazonalidade e de operações trabalhosas que nem sempre proporcionam resultados satisfatórios. Dessa forma, a inoculação de sementes por meio do método de restrição hídrica torna-se efetivo para obtenção de sementes infectadas para realização de estudos na área de patologia de sementes.

2.3 Atividade enzimática e deterioração de sementes

As principais alterações relacionadas ao processo de deterioração em sementes são a degradação e inativação de enzimas, redução da atividade respiratória (VIDIGAL et al., 2008) e perda de integridade das membranas celulares (McDONALD, 1999), esta última característica está indiretamente relacionada com alterações na fisiologia das sementes, as quais dependem da variedade de enzimas e proteínas estruturais de cada espécie. Porém, essas variações em nível de membranas nem sempre podem ser avaliadas por testes de germinação e vigor (VIEIRA, 1996). Uma alternativa seria a utilização de análises de isoenzimas que, por serem mais sensíveis, podem medir a deterioração incipiente através da expressão da atividade de certas enzimas associadas à quebra de reservas ou à biossíntese de tecidos novos (COUTINHO et al., 2007).

A presença de microrganismos associados às sementes está ligada à degradação de membranas, uma vez que esses podem provocar alterações no metabolismo celular (AMARAL et al., 2000). Para Cherry (1983), a presença de

microrganismos nas sementes pode causar diminuição da intensidade de algumas proteínas, intensificação de outras e a produção de múltiplas formas moleculares.

Com objetivo de estudar as mudanças nas atividades de isoenzimas que ocorrem em sementes em deterioração, têm sido desenvolvidos trabalhos em que normalmente, são utilizadas enzimas que desempenham tarefas-chave no metabolismo dos lipídios, significativas no desenvolvimento, e germinação de sementes, como as esterases (COUTINHO, 2007).

A esterase (EST) é uma enzima que participa da hidrólise de ésteres de membrana, o que demonstra maior peroxidação de lipídios, sendo essa enzima envolvida em relações de hidrólise de ésteres estando diretamente ligada ao metabolismo de lipídios (SANTOS; MENEZES; VILELA, 2004). Muitos desses lipídios são constituintes de membranas, cuja formação não está completamente concluída.

Padilha et al. (2001), estudando a relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse concluíram que para as sementes submetidas a condições mais drásticas de deterioração houve o aparecimento de uma nova banda e diminuição da intensidade das bandas conhecidas de esterase para os tratamentos mais drásticos. O que confirma estudos de Coutinho et al. (2007), onde houve redução dessa enzima em que sementes de milho submetidas à termoterapia por 20 minutos para controle de patógenos.

2.4 Identificação de *Stenocarpella* sp. por meio da técnica de PCR

No estudo de técnicas para a detecção de microrganismos fúngicos em sementes o sistema baseado em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vem provando ser confiável. A PCR é uma técnica molecular composta de dois oligonucleotídeos sintéticos, cada um complementar às seqüências das fitas opostas do DNA alvo em posições justamente flanqueadoras das extremidades do segmento a ser amplificado.

Possui grande sensibilidade devido à possibilidade de se amplificar quantidades mínimas de ácido nucleico, os oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) auxiliam a iniciação da replicação das cópias do fragmento-alvo, com a extremidade 3'-OH das sondas hibridizadas uma em direção oposta a outra e posicionadas para moldar a síntese de DNA através do DNA molde (LANE et al., 1985). A partir do conceito básico de PCR, são vários os desdobramentos possíveis da metodologia quando associadas a outras ferramentas moleculares.

Dentre os marcadores moleculares estudados para a espécie *S. maydis* e para a presença do gênero do fungo *Stenocarpella* sp., Xia e Achar (2001), obtiveram sucesso na detecção do gênero fúngico em sementes de milho e também a constatação da presença da espécie *S. maydis* utilizando o par de *primers* P1/P2. Já em estudos mais recentes, Barrocas et al. (2012), testou o par de *primers* descrito por Xia e Achar (2001), comprovando a especificidade apenas para o gênero *Stenocarpella* sp.

Uma vez que a distinção de espécies do gênero *Stenocarpella* sp. apenas é possível por meio de “*Blotter test*” com a preparação de lâminas e observação das estruturas reprodutivas, a técnica de PCR, pode ser usada como referência, junto ao teste de sanidade “*Blotter test*” para a validação e confirmação dos resultados obtidos nas amostras avaliadas através de espectroscopia no infravermelho próximo, pois mesmo os marcadores identificando apenas uma espécie ou a presença do fungo nas amostras, essas informações atreladas aos resultados da espectroscopia podem identificar um nível maior de sensibilidade podendo ser um modo rápido e eficaz para detecção e/ou da separação das espécies *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*.

2.5 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

Espectroscopia é um termo atribuído pela Física e Química para todas as técnicas de obtenção de dados através da radiação incidente em uma amostra. Átomos e moléculas transmitem, refletem e absorvem a radiação de maneira

diferente, sendo assim possível a obtenção de um padrão espectral único. A radiação eletromagnética é dividida em diversas regiões de acordo com sua frequência, formando o espectro eletromagnético, que por sua vez também é dividido em bandas pela forma que a radiação é produzida e captada (BALL, 2001).

Convencionalmente, a região do espectro do infravermelho é dividida em três partes, de acordo com o número de onda: Infravermelho próximo (NIR), com números de onda na faixa de $4.000 - 12.000 \text{ cm}^{-1}$, infravermelho médio (MIR), com números de onda na faixa de $400 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$, e o infravermelho distante (FIR), que possui números de onda na faixa de $10 - 400 \text{ cm}^{-1}$, (SKOOG; HOLLER; NEIMAN, 2002). Os espectros obtidos no infravermelho próximo, segundo Santos, Pereira e Korndörfer (2010), podem ser utilizados para estudar as vibrações moleculares e a estrutura rotatória-vibratória associada dessas moléculas, criando uma identidade única da amostra analisada.

Pela radiação no infravermelho próximo, o espectro obtido de um material é o resultado da absorção de radiação por moléculas orgânicas, principalmente aquelas que possuem grande número de ligações C-N, N-H e O-H (AMORIM, 1996).

A técnica de espectroscopia no infravermelho próximo vem sendo utilizada com frequência como ferramenta analítica na determinação dos componentes presentes em folhas, solo, grãos, alimentos (SANTOS; PEREIRA; KORNDÖRFER, 2010) e em microrganismos (TRALAMAZZA, 2011).

Estudos para determinação de compostos químicos em vegetais também vêm sendo desenvolvidos através dessa técnica. Em sementes, os primeiros trabalhos utilizando essa técnica foram realizados na determinação do teor de água de soja e milho (HART; NORRIS; GOLUMBIC, 1962). Em estudos mais recentes Grunvald et al. (2014), construíram uma equação para avaliação do teor de óleo em sementes de genótipos de girassol. Já Almeida, Arriel e Medeiros (2012), utilizaram a espectroscopia NIR para predição de ácidos graxos em

sementes intactas de gergelim. Pelos estudos constata-se a aplicabilidade da técnica na avaliação de componentes químicos de interesse em sementes.

Na tentativa de diferenciar fungos do gênero *Aspergillus*, Tralamazza, (2011), separou-se as espécies estudadas de *Aspergillus* através do uso da espectroscopia no infravermelho próximo, estabelecendo padrões espectrais para comparação e correlação com métodos tradicionais.

Szeghalmi, Kaminsky e Gough (2007) conseguiram diferenciar a composição de hifas de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Neurospora* e *Rhizopus* sob condições de estresse também por meio da técnica de infravermelho próximo. Helm et al. (1991), concluíram que padrões de NIR podem ser usados para tipificar diferentes bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Legionella* e *Escherichia*.

Assim, o sistema de espectroscopia no infravermelho próximo - NIR - possui potencial para substituir grande parte das metodologias utilizadas na identificação de patógenos em grãos e sementes, pois possui como vantagens rapidez nas análises das amostras, efetividade, pequena quantidade de amostra. Sua principal vantagem é permitir múltiplas análises, menor necessidade de mão de obra, além de não ser poluente e ter a possibilidade de não destruir a amostra analisada (AMORIM, 1996).

Para que o método seja estabelecido são necessários resultados obtidos a partir dos métodos analíticos tradicionais de análises que servirão como referência na calibração de um método preditivo, em que os espectros são as variáveis independentes (X) e a propriedade a ser estimada, a variável dependente (y).

O pré-tratamento dos dados é uma etapa importante, antes de obter-se o modelo de calibração, em que o objetivo é facilitar a interpretação dos espectros através da obtenção de dados importantes bem como a exclusão de dados desnecessários, melhorando assim a previsão dos modelos de calibragem (ZENI, 2005).

Para estabelecimento do modelo de calibração, o método de regressão por mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS - DA: *Partial Least Squares – Discriminant Analysis*), permite prever classes (variáveis dependentes, y) a partir de descritores (variáveis independentes, X), as quais, neste projeto seriam representadas pela presença ou não do fungo, e as espécies desse fungo, (y), preditas a partir de dados espectrais de NIR (X) (ABDI, 2003). Sendo um método qualitativo, discrimina amostras por meio de classes pré-estabelecidas (WHELEHAN, 2006).

A validação do modelo construído é feita por meio de uma análise preditiva. O modelo é testado com novas amostras, prevendo os valores de y , (LORBER; KOWALSKI, 1988), caracterizando a validação externa. A validação cruzada, também é um teste aplicado ao modelo, em que algumas amostras do conjunto de calibração são separadas (*Leave one out*), as amostras restantes são usadas na construção do modelo, e a previsão é feita para as amostras separadas inicialmente, ou seja, as amostras preditas são as mesmas usadas no conjunto de calibração, porém, não participaram da construção do modelo quando foram preditas, testando assim a eficiência do modelo criado, com “novas” amostras. E ainda testa-se a eficiência do modelo pelo número de acertos obtidos pela calibração.

Confirmada a eficiência do sistema através deste trabalho, pode-se continuar estudando o método em questão e possivelmente chegar a novas metodologias e testes para avaliação da qualidade de sementes que possam identificar não somente a presença das espécies de *Stenocarpella* sp. em milho, mas sim vários patógenos em outras culturas de importância econômica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do experimento

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Central de Sementes e Laboratório de Patologia de Sementes dos Departamentos de Agricultura e Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas sementes de milho de dois genótipos, sendo um suscetível ao patógeno estudado e outro tolerante. As sementes são da safra 2012/2013 e foram cedidas pela empresa Dow AgroSciences.

As sementes de milho foram submetidas ao teste de germinação e sanidade, para o estabelecimento do perfil inicial dos lotes, apresentando germinação superior a 98% nos dois lotes estudados. Foi realizado um teste de sanidade, sendo as sementes previamente desinfestadas com hipoclorito 2% por 1 minuto. O lote de sementes do genótipo suscetível apresentou os fungos *Penicillium* spp. (3%), *Rhizopus stolonifer* (1%), *Aspergillus* spp. (0,5%), e *Fusarium* spp. (73%). Já o lote de sementes do genótipo tolerante ao fungo estudado também apresentou no teste de sanidade os fungos *Rhizopus stolonifer* (0,5%), *Aspergillus* spp. (0,5%), *Fusarium* spp. (0,5%), e em maior porcentagem *Penicillium* spp. (17%) na leitura do sétimo dia do “*Blotter test*”.

3.2 Obtenção dos isolados das sementes de milho

Os isolados foram cedidos pelo Laboratório de Patologia de Sementes da Universidade Federal de Lavras, (Tabela 1). As colônias de *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* foram transferidas pelo método de transferência de discos de colônia, para placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo meio batata dextrose ágar (BDA) e mantidas em incubação, à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h por catorze dias até sua utilização.

Tabela 1 Identificação dos isolados fornecidos pelo Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA. Lavras - MG, 2014

Código	Espécie	Hospedeiro	Origem	Data
LAPS 292	<i>Stenocarpella maydis</i>	milho/semente	Sete Lagoas - MG	2010
LAPS 012	<i>Stenocarpella macrospora</i>	milho/semente	Passo Fundo - RS	2010

3.3 Inoculação das sementes com *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*

Sementes de milho foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 2%, por 1 min, secadas à sombra e inoculadas com o isolado de *S.maydis*, e *S. macrospora* pelo método de restrição hídrica (MACHADO et al., 2001a).

Os discos das colônias de *S. maydis* e *S. macrospora* foram transferidos para placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo manitol (96,4 g/L) em meio BDA, com potencial hídrico ajustado para -1,4 MPa, segundo cálculo do software SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). As placas foram mantidas em incubação à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, por catorze dias, quando as sementes foram colocadas sobre a cultura fúngica e ficaram em incubação por, 0, 24, 48, 72 horas nas mesmas condições. Após a inoculação, as sementes foram secadas à sombra e à temperatura ambiente. Após a secagem, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel em câmara fria até a condução dos testes.

3.4 Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária das sementes

O grau de umidade das sementes foi avaliado pelo método da estufa a 105°C por 24 horas. Foram utilizadas quatro subamostras conforme as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009b), e os resultados foram expressos em porcentagem.

3.4.1 Teste de germinação

Para o teste de germinação foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com uma quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes o peso seco do substrato. Estes foram mantidos em germinador regulado à temperatura de 25°C. As avaliações do número de sementes germinadas foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a semeadura (BRASIL, 2009a) e os resultados, expressos em porcentagem de plântulas normais. **Primeira contagem de germinação** – foi conduzida juntamente ao teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais aos quatro dias após a semeadura.

3.4.2 Emergência de plântulas

O teste de emergência de plântulas foi conduzido com oito repetições de 25 sementes em bandejas plásticas (47x27x08cm) 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 mesmo volume de água para cada bandeja. A emergência das plântulas foi computada aos vinte e um dias após a semeadura, avaliando-se o número de plântulas normais. Os resultados foram expressos em porcentagem. **Índice de velocidade de emergência (IVE)** – a partir do início da emergência, foram realizadas avaliações diárias, onde foram computados os números de plântulas emergidas. O cálculo do índice de velocidade de emergência foi realizado conforme a fórmula proposta por (MAGUIRE, 1962).

3.4.3 Teste de frio sem solo

Para o teste de frio foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento distribuídas sobre substrato de papel (tipo germitest) umedecido com uma quantidade de água destilada equivalente a 3 vezes o peso seco do substrato. Os rolos foram confeccionados como no teste de germinação e após a semeadura, acondicionados em sacos plásticos e mantidos em câmara fria regulada à temperatura de 10°C. As avaliações do número de sementes germinadas foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a semeadura (BRASIL, 2009a) e os resultados, expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.4.4 Teste de sanidade

O teste de sanidade das sementes foi avaliado pelo “*Blotter test*” com congelamento. Foram utilizadas oito repetições de 25 sementes distribuídas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo três folhas de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. As sementes foram incubadas por 24 horas à temperatura de 20°C, em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, transferidas para um freezer a -20°C por mais 24 horas, e novamente incubadas à temperatura de 20°C, por quinze dias.

Para a observação da incidência de *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* nas sementes, foi utilizado microscópio estereoscópio e os resultados foram expressos em porcentagem, e foram montadas lâminas com conídios para a certificação das espécies fúngicas. As lâminas foram preparadas com fita adesiva transparente. Pedacos de 4-6 cm desse material foram seguros pelos extremos, com a face adesiva voltada para baixo, e sua parte central foi colocada em contato com a parte do fungo sobre as sementes. Em seguida, fixou-se a fita em uma lâmina para microscopia contendo uma pequena gota de líquido de montagem (BRASIL, 2009b).

3.4.5 Incidência de *Stenocarpella* sp. em sementes

Com base nas estruturas do fungo *Stenocarpella* sp. (micélio característico) ou nos sintomas nas sementes, separaram-se as sementes submetidas ao teste de sanidade em sadias e infectadas. A incidência foi expressa em porcentagem de sementes infectadas por repetição.

3.4.5.1 Intensidade de *Stenocarpella* sp. em sementes

As sementes submetidas ao teste de sanidade foram avaliadas através do microscópio óptico e divididas em classes de notas, por intensidade da doença, recebendo notas de 0 a 4 (Tabela 2).

Tabela 2 Escala de notas atribuídas a intensidade de *Stenocarpella* sp em sementes de milho. UFLA - MG, 2014

Notas (n)	Severidade da doença visualizada nas sementes
0	Sementes sem fungo
1	Sementes com até 25% da superfície recobertos pelo fungo
2	Sementes com 26%-50% da superfície recobertos pelo fungo
3	Sementes com 51%-75% da superfície recobertos pelo fungo
4	Sementes com 76%-100% da superfície recobertos pelo fungo

Após a atribuição da nota a cada semente, utilizou-se a fórmula proposta por McKinney (1923), para a obtenção do grau de intensidade (%) por repetição.

$$SD = \frac{\sum (f \times n)}{(F \times N)}$$

Em que: SD – severidade de ocorrência da doença em cada parcela;

f – frequência de cada nota da escala;

n – nota da escala atribuída a cada semente;

F – número total de sementes avaliadas por repetição;

N – nota máxima da escala.

3.5 Atividade isoenzimática

A análise enzimática foi feita por meio da técnica de eletroforese. Para a análise, as sementes inoculadas e os isolados de *S. maydis* e *S. macrospora* foram macerados na presença de nitrogênio líquido e PVP em moinho e armazenadas a -86°C de temperatura.

O tampão utilizado para extrair a enzima esterase (EST) foi o Tris HCL 0,2 M, pH 8 adicionando-se 0,1% de mercaptoetanol na proporção de 250 µL por 100mg de amostra de sementes. Já para os isolados de *Stenocarpella* sp. foi utilizada a mesma alíquota de tampão de extração por 15mg de amostra. O material foi homogeneizado em vortex, e mantido *overnight* em geladeira, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 60 minutos a 4°C.

Foi feito gel de poliacrilamida a 7,5% (gel separador), e 4,5% (gel concentrador), para a corrida eletroforética. O sistema gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina Ph 8,9. Foram aplicados 50 µL de sobrenadante das amostras no gel, e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por 5 horas.

Terminada a corrida o gel foi revelado para a enzima esterase (EST), de acordo com Alfenas et al. (1991).

3.6 Extração de DNA

As amostras das sementes inoculadas e dos isolados das duas espécies fúngicas foram maceradas em moinho, até a obtenção de um fino pó. Foram retirados aproximadamente 1 g de cada amostra macerada em nitrogênio líquido e para cada amostra, foram pesados 0,04 g para a extração de DNA. Este foi extraído com Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Os pares de *primers* P1/P2 (Tabela 3) foram utilizados para as ampliações da PCR para todas as amostras. A qualidade do DNA foi observada em gel de agarose 0,8% em tampão 1xTBE (40mM Tris-borato, 1mM

EDTA, pH 8,0), de acordo com Barrocas et al. (2012). O gel foi corado com gel *red* e visualizado sob a luz UV. O DNA foi quantificado por espectrofotometria.

Tabela 3 Primer utilizado no sistema PCR. UFLA, Lavras - MG, 2014

Primer	Sequência	Referência
P1/P2	F - GTTGGGGGTTTAACGGCACG R - GTTGCCTCGGCACAGGCCGG	Xia e Achar (2001)

3.6.1 Amplificação da PCR

Os *primers* P1/P2 descritos por Xia e Achar (2001), foram utilizados para amplificar as regiões presentes nos isolados de *S. maydis* e *S. macrospora*. A amplificação foi realizada em 25µl da reação contendo tampão da PCR (tampão IB - Phoneutria, Brasil) 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 15 MgCl₂, dNTPs (2,5 mM de cada dNTP), primers (10 µM de cada primer forward ou reverse) e 5u/µl unidades Taq DNA polimerase. Para a amplificação das bandas nas sementes inoculadas, foi utilizado 2µl do DNA concentrado.

A amplificação constou, inicialmente, de desnaturação de 95° por 3 minutos, 30 ciclos: desnaturação 94° por 30 segundos, anelamento de 60° por 1 minuto e extensão de 72° por 1 minuto com extensão final de 72° por 10 minutos. Uma alíquota de 10 µl foi utilizada para separar os produtos da PCR em gel de agarose 1% em tampão TBE a 150V por aproximadamente, 2 horas. O gel foi corado com Gel *red* e os produtos da PCR foram observados em transluminador UV.

3.7 Espectroscopia no infravermelho próximo

O espectrômetro NIR utilizado foi o modelo TENSOR 27, fabricado pela BRUCKER, disponibilizado pelo Laboratório de Análises de Sementes da Universidade Federal de Lavras. O software utilizado no equipamento foi o OPUS_ *Spectroscopy Version 6*, do mesmo fabricante.

Para a construção do modelo PLS-DA (regressão por mínimos quadrados parciais com análise discriminante) para classificação das amostras inoculadas e não inoculadas com *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* foram obtidos espectros NIR de amostras de 100 sementes submetidas a cada um dos quatro potenciais de inóculo: 0, 24, 48, e 72, totalizando 400 sementes do material tolerante e a mesma quantidade do material suscetível ao gênero fúngico, inoculado com as duas espécies estudadas separadamente. A organização dos dados foi feita diante da determinação de modelos para detecção do patógeno em ambos os genótipos de sementes de milho. Foi criado um modelo de presença e ausência de *S. maydis* e *S. macrospora.*, e outro modelo para diferenciação de *S. maydis* e *S. macrospora* nas sementes de milho inoculadas. As análises foram realizadas da mesma maneira para ambos os modelos e genótipos (suscetível e tolerante).

3.7.1 Calibração e validação do método de espectroscopia no infravermelho próximo

Para a construção do modelo de calibração foi utilizado o método de classificação multivariada por mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS – DA), em que as classes (y) são as variáveis dependentes e os espectros NIR obtidos dessas amostras as variáveis independentes (ABDI, 2003).

Na separação de sementes que foram submetidas à inoculação com *S. maydis* e *S. macrospora*, das que não passaram por esse processo, as classes (y) pré-estabelecidas foram: 1- sementes não inoculadas e 2- sementes inoculadas com ambos isolados fúngicos, definindo o modelo de presença e ausência do fungo. Já para o outro modelo, as classes (y) foram: 1- sementes não inoculadas, 2- sementes inoculadas com *S. maydis*, e 3- inoculadas com *S. macrospora*, para separação das espécies fúngicas.

Realizou-se o pré-processamento dos números de onda por correção multiplicativa de sinais e os dados foram ajustados excluindo os espectros de número

um a trezentos, pois essa região espectral confere apenas ruídos e não produz informações relevantes (DECKER; NIELSEN; MARTENS, 2005).

Otimizou-se o modelo pela escolha do número de variáveis latentes com base na porcentagem de classificações corretas, e por validação cruzada, onde utiliza-se as mesmas amostras do conjunto de calibração, mas separa-se uma amostra (*leave onde out*) e constrói-se o modelo com as restantes e calcula-se o erro de previsão para a amostra que ficou de fora, assim esse processo é repetido até que todas as amostras tenham ficado de fora uma vez.

A porcentagem de acerto na classificação de sementes com fungo e sem fungo, e na separação de sementes inoculadas com *S. maydis* das inoculadas com *S. macrospora* foi o parâmetro utilizado para avaliação do modelo de classificação. O teste de randomização de Y (*y-randomization*) também foi utilizado para avaliação da qualidade dos ajustes aplicados aos modelos, onde se utiliza as mesmas amostras do conjunto de calibração, selecionando ao acaso as classes y para construir o modelo. Se realmente X descreve y, o erro de previsão deste modelo deve ser ruim, ou seja, quanto menor o valor do teste de *y-randomization*, mais robusto é o modelo criado.

Para validação externa do modelo foram utilizadas amostras de um grupo teste, que são representadas por 25% do número de amostras originais, as quais não estavam incluídas no grupo de amostras de calibração (correspondente aos 75% das amostras restantes). O desempenho do modelo também foi avaliado por meio da porcentagem de classificações corretas para as amostras de teste. Todos os cálculos foram realizados pelo software Chemoface (NUNES et al., 2012).

3.8 Análise estatística

Para a análise dos resultados dos testes para avaliação da qualidade fisiológica foi utilizado o esquema fatorial de 4x2, sendo os tratamentos os potenciais de inóculo a que as sementes foram expostas (0, 24, 48, 72 horas), e os fungos, as duas espécies, *S. maydis* e *S. macrospora*, que foram inoculadas

separadamente em sementes do material suscetível e do material tolerante ao fungo estudado. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e o efeito dos tratamentos foi estudado por meio de análise de regressão. A comparação das médias de todos os testes foi feita pelo teste de Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade. Para o teste de sanidade, e análise dos resultados de incidência e severidade da doença, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$. Todas as análises foram realizadas no *software* estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011). Os dados da espectroscopia no infravermelho próximo foram avaliados através de regressão por mínimos quadrados parciais com o auxílio do programa estatístico Chemoface (NUNES et al., 2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade fisiológica e sanitária de sementes após inoculação

O grau de umidade das sementes foi de 11,5% para o material suscetível ao gênero *Stenocarpella* sp., e 12,7% para o material tolerante, não havendo necessidade de uniformização.

Pelos resultados da análise de variância dos dados obtidos nos testes de primeira contagem de germinação, germinação, teste de frio sem solo e emergência de plântulas com sementes de milho do genótipo suscetível ao fungo estudado, observa-se que houve efeito significativo para os tratamentos. O efeito das duas espécies de *Stenocarpella* sp., foi significativo apenas para a primeira contagem de germinação. Não houve efeito significativo de nenhum fator para o índice de velocidade de emergência (Tabela 4). Para o teste de sanidade, observamos efeito significativo para tratamentos e fungos, separadamente, (Tabela 5), e para incidência e intensidade da doença, observa-se efeito significativo apenas para os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 4 Resumo do quadro de análise de variância dos testes fisiológicos de primeira contagem de germinação PC(%), germinação G(%), teste de frio sem solo F(%), emergência de plântulas E(%), e índice de velocidade de emergência (IVE), em sementes suscetíveis inoculadas com *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* em diferentes potenciais de inóculo

Fatores	GL	QM				
		PC (%)	G (%)	F (%)	E (%)	IVE
Tratamentos	3	27,125*	24,833*	140,666*	100,333*	6,548
Fungos	1	21,125*	12,500	4,500	4,500	0,846
Tratamentos*Fungos	3	6,458	3,500	1,833	13,500	0,256
Resíduo	24	3,875	3,416	10,583	5,916	3,112
CV %		2,03	1,9	3,42	2,49	4,09

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 5 Resumo do quadro de análise de variância do teste de sanidade S(%), em sementes de milho suscetíveis inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fatores	GL	QM
		S ¹ (%)
Tratamentos	3	3,24*
Fungos	1	1,47*
Tratamentos*Fungos	3	0,83
Resíduo	56	0,33
CV %		42,72

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

¹Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Tabela 6 Resumo do quadro de análise de variância para incidência e intensidade da doença, em sementes de milho suscetíveis ao fungo *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* submetidas a diferentes potenciais de inóculo

	GL	QM	
		INC ¹ .	INT ¹ .
Tratamentos	3	3,49*	0,56*
Fungos	1	0,37	0,09
Tratamentos*Fungos	3	0,87	0,21
Resíduo	24	0,61	0,09
CV %		47,37	24,36

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

¹Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$.

Para as sementes de milho do genótipo tolerante à *Stenocarpella* sp., observa-se pelos resultados da análise de variância dos dados efeito significativo para o índice de velocidade de emergência de fungos e tratamentos, separadamente. Para os demais testes não houve efeito significativo, (Tabela 7). Para o teste de sanidade, não foi observada presença de *Stenocarpella maydis* e de *S. macrospora* na primeira leitura do Blotter test. Para incidência e severidade

da doença, observa-se efeito significativo para interação de tratamentos e fungos, (Tabela 8).

Tabela 7 Resumo do quadro de análise de variância dos testes fisiológicos de germinação G(%), primeira contagem de germinação PC (%), teste de frio F(%), emergência de plântulas E(%), e índice de velocidade de emergência (IVE), em sementes tolerantes inoculadas com *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fatores	GL	QM				
		PC (%)	G (%)	F (%)	E (%)	IVE
Tratamentos	3	2,166	1,666	0,531	2,458	6,005*
Fungos	1	0,500	0,500	0,281	0,125	9,426*
Tratamentos*Fungos	3	2,833	1,500	2,281	0,458	1,816
Resíduo	24	3,166	1,833	0,864	1,208	1,208
CV %		1,8	1,36	0,94	1,10	2,44

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 8 Resumo do quadro de análise de variância para incidência e intensidade da doença, em sementes de milho tolerantes ao fungo *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* submetidas a diferentes potenciais de inóculo

		QM	
		INC ¹ .	INT ¹ .
Tratamentos	3	64,37*	14,26*
Fungos	1	29,49*	10,85*
Tratamentos*Fungos	3	5,81*	1,99*
Resíduo	56	0,53	0,16
CV %		18,85	17,48

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

¹Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$.

4.1.2 Germinação e Primeira contagem de germinação

- Sementes suscetíveis à *Stenocarpella* sp.

Para o genótipo suscetível e inoculado com o fungo *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, observa-se diferença no potencial de germinação das sementes à medida que se aumentou o potencial de inóculo. Menores valores de germinação foram observados nas sementes, seguindo uma tendência linear (Figura 1). Não houve diferença significativa entre as espécies de *Stenocarpella* sp. inoculadas nas sementes suscetíveis, para o teste de germinação. Porém, houve efeito significativo para o fator fungos na primeira contagem de germinação (Tabela 9).

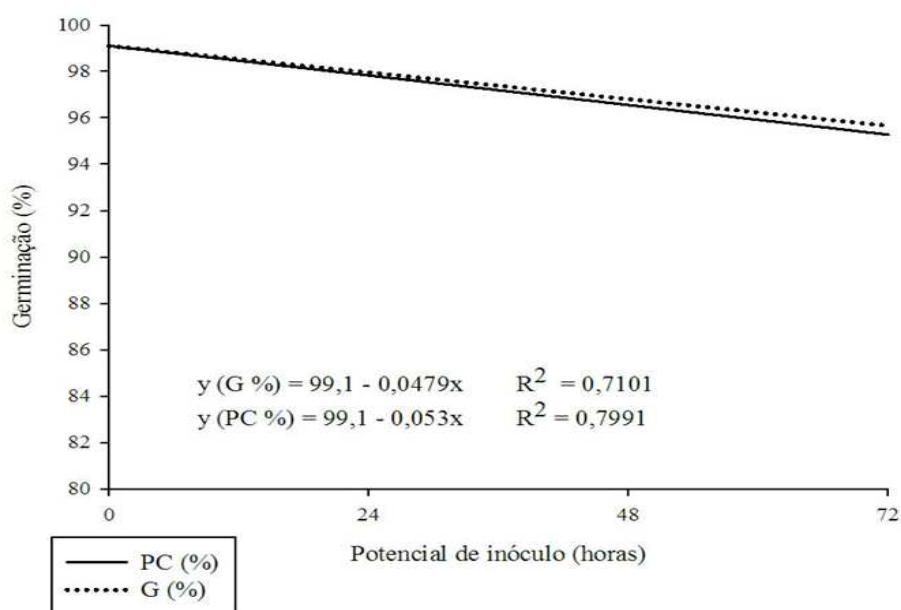


Figura 1 Porcentagem de plântulas normais de sementes de milho suscetíveis ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas à diferentes potenciais de inóculo, obtidas no teste de Germinação (G%), e primeira contagem de germinação (PC%). Lavras, MG, 2014

Tabela 9 Valores médios de primeira contagem de germinação (PC%), e germinação (G%), de sementes de milho suscetíveis e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*. Lavras, MG, 2014

Fungo	PC (%)	G (%)
<i>S. macrospora</i>	96,37 b	96,75 a
<i>S. maydis</i>	98 a	98 a
CV (%)	2,03	1,9

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

A avaliação do potencial fisiológico de sementes é tradicionalmente feita pelo teste de germinação, que é conduzido sob condições ideais para o desenvolvimento da cultura. A primeira contagem de germinação tem o papel de avaliar o vigor das sementes, já que no processo de deterioração a velocidade da germinação é um dos principais parâmetros a ser afetado.

A presença de patógenos em sementes está associada ao decréscimo do poder germinativo, de acordo com Muniz et al. (2004).

Casa, Reis e Zambolim (2006), estudando os danos causados por *S. maydis* e *S. macrospora* na cultura do milho, observaram a associação desses fungos à queda no percentual de germinação, o que indica o ataque ao embrião das sementes, e nos casos em que as sementes germinaram, o vigor das plântulas foi comprometido. Latterell e Rossi (1983), comparando a patogenicidade dos fungos do gênero *Stenocarpella* sp., verificaram que *S. macrospora* é mais agressivo do que *S. maydis* durante os estádios iniciais de desenvolvimento da planta, o que pode explicar a menor germinação inicial das sementes suscetíveis inoculadas com o isolado de *S. macrospora*. Já Machado et al. (2001b), avaliaram o desempenho de sementes de milho submetidas à restrição hídrica na presença

de *S. maydis*, e para o teste de germinação no potencial hídrico de -1,2Mpa, não havendo comprometimento da germinação das sementes, o que contradiz estudos realizados por Pinto (1998), que relata a agressividade de *S. maydis* na germinação das sementes podendo causar a morte das mesmas.

- **Sementes tolerantes à *Stenocarpella* sp.**

Independentemente do potencial de inóculo, e espécie de *Stenocarpella* sp. a que as sementes tolerantes foram submetidas, o percentual de plântulas normais no teste de germinação e na primeira contagem de germinação não diferiu em média significativamente entre si. (Tabela 10).

Tabela 10 Valores médios de primeira contagem de germinação (PC%), e germinação (G%), de sementes de milho tolerantes e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*

Fungos	PC (%)				G (%)			
	Potencial de inóculo (horas)							
	0	24	48	72	0	24	48	72
<i>S. macrospora</i>	99 a	100 a	97,5 a	98,5 a	99,5 a	100 a	98 a	99 a
<i>S. maydis</i>	98 a	98,5 a	98,5 a	99 a	99,5 a	99,5 a	99,5 a	99 a
CV (%)	1,8				1,36			

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

Mendes et al. (2012), em um estudo sobre o comportamento de híbridos de milho inoculados com fungos causadores do complexo grãos ardidos relataram que nos tratamentos inoculados com *S. maydis* não houve diferenças significativas entre os híbridos inoculados. Porém, houve diferença significativa para a inoculação com *S. macrospora*, sendo os híbridos DKB 390, P30F53, DKB 199, 2 A 525 e NB 7215 os que obtiveram a maior produtividade de grãos.

Dentre os híbridos utilizados no experimento, existem aqueles considerados como resistentes e também suscetíveis, de acordo com as empresas produtoras de sementes. Com base nesse resultado, pode-se inferir que o nível de susceptibilidade ou resistência a patógenos pode variar, não afetando diretamente a produção final de grãos.

4.1.3 Teste de Frio

- Sementes suscetíveis à *Stenocarpella* sp.

Para o teste de frio sem solo pode-se observar efeito significativo para o fator tratamentos isoladamente (Figura 2).

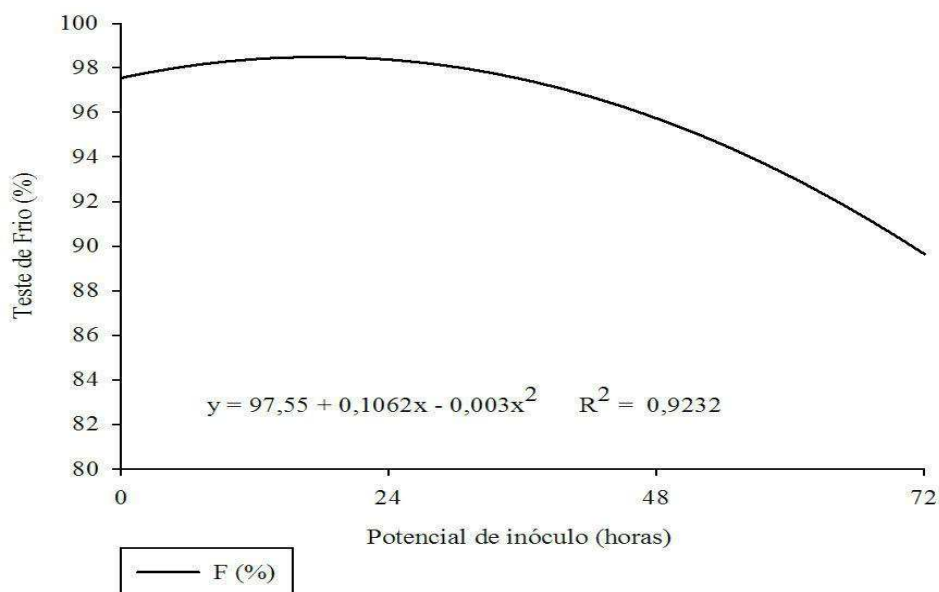


Figura 2 Porcentagem de plântulas normais de sementes de milho suscetíveis ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas a diferentes potenciais de inóculo, obtidas no teste de frio. Lavras, MG, 2014

À medida que se aumenta o potencial de inóculo, ocorre queda na porcentagem de germinação das sementes submetidas ao teste de frio, sendo as médias observadas no resultado do teste de frio de 95,65% para o potencial de inóculo de 48 horas, e 89,45% para o maior potencial, o de 72 horas. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Carvalho et al. (2004), estudando o controle de *S. maydis* relacionado ao tamanho de sementes de milho e doses de fungicidas, verificaram que sementes com maior incidência de *S. maydis* resultaram uma baixa germinação no teste de frio.

Nas sementes submetidas ao potencial de inóculo de 24 horas foi observada uma tendência de aumento no percentual de germinação no teste de frio em comparação com as sementes que não tiveram nenhum contato com o micélio fúngico.

O teste de frio é usado para avaliar o vigor das sementes submetidas a baixas temperaturas e altas umidades, e quando associado à presença de patógenos, o teste de vigor pode ser ainda mais sensível para identificar diferenças sutis no potencial fisiológico das sementes (RAMOS et al., 2014). Isso é uma condição desfavorável para a germinação de sementes de milho (baixa temperatura e alta umidade), porém, pode oferecer boas condições para o desenvolvimento de alguns patógenos. Nerbass, Casa e Angelo (2008) estudando a sanidade de sementes de milho no estado de Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, estados onde as temperaturas normalmente são amenas, observaram alta incidência de *S. maydis* nos lotes avaliados.

O micélio fúngico possui alta umidade, o que pode provocar a absorção de água pela semente quando exposta diretamente sob o micélio, causando o efeito de *priming*. É possível observar a influência do condicionamento osmótico em relação ao aumento dos tempos de exposição, esse efeito foi negativo a partir de 24 horas de exposição ao potencial de inóculo. O condicionamento osmótico, ou "*priming*" é utilizado para aumentar a velocidade e a uniformidade da

germinação de sementes, mas essa técnica pode ser afetada por fatores como temperatura, luz, secagem, disponibilidade de oxigênio e contaminação microbiana (ROVIERI et al., 1999). Assim, pode-se inferir que houve o efeito *priming* para as sementes suscetíveis expostas ao potencial de inóculo de 24 horas, fazendo com que estas germinassem mais rapidamente, porém esse efeito foi anulado a partir da exposição das sementes aos maiores potenciais de inóculo, levando a inferência de que o patógeno a partir de 24 horas de exposição, pode influenciar na qualidade das sementes.

- **Sementes tolerantes à *Stenocarpella* sp.**

Com relação as sementes tolerantes à *Stenocarpella* sp. não houve efeito significativo para nenhum dos fatores, (Tabela 11). Sendo a média geral de sementes germinadas no teste de frio para *S. maydis* de 99,3% e para *S. macrospora* de 99,1%.

Tabela 11 Valores médios de germinação no teste de frio (F%), de sementes de milho tolerantes inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fungos	Teste de frio			
	Potencial de inóculo (horas)			
	0	24	48	72
<i>S. macrospora</i>	100 a	99,5 a	99,5 a	98,5 a
<i>S. maydis</i>	98,75 a	98,5 a	99,5 a	99,5 a
CV%	0,94			

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

4.1.4 Emergência de plântulas

- **Sementes suscetíveis à *Stenocarpella* sp.**

Para o fator fungo, não houve diferença significativa, sendo as médias de plântulas emergidas para as sementes inoculadas com *S. maydis* de 97,87 %, e para as sementes inoculadas com o isolado de *S. macrospora* de 97,12 %.

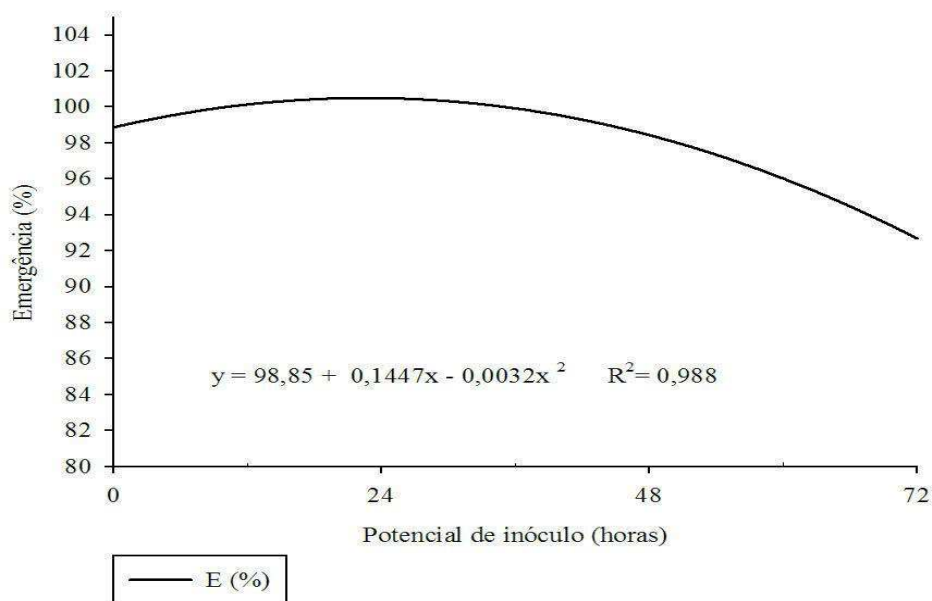


Figura 3 Porcentagem de emergência de plântulas de sementes de milho suscetíveis ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas a diferentes potenciais de inóculo. Lavras, MG, 2014

Observa-se pelo gráfico de regressão (Figura 3), para os tratamentos, que à medida que se aumenta o potencial de inóculo, ocorre queda na porcentagem de emergência de plântulas das sementes suscetíveis ao gênero fúngico *Stenocarpella* sp., sendo as médias observadas no resultado do teste de emergência para as sementes sem inoculação de 99%, para as sementes submetidas ao potencial de inóculo de 24 horas 100%, e para as sementes submetidas aos potenciais de inóculo de 48 e 72 horas as médias foram de 98,75 e 92,25 % respectivamente. O que indica, como nos testes de germinação e no teste

de frio que a presença desse fungo em sementes de milho pode causar danos dependendo do tempo de exposição e do nível de infecção alcançado.

A presença do patógeno nas sementes de genótipo suscetível ao fungo retardou a emergência das plântulas, fato prejudicial no desenvolvimento e estabelecimento do estande inicial da cultura. Costa Neto et al. (2012), estudando a influência de métodos de inoculação de *S. maydis* em híbridos e na qualidade de sementes de milho, observaram que no teste de emergência em bandeja os híbridos que receberam o método de inoculação por meio de injeção na bainha da espiga foram os que apresentaram o pior desempenho no teste.

No teste de emergência, foi possível observar um aumento de plântulas emergidas, no potencial de inóculo de 24 horas. Esse fato pode ser explicado pelo efeito *priming*, também observado para o mesmo potencial de inóculo no teste de frio descrito anteriormente.

- **Sementes tolerantes à *Stenocarpella* sp.**

Não houve efeito significativo para nenhum dos fatores analisados no teste de emergência de plântulas, (Tabela 12).

Tabela 12 Valores médios de emergência de plântulas de sementes de milho tolerantes e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fungos	Emergência			
	Potencial de inóculo (horas)			
	0	24	48	72
<i>S. macrospora</i>	99 a	100 a	99,5 a	99,5 a
<i>S. maydis</i>	98,5 a	100 a	100 a	100 a
CV (%)	1, 10			

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

O resultado do teste de médias permite afirmar que a inoculação com ambos os isolados de *Stenocarpella* sp. em diferentes potenciais de incólulo, não afetou as sementes tolerantes ao fungo. Esse resultado pode ser devido ao nível de tolerância das sementes, e que os tempos de exposição ao fungo foram insuficientes para uma infecção que causasse danos severos.

Wiser, Kramer e Ullstrup (1960), estudando a resistência à doença, relataram que não existe germoplasma com resistência completa à *Stenocarpella* sp., e que existe variabilidade genética para essa resistência, o que sugere que através de programas de melhoramento específicos possa-se conseguir híbridos resistentes à podridão branca da espiga.

Mario, Reis e Bonato (2003), em um estudo mais recente testaram diferentes híbridos de milho à podridão branca da espiga, e relataram que na identificação de materiais resistentes, se sugere utilizar métodos artificiais de inoculação, visando aumentar a pressão de seleção e confiabilidade nos resultados.

4.1.5 Índice de velocidade de emergência (IVE)

- **Sementes suscetíveis à *Stenocarpella* sp.**

Mesmo com suscetibilidade ao fungo, o potencial de inóculo utilizado pode não ter sido suficiente para afetar o desempenho das sementes de milho com relação à velocidade de emergência de plântulas (Tabela 13).

Tabela 13 Valores médios do índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes suscetíveis e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fungos	IVE			
	Potencial de inóculo (horas)			
	0	24	48	72
<i>S. macrospora</i>	43,40 a	43,87 a	43,45 a	42,18 a
<i>S. maydis</i>	43,48 a	43,85 a	43,05 a	41,38 a
CV (%)	4,9			

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

Não houve diferença significativa entre as médias em nenhum fator estudado para os resultados do índice de velocidade de emergência em sementes do genótipo suscetível ao fungo.

- **Sementes tolerantes à *Stenocarpella* sp.**

Para sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* sob diferentes potenciais de inóculo, houve efeito significativo para os tratamentos (Figura 4), e para as espécies fúngicas separadamente, sendo as médias obtidas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para as sementes inoculadas com *S. maydis* de 45,58, e para *S. macrospora* de 44,5, portanto, as plântulas provenientes de sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis* levaram maior tempo para emergir do substrato. Pinto (1998) caracterizou *S. maydis* como um fungo altamente agressivo no estágio de germinação, podendo ocasionar a morte do embrião e o tombamento de plântulas, o que pode explicar o comportamento do material tolerante no teste de emergência sob inoculação dessa espécie.

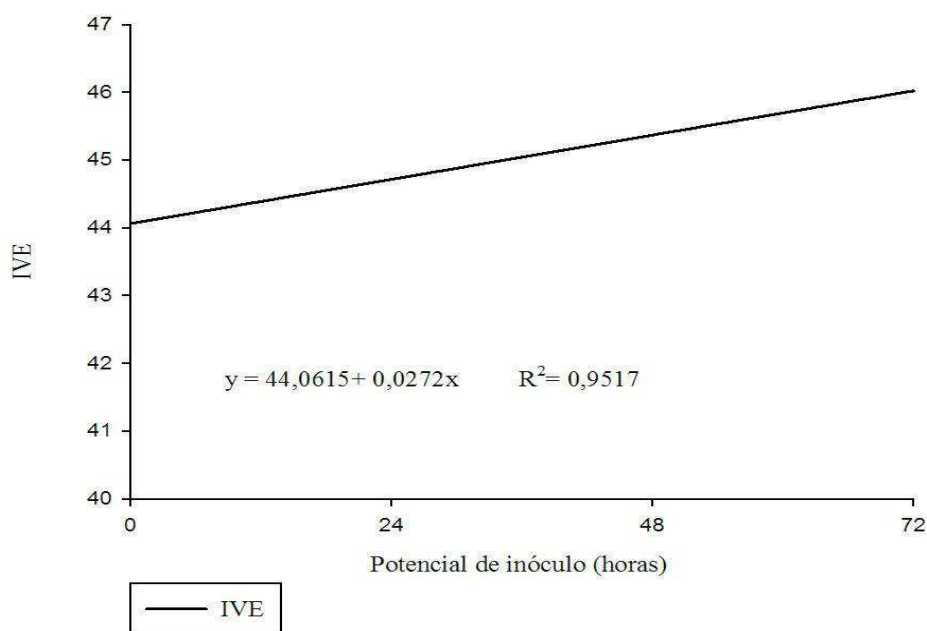


Figura 4 Índice de velocidade de emergência de plântulas de sementes de milho tolerantes ao fungo *Stenocarpella* sp. submetidas a diferentes potenciais de inóculo. Lavras, MG, 2014

O comportamento das sementes tolerantes submetidas aos diferentes potenciais de inóculo para os resultados do índice de velocidade de emergência seguiu uma tendência linear. Quanto maior o tempo de exposição ao fungo maior foi o índice de velocidade de emergência, ou seja, as plântulas levaram mais tempo para emergir.

O nível de tolerância do material é controlado por fatores genéticos, o que pode ter contribuído para que o efeito tanto dos tratamentos quanto das espécies de *Stenocarpella* sp. inoculadas fosse significativos quando avaliados pelo do índice de velocidade de emergência.

4.1.6 Sanidade de sementes

- **Sementes suscetíveis à *Stenocarpella* sp.**

Para os resultados do teste de sanidade (Blotter test) na primeira leitura, feita com sete dias, das sementes suscetíveis e inoculadas com as duas espécies fúngicas estudadas, observa-se efeito significativo tanto para os tratamentos (Figura 5) quanto para fungos, isoladamente, sendo que as médias sem transformação dos dados de ocorrência foram de 2% para *S. maydis* e 0,625% para *S. macrospora*, resultados semelhantes aos obtidos por Siqueira et al. (2014), que afirmam que *S. maydis* possui maior capacidade para infectar sementes de milho.

O gênero *Stenocarpella* sp. leva um maior tempo para desenvolver estruturas típicas para a detecção nas sementes, nesse caso, as sementes mesmo inoculadas com as duas espécies separadamente e submetidas aos diferentes potenciais de inóculo, na leitura de sete dias não apresentaram grande quantidade do fungo, porém houve uma sutil diferença, sendo a espécie *S. maydis* detectada em maior quantidade.

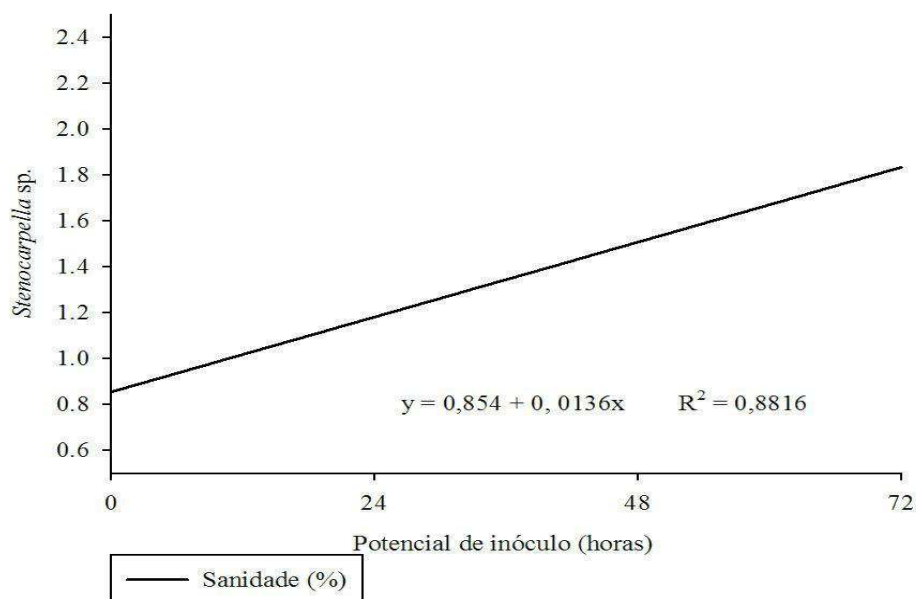


Figura 5 Ocorrência de *Stenocarpella* sp. na primeira leitura do Blotter test, em sementes suscetíveis ao fungo, submetidas a diferentes potenciais de inóculo. Lavras, MG, 2014

Observa-se de acordo com a análise de regressão uma tendência linear, em que à medida que se aumenta o potencial de inóculo, aumenta-se também a incidência de *Stenocarpella* sp.

- **Outros fungos**

Na Tabela 14 e 15 pode-se observar os resultados da ocorrência de outros patógenos em sementes de milho suscetíveis e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* submetidas a diferentes potenciais de inóculo.

Tabela 14 Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, suscetíveis, inoculadas com o fungo *S. macrospora*, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fungos (%)	Potencial de inóculo de <i>S. macrospora</i> (horas)			
	0	24	48	72
<i>Fusarium</i> sp.	65	78	82	53
<i>Penicillium</i> sp.	23	6	2	4
<i>Aspergillus</i> sp.	5	3	6	26
<i>Rhizopus</i> sp.	1	0	1	1
<i>Nigrospora</i> sp.	0,5	0	0,5	0
<i>Colletotrichum</i> sp.	0,5	0	0	0,5
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0,5	0	0

Tabela 15 Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, suscetíveis e inoculadas com o fungo *S. maydis*, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fungos (%)	Potencial de inóculo de <i>S. maydis</i> (horas)			
	0	24	48	72
<i>Fusarium</i> sp.	59	56	77	82
<i>Penicillium</i> sp.	5	3	7	8
<i>Aspergillus</i> sp.	10	2	18	14
<i>Rhizopus</i> sp.	0	0	2	0
<i>Nigrospora</i> sp.	0,5	0	0	0
<i>Colletotrichum</i> sp.	0	0	0	0,5
<i>Thichoderma</i> sp.	0,5	0	0,5	0,5
<i>Dreschlera</i> sp.	0,5	0	0	0

No teste de sanidade (“Blotter test”) foram feitas leituras para outros fungos aos sete dias. Observa-se um alto percentual de *Fusarium* sp. nas sementes suscetíveis inoculadas com *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora*, esse fato dificultou a detecção de *Stenocarpella* sp., pois seu desenvolvimento é lento, e o fungo *Fusarium* sp. tem crescimento mais rápido tomando as sementes primeiro, não dando espaço para o desenvolvimento de *Stenocarpella* sp. No entanto, foi possível detectar a presença do fungo inoculado aos quatorze dias, nas sementes que apresentavam as estruturas características mesmo que em pouca quantidade. Nerbass, Casa e Angelo (2008), analisando a sanidade de sementes de milho comercializadas em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, também verificaram as maiores incidências no teste de sanidade para os fungos *F. verticillioides*, *Penicillium spp.* e *A. flavus*.

- **Sementes tolerantes à *Stenocarpella* sp.**

Não foi observada ocorrência do patógeno em nenhuma semente na primeira leitura do “*Blotter test*” realizada aos sete dias.

No Brasil, poucos são os relatos sobre a resistência genética de híbridos comerciais às espécies de *Stenocarpella*. Mario e Prestes (1997), avaliando 196 genótipos de milho, encontraram 37% resistentes à mancha foliar de Diplodia. Analisando a incidência de *S. maydis* e *S. macrospora* em sementes de seis híbridos, Mario, Reis e Bonato (2003) constataram diferenças significativas entre esses híbridos quanto ao seu nível de resistência às duas espécies, questionando a possibilidade de que a resistência a *S. macrospora* e a *S. maydis* tenham controles genéticos distintos.

4.1.6.1 Incidência (aos quatorze dias) e intensidade de *Stenocarpella* sp.

- **Sementes suscetíveis à *Stenocarpella* sp.**

Aos quatorze dias foi feita a segunda leitura do “*Blotter test*”, e de acordo com a análise de variância para a incidência e intensidade da doença, (Tabela 8) observa-se efeito significativo para o fator tratamento, isoladamente (Figura 6, 7). Para o fator fungos de acordo com o teste de médias para os dados não transformados, as sementes inoculadas com *S. maydis* obtiveram 0,53% e *S. macrospora*, 0,81%, de intensidade da doença. Já para incidência, as médias foram de 2%, e 2,93% para *S. maydis* e *S. macrospora* respectivamente.

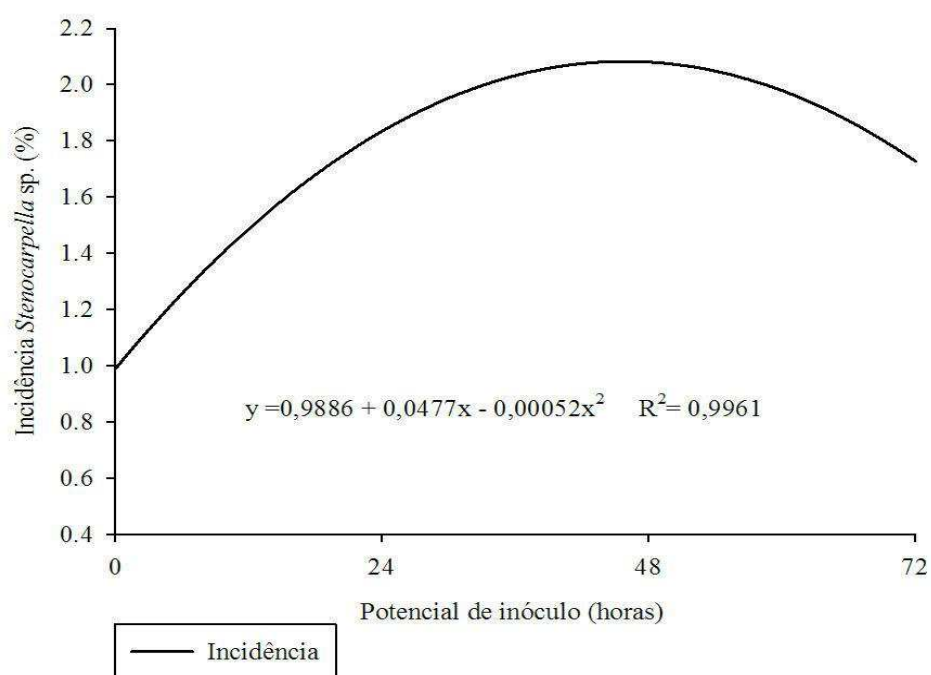


Figura 6 Incidência de *Stenocarpella* sp. na leitura de quatorze dias do “*Blotter test*” de sementes suscetíveis, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

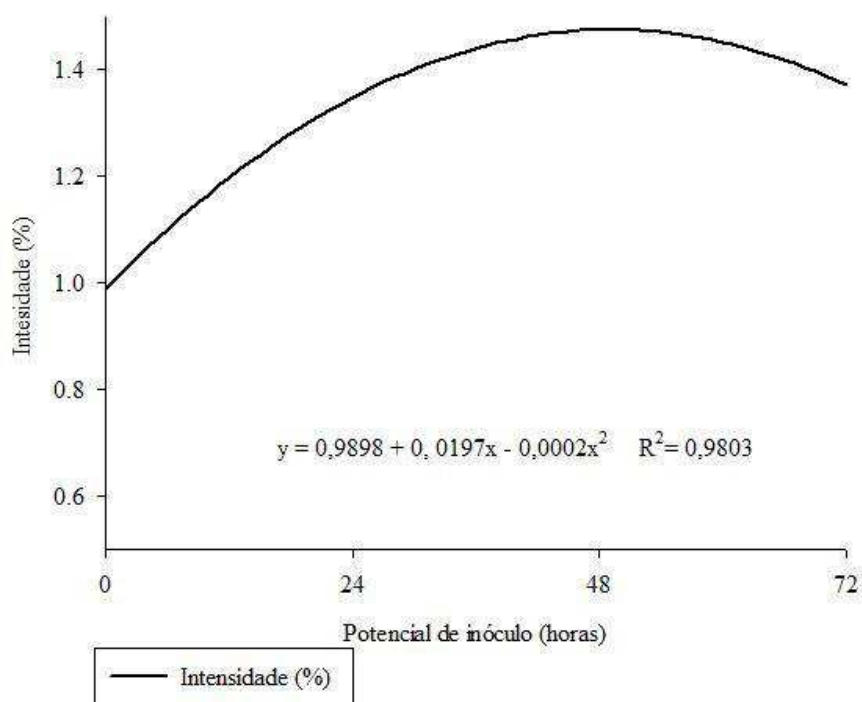


Figura 7 Porcentagem de intensidade da doença em sementes de milho suscetíveis submetidas a diferentes potenciais de inóculo com o fungo *Stenocarpella* sp.

- **Sementes tolerantes à *Stenocarpella* sp.**

Para as sementes do genótipo tolerante, observa-se efeito significativo para a interação ente os tratamentos x fungos, tanto para incidência (Tabela 16; Figura 8) quanto para intensidade da doença, (Tabela 17; Figura 9).

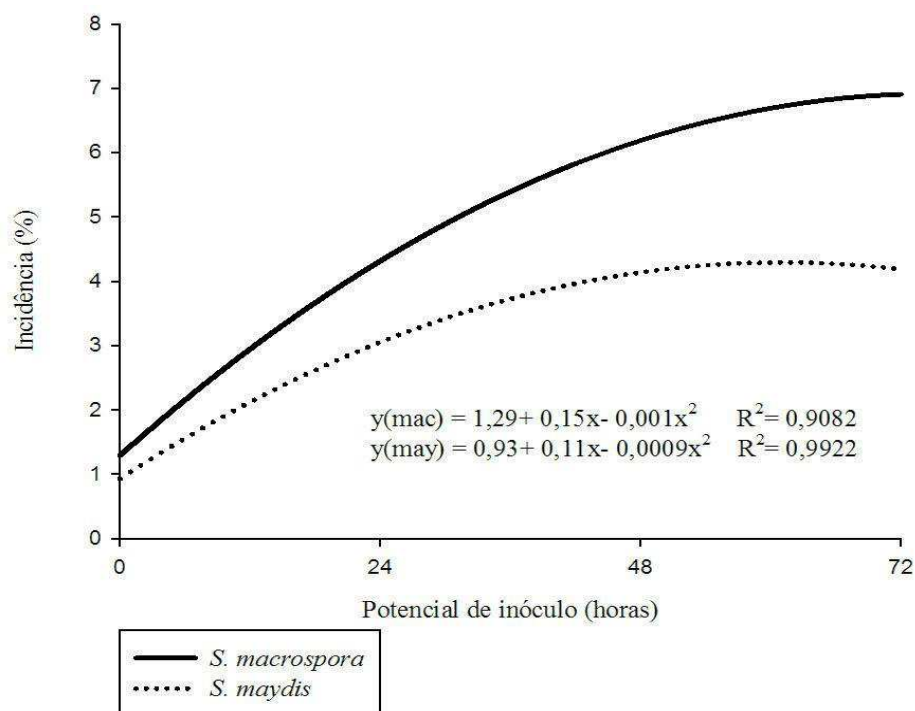


Figura 8 Porcentagem de incidência de *Stenocarpella* sp. em sementes tolerantes de milho, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Tabela 16 Incidência de *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* em sementes tolerantes de milho no Blotter test na leitura aos quatorze dias, (dados sem transformação)

Fungos	Incidência (%)			
	Potencial de inóculo (horas)			
	0	24	48	72
<i>S. macrospora</i>	0 a	26,5 a	26,5 a	46 a
<i>S. maydis</i>	0 a	8,5 b	19,5 a	18,5 b
CV (%)	38,02			

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

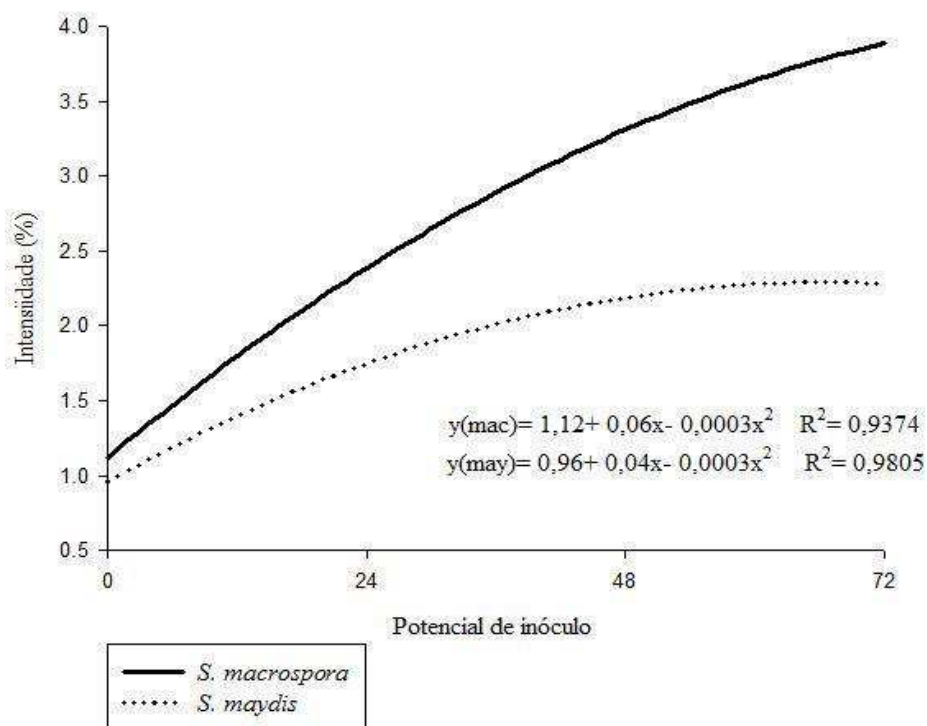


Figura 9 Intensidade da doença em sementes tolerantes de milho submetidas a diferentes potenciais de inóculo, inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*

Tabela 17 Intensidade da doença em sementes de milho suscetíveis, inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* submetidas a diferentes potenciais de inóculo, (dados sem transformação)

Fungos	Intensidade (%)			
	Potencial de inóculo (horas)			
	0	24	48	72
<i>S. macrospora</i>	0 a	7 a	8,25 a	15,5 a
<i>S. maydis</i>	0 a	2,12 b	5 b	4,87 b
CV (%)	44,26			

*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, a espécie *S. macrospora* foi detectada em maior porcentagem tanto para incidência, quanto para severidade da doença nas sementes tolerantes inoculadas e submetidas a diferentes potenciais de inóculo.

- **Outros fungos**

Nas tabelas 18 e 19 observa-se os resultados da ocorrência de outros patógenos em sementes de milho tolerantes e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* submetidas a diferentes potenciais de inóculo.

Tabela 18 Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, tolerantes e inoculadas com o fungo *S. macrospora*, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fungos (%)	Potencial de inóculo de <i>S. macrospora</i> (horas)			
	0	24	48	72
<i>Fusarium</i> sp.	1	18	27	34
<i>Penicillium</i> sp.	6	6	12	60
<i>Aspergillus</i>	0,5	4	1	0,5
<i>Trichoderma</i>	0	0	0	0,5

Tabela 19 Ocorrência de outros fungos (%) em sementes de milho, tolerantes e inoculadas com o fungo *S. maydis*, submetidas a diferentes potenciais de inóculo

Fungos (%)	Potencial de inóculo de <i>S. maydis</i> (horas)			
	0	24	48	72
<i>Fusarium</i> sp.	4	6	13	55
<i>Penicillium</i> sp.	9	9	27	13
<i>Aspergillus</i>	1	0	0,5	0,5
<i>Nigrospora</i>	0	0	0	0,5
<i>Trichoderma</i>	0	0	0	0,5

Para as porcentagens de outros fungos, na leitura de sete dias do *Blotter test*, pode-se observar maiores valores para *Fusarium* sp., *Penicillium* sp, e *Aspergillus* sp. Ramos et al. (2010), realizaram um levantamento da microflora presente em grãos ardidos e em sementes de milho, e constatou que dentre os patógenos principais, *Fusarium* spp. e *Penicillium* sp. foram os gêneros encontrados em maior incidência, tanto nos grãos como nas sementes nas safras estudadas.

4.2 Atividade isoenzimática

Em relação ao perfil isoenzimático de sementes suscetíveis e tolerantes inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* e submetidas a diferentes potenciais de inóculo, e dos isolados específicos, (Figura 10), foi observado que nas sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis*, houve uma atividade crescente de esterase de acordo com o aumento do potencial de inóculo a que as sementes foram submetidas (1). Como a esterase (EST) está diretamente ligada à constituição de membranas celulares, podemos relacionar esse resultado com o ataque do patógeno afetando a membrana de acordo com o potencial de inóculo, sendo que nos potenciais de 48 e 72 horas houve uma maior atividade dessa enzima. Para os demais materiais, observa-se uma atividade constante de esterase.

Para os isolados fúngicos, observa-se uma isoforma que pode ser característica do gênero *Stenocarpella* sp. (2). Essa mesma isoforma está presente na maioria dos materiais inoculados em diferentes intensidades, muito evidenciada no potencial de 72 horas em sementes suscetíveis inoculadas com *S. maydis*.

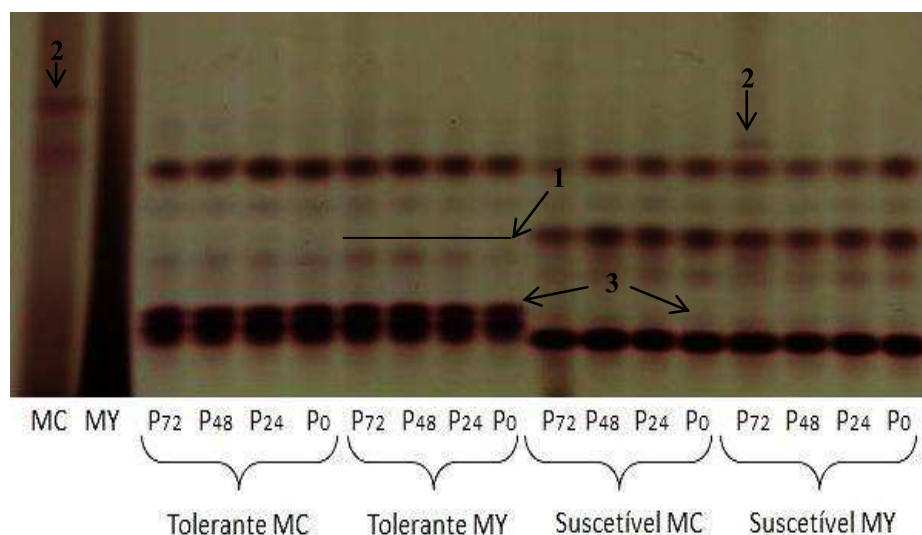


Figura 10 Atividade da enzima esterase (EST) em sementes de milho suscetíveis e tolerantes inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* e submetidas a diferentes potenciais de inóculo

A adoção de marcadores isoenzimáticos no diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados obtidos, (TEIXEIRA; VIEIRA; MACHADO, 2004). Esses autores conseguiram separar isolados de *Acremonium strictum* de *Fusarium verticillioides*, através dessa técnica, fungos que apresentam similaridades morfológicas.

Pode-se observar que pela atividade da enzima esterase é possível separar os isolados de *S. maydis* e *S. macrospora*, porém não é possível separá-los nas sementes inoculadas com cada um separadamente. Dorrance, Miller e Warren (1999), estudando polimorfismo isoenzimático e variabilidade cultural de isolados de *S. maydis* coletados nos EUA e na África do Sul, concluíram que um baixo nível de polimorfismo

isoenzimático foi detectado nessa coleção de isolados, sendo encontrado apenas por esterase, hexose quinase, e malato desidrogenase. A cor das colônias e produção picnídios foram variáveis ao longo de vários experimentos, indicando que esses fenótipos são marcadores genéticos variáveis. Evidenciando a dificuldade de diferenciação e estabelecimento de um padrão para a espécie de *S. maydis*, pois os isolados mesmo que da mesma espécie ainda possuem peculiaridades.

Carvalho, Vieira e Machado (1997), através dos perfis de esterase, fosfatase ácida e peroxidase distinguiram os isolados *C. gossypii* do *C.gossypii* var. *cephalosporioides*. Concluíram que a utilização de padrões eletroforéticos empregando marcadores bioquímicos pode ser uma ferramenta útil na diferenciação dos dois fungos.

Padrões isoenzimáticos também são usados para diferenciação de aspectos ligados à qualidade e até mesmo para diferenciação de materiais genéticos. Gomes et al. (2000), usaram esses padrões para estudar o efeito da heterose na qualidade fisiológica em sementes de milho e constataram que determinados cruzamentos produziram sementes de alta qualidade, relacionando os resultados dos testes fisiológicos com a atividade de isoenzimas. De acordo com a figura 11, observa-se a diferença no padrão da isoenzima esterase para as sementes tolerantes e suscetíveis ao fungo (3), podendo ser uma ferramenta útil na diferenciação de cultivares de milho. Nos tratamentos em que existe maior atividade dessa enzima existe também uma maior desestruturação de membranas.

4.3 Detecção de *Stenocarpella* sp. por meio da técnica de PCR

A qualidade do DNA genômico extraído das amostras foi verificada através da análise por espectrofotometria, com os valores expressos para a

razão de absorvância 260/280, dentro dos padrões de qualidade para todas as amostras, com os limites de 1,5 a 2.

De acordo com a análise em gel de agarose a 1% dos fragmentos do DNA obtidos com a amplificação em PCR dos isolados de *S. maydis* e *S. macrospora* inoculados em sementes suscetíveis e tolerantes ao complexo *Stenocarpella* sp. submetidas a diferentes potenciais de inóculo, utilizando os *primers* P1/P2, confeccionados por Xia e Achar (2001), observa-se bandas de aproximadamente 375 pares de base, sem diferenciação das espécies, como relatado por Barrocas et al. (2012).

Os *primers* P1/P2, desenhados por Xia e Achar (2001), foram testados anteriormente por Barrocas et al. (2012), que confirmaram a especificidade desse par de *primers* apenas para o gênero *Stenocarpella* sp., o diferenciando de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium graminearum*, porém, não foi observada especificidade suficiente para a diferenciação das espécies, *S. maydis* e *S. macrospora*. Nas sementes suscetíveis inoculadas com *S. maydis*, o DNA genômico foi amplificado para todos os potenciais de inóculo, já em sementes suscetíveis inoculadas com *S. macrospora*, houve amplificação para o potencial de inóculo de 48 e 72 horas.

Nas sementes tolerantes o DNA genômico foi amplificado para os potenciais de 48 e 72 horas e para sementes tolerantes inoculadas com *S. macrospora* houve amplificação para todos os potenciais (Figura 11).

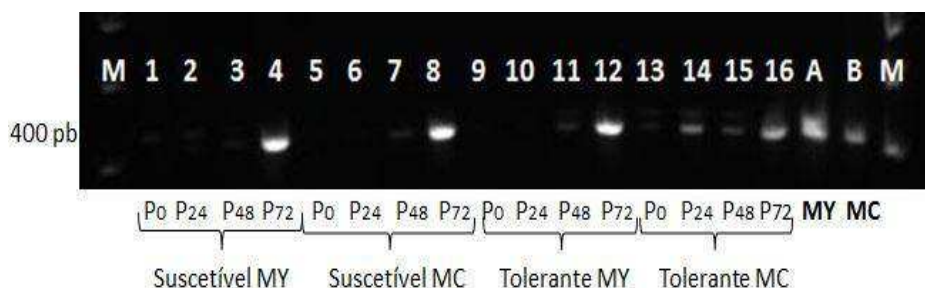


Figura 11 Amplificação do DNA genômico de sementes de milho inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* submetidas à diferentes potenciais de inóculo. Linhas 1, 2, 3, e 4 representam a amplificação do DNA de sementes suscetíveis ao fungo, inoculadas com *S. maydis*, em quatro potenciais de inóculo (0, 24, 48, e 72 horas respectivamente). Linhas 5, 6, 7 e 8, representam a amplificação do DNA de sementes suscetíveis inoculadas com *S. macrospora* nos mesmos potenciais de inóculo. Linhas 9, 10, 11, e 12, representam o DNA de sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis*, e as linhas 13, 14, 15, e 16, representam o DNA das sementes tolerantes inoculadas com *S. macrospora* sob os mesmos potenciais de inóculo descritos anteriormente. Linha M – 200 pb ladder DNA (Amersham, E.U.A). Linha A – DNA genômico do isolado de *S. maydis*. Linha B – DNA genômico do isolado de *S. macrospora*

A amplificação ocorrida nas amostras que não foram inoculadas com o fungo estudado, ou seja, nas linhas 1 e 13, que correspondem ao potencial de inóculo zero, significa que mesmo nas sementes que não foram submetidas à inoculação pode existir *Stenocarpella* sp. em níveis muito baixos, não sendo significativa essa presença nos testes fisiológicos realizados. As sementes utilizadas no estudo não foram tratadas com nenhum fungicida, passando apenas por uma desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 2%.

O aparecimento de bandas duplas não caracteriza a amplificação do material genético do fungo, sendo assim, pode ter ocorrido algum tipo de

contaminação ou até mesmo a formação de dímeros de *primers*, que ocorre quando há um excesso de *primers*, levando ao pareamento de *primers* por complementaridade de sequência na extremidade 3' (MALONE et al., 2006). É possível também que tenha ocorrido desuniformidade na inoculação, uma vez que apenas 0,4 g do material macerado foi retirado para realização da reação de PCR.

Para os potenciais de inóculo de 48 e 72 horas foi possível observar banda característica do gênero *Stenocarpella*. Barrocas et al. (2012), estudando a sensibilidade da técnica de PCR para a série de diluição, utilizando o DNA extraído de sementes inoculadas com *S. maydis*, concluíram que com até 2% de infecção todas as amostras testadas foram positivas na diagnose do fungo *Stenocarpella* sp., sendo esse valor muito variável de acordo com o fungo estudado. Existe a necessidade de novos estudos com utilização de um maior número de isolados, de forma representativa para cada uma das espécies, até o ponto de caracterizar um padrão para a construção de *primers* que possam detectar *S. maydis* e *S. macrospora* separadamente.

4.4 Espectroscopia no infravermelho próximo

Os espectros obtidos das amostras avaliadas estão representados na Figura 12. Observa-se que os espectros apresentam perfis semelhantes.

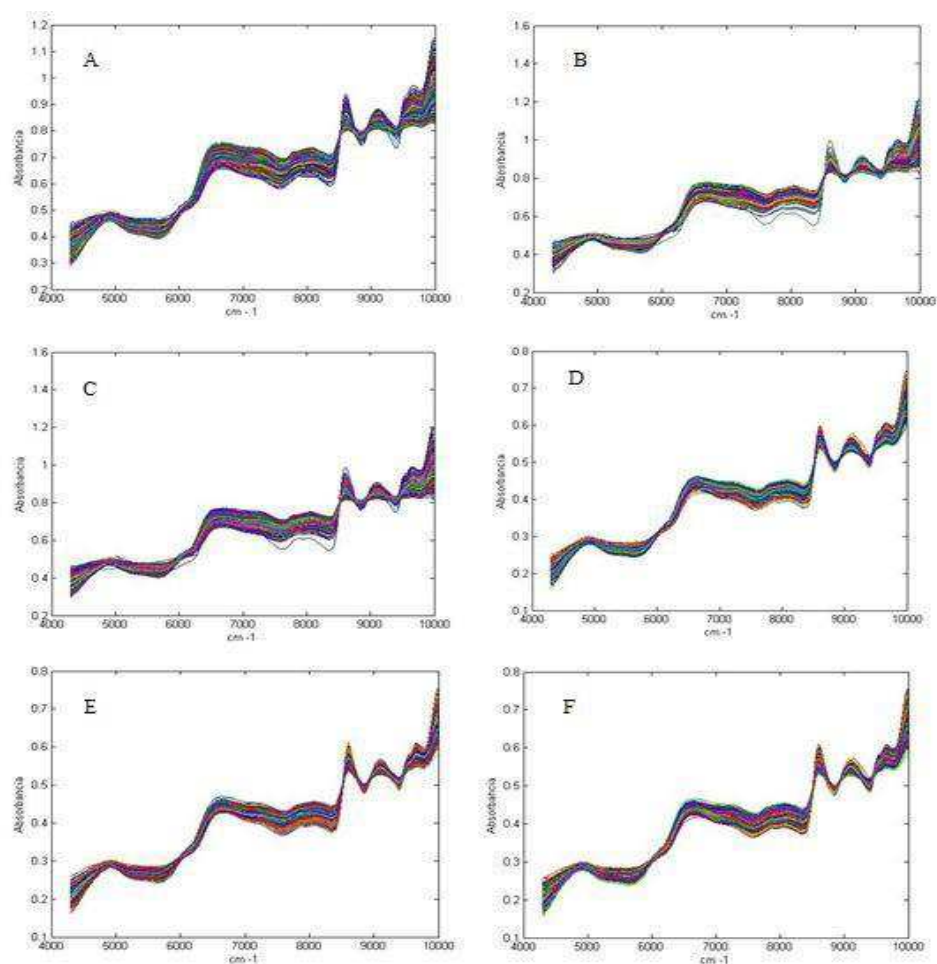


Figura 12 Representação dos espectros no infravermelho próximo obtidos de sementes de milho suscetíveis e tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* após processamento por correção multiplicativa de sinais: A – Sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. maydis*; B – Sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora*; C – Sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*; D – Sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis*; E – Sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora*; F – Sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora*.

Observa-se pela análise espectral, os espectros A, B e C, correspondentes às sementes de milho do genótipo suscetível, e D, E e F, correspondentes às sementes de milho do genótipo tolerante, elevações em aproximadamente 6.600 cm^{-1} , que corresponde ao grupo químico $(R)NH_2$, em 8.700 cm^{-1} , que corresponde a CH_2 e CH_3 , e em 9.750 cm^{-1} , correspondente ao grupo químico RNH_2 .

Estudando a composição química de sementes de milho, a média é de 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra (a maioria resíduo detergente neutro) e 4% de óleo. O amido é um polissacarídeo constituído de amilose e amilopectina, que são carboidratos complexos, já as proteínas são macromoléculas constituídas por combinações de aminoácidos, e o óleo são ésteres de ácidos graxos e glicerol (PAES, 2006). Gutkoski et al. (2009), realizaram determinações de matéria seca e dos constituintes: umidade, proteína bruta, lipídios, minerais, carboidratos e fibra a partir da utilização da curva de calibração Fartan do NIR. Os resultados das leituras realizadas foram expressos em porcentagem e em base seca, não havendo comparação com outros materiais por meio dos espectros.

- **Discriminação entre amostras de sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora***

Para a construção desse modelo foram usadas 100 sementes que não foram submetidas à inoculação, e outras 300 sementes que correspondem aos potenciais de inóculo de 24, 48 e 72 horas inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* separadamente. As amostras de 1 a 100 foram denominadas de classe 1 (sem exposição ao fungo) e as amostras de 101 a 400 foram denominadas de classe 2 (com exposição ao fungo em diferentes potenciais de inóculo). Sendo que 25% de amostras foram retiradas do modelo para o teste de validação. Os resultados da calibração e validação do modelo estão representados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20 Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração

Sementes suscetíveis com e sem inoculação de <i>S. maydis</i>	
	Acerto (%)
Calibração	92,33
Calibração (<i>y</i> - randomization)	3,66
Validação cruzada	91,66
Teste (validação externa)	93,00

O modelo utilizado para discriminação de sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* apresentou alto percentual de acerto para calibração, validação cruzada, baixo percentual de acerto para o teste de *y*-randomization, e alto percentual de acerto para o teste de validação.

A porcentagem de acerto na calibração refere-se as 400 amostras totais menos os 25% que foram retirados para teste. A porcentagem de acerto da validação cruzada refere-se ao teste em que se retira uma amostra e testa o modelo inúmeras vezes, e a calibração *y*-radomization é o teste onde se embaralha as classes e testa-se as amostras. Além dessa análise, ainda testa-se os 25% das amostras restantes para validar o modelo.

De acordo com o modelo obtido observa-se que para as amostras que foram divididas na classe 1, três foram classificadas como da classe 2. Duas amostras da classe 2 foram classificadas como pertencentes a classe 1, para validação cruzada.

Tabela 21 Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora* com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração

Sementes suscetíveis com e sem inoculação de <i>S. macrospora</i>	
	Acerto (%)
Calibração	92,25
Calibração (<i>y-randomization</i>)	3,58
Validação cruzada	91,61
Teste (validação externa)	100

O modelo utilizado para discriminação de sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora* apresentou alto percentual de acerto para calibração, validação cruzada, baixo percentual de acerto para o teste de *y-randomization*, e nenhum erro para o grupo teste.

Para o modelo construído para as sementes de milho inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora* observa-se no teste de validação cruzada que 2 amostras que teoricamente pertenciam a classe 2 (com fungo) foram classificadas na classe 1, e também 1 amostra que inicialmente foi classificada na classe 1 (sem fungo), foi classificada na classe 2. Esse tipo de erro pode ser devido à inoculação desuniforme das sementes, ou mesmo, devido à presença de outros microrganismos fitopatogênicos semelhantes quimicamente à *Stenocarpella* sp., fazendo com que ocorresse um confundimento, ou erro, na classificação dessas amostras no modelo criado.

- **Discriminação entre amostras de sementes de milho suscetíveis não inoculadas e inoculadas com *S. macrospora* e *S. maydis* visando à separação das espécies fúngicas**

Na construção do modelo para separação de sementes suscetíveis inoculadas com *S. maydis*, sementes suscetíveis inoculadas com *S. macrospora*, e

de sementes que não foram submetidas à inoculação foi estabelecida a classe 1 composta por 100 sementes que não foram submetidas a nenhum potencial de inóculo. A classe 2 para sementes suscetíveis inoculadas com *S. macrospora*, sendo esta classe compreendida pelos espectros de 100 sementes submetidas a cada potencial de inóculo (24, 48 e 72 horas), totalizando 300 sementes inoculadas com essa espécie. A mesma divisão foi feita para as sementes inoculadas com *S. maydis* formando a classe 3, sendo o modelo composto por 700 sementes. De 1 a 100, classe 1: sementes sem inoculação, de 101 a 400 sementes inoculadas com *S. maydis*, e de 401 a 700, classe 3: sementes inoculadas com *S. macrospora*. Os resultados da calibração e validação do modelo são representados na Tabela 22.

Tabela 22 Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis não inoculadas e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração

Sementes suscetíveis com e sem inoculação de <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i>	
	Acerto (%)
Calibração	82,28
Calibração (<i>y</i> -randomization)	0,28
Validação cruzada	78,66
Teste (validação externa)	90,85

O modelo utilizado para discriminação de sementes de milho suscetíveis não inoculadas e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* apresentou menor percentual de acerto para calibração, validação cruzada e baixo percentual de acerto para o teste de *y*-randomization, em relação aos modelos criados para cada espécie separadamente. Isso mostra que as duas espécies fúngicas têm alguma semelhança em si, sendo a separação por espectros no infravermelho passível de maiores erros quando as amostras das duas espécies fúngicas são analisadas em um mesmo modelo.

De acordo com o resultado observa-se um confundimento entre as classes pré-estabelecidas para o modelo de separação das duas espécies fúngicas. Com 5 amostras classificadas erroneamente como classe 1, 6 amostras classificadas erroneamente na classe 2, e 6 amostras também classificadas erroneamente na classe 3, para o teste de validação cruzada.

- **Discriminação entre amostras de sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora***

Para a construção desse modelo, utilizou-se a mesma metodologia anterior, sendo que as sementes de milho são tolerantes ao fungo estudado. Foram estabelecidas as classes 1, sem fungo e 2 para os potenciais de inóculo a que as sementes tolerantes foram submetidas (24, 48 e 72 horas), totalizando, 100 sementes para classe 1, e 300 sementes para classe 2. Os resultados da calibração e validação do modelo são representados nas Tabelas 23 e 24.

Tabela 23 Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração

Sementes tolerantes com e sem inoculação de <i>S. maydis</i>	
	<u>Acerto (%)</u>
Calibração	99,66
Calibração (<i>y</i> - randomization)	4,5
Validação cruzada	99,33
Teste (validação externa)	100

O modelo utilizado para discriminação de sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. maydis* apresentou alto percentual de acerto para calibração, alto percentual de acerto para validação cruzada, percentual de

acerto relativamente alto para o teste de *y-randomization*, e nenhum erro para o grupo de 25% de amostras teste.

O modelo estabelecido para sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis* foi capaz de separar as sementes sem inoculação das inoculadas de acordo com as classes pré-estabelecidas sem nenhum erro para validação cruzada.

Tabela 24 Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho suscetíveis inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora* com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração

Sementes tolerantes com e sem inoculação de <i>S. macrospora</i>	
	<u>Acerto (%)</u>
Calibração	99,33
Calibração (<i>y-randomization</i>)	9,63
Validação cruzada	99,33
Teste (validação externa)	99

O modelo utilizado para discriminação de sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *S. macrospora* também apresentou alto percentual de acerto para calibração e validação cruzada. O percentual de acerto para o teste de *y-randomization* foi maior em relação ao modelo criado para *S. maydis*, e para o teste apresentou percentual de acerto menor que o modelo anterior.

Observa-se na representação do modelo estabelecido para sementes tolerantes inoculadas com *S. macrospora* para validação cruzada, que foi possível separar as sementes sem inoculação das inoculadas de acordo com as classes pré-estabelecidas sem nenhum erro para o teste de validação cruzada.

- **Discriminação entre amostras de sementes de milho tolerantes não inoculadas e inoculadas com *S. macrospora* e *S. maydis* visando à separação das espécies fúngicas**

Para construção do modelo para separação de sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis*, sementes tolerantes inoculadas com *S. macrospora*, e de sementes que não foram submetidas à inoculação, foi estabelecida a classe 1 composta por 100 sementes que não foram submetidas a nenhum potencial de inóculo. A classe 2 para sementes suscetíveis inoculadas com *S. macrospora*, sendo esta classe compreendida pelos espectros de 100 sementes submetidas a cada potencial de inóculo (24, 48 e 72 horas), totalizando 300 sementes inoculadas com essa espécie. A mesma divisão foi feita para as sementes inoculadas com *S. maydis* formando a classe 3, sendo o modelo composto por 700 sementes. De 1 a 100, classe 1: sementes sem inoculação, de 101 a 400 sementes inoculadas com *S. maydis*, e de 401 a 700, classe 3: sementes inoculadas com *S. macrospora*. Os resultados da calibração e validação do modelo são representados na Tabela 25.

Tabela 25 Parâmetros de desempenho do modelo PLS-DA para sementes de milho tolerantes não inoculadas e inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* com 15 variáveis latentes para validação cruzada e 9 variáveis latentes para calibração

Sementes tolerantes com e sem inoculação de <i>S. maydis</i> e <i>S. macrospora</i>	
	<u>Acerto (%)</u>
Calibração	93,71
Calibração (<i>y</i> - randomization)	0,20
Validação cruzada	92,38
Teste (validação externa)	90,85

O modelo utilizado para discriminação de sementes de milho tolerantes inoculadas e não inoculadas com *Stenocarpella sp.* visando à separação das espécies fúngicas de *S. maydis* e *S. macrospora* apresentou alto percentual de acerto para calibração e validação cruzada, sendo o percentual de acerto para o teste de *y*-randomization foi mais baixo em relação aos modelos criados para

cada espécie separadamente. A porcentagem de acertos para o grupo de amostras teste foi a menor dentro dos modelos construídos para esse genótipo.

O modelo estabelecido para sementes tolerantes inoculadas com *S. maydis* e *S. macrospora* foi capaz de separar as sementes sem inoculação das inoculadas com as duas espécies fúngicas de acordo com as classes pré-estabelecidas com 1 amostra errada para o teste de validação cruzada.

5 CONCLUSÕES

Com o aumento do potencial de inóculo houve ligeiro decréscimo na qualidade fisiológica das sementes inoculadas com os isolados fúngicos.

A inoculação de sementes de milho suscetíveis e tolerantes com isolados de *S. maydis* e *S. macrospora* foi eficiente para a detecção do fungo por meio da técnica de PCR e por meio do “*Blotter test*”.

A avaliação da isoenzima esterase pode auxiliar na diferenciação de isolados de *Stenocarpella* sp., e de cultivares de milho.

A técnica de espectroscopia no infravermelho próximo com modelos de calibração construídos pelo método de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA) é promissora para a detecção de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em sementes suscetíveis e tolerantes de milho inoculadas com esses fungos.

REFERÊNCIAS

ABDI, H. Partial Least Squares (PLS) regression. In: LEWIS-BECK M.; BRYMAN, A.; FUTING T. **Encyclopedia of social sciences research methods**. Thousand Oaks: [s. n], 2003.

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242 p.

ALMEIDA, P. B.; ARRIEL, N. H. C.; MEDEIROS, S. M. V. Utilização da espectroscopia nir para predição de ácidos graxos em sementes intactas de gergelim. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., / SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 2., / FÓRUM CAPIXABA DE PINHÃO MANSO, 1., 2012, Guarapari. **Anais...** Guarapari: [s. n.], 2012. 1 CD ROM.

AMARAL, E. A. S. et al. Alterações dos padrões de isoenzimas em sementes de milho infectadas por fungos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1725-1732, set. 2000.

AMORIM, H. V. **Manual de métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 1996. 230 p.

BALL, D. W. **The basics of spectroscopy**. Washington: Spie, 2001.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, 2009b. 202 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para Análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009a. 398 p.

BRUNELLI, K. R. et al. Germinação e penetração *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 187-190, 2005.

CARVALHO, D.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Uso de isoenzimas para diferenciação *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* isolados de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 315-319, 1997.

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

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

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 427-439, 2006.

CHERRY, J. P. Protein degradation during seed deterioration. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 2, p. 317-321, 1983.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento safra brasileira de grãos: safra 2014/2015: segundo levantamento**. Brasília, 2014. v. 1, n. 2, p. 1-66.

COSTA NETO, J. **Influência de métodos de inoculação de *Stenocarpella maydis* em híbridos e na qualidade de sementes de milho**. 2012. 106 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

COUTINHO, W. M. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 458-464, 2007.

DECKER, M.; NIELSEN, P.V.; MARTENS, H. Near-infrared spectra of *Penicillium camembarti* strains separated by extend multiplicative signal correction improved prediction of physical and chemical variations. **Applied Spectroscopy**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 56-68, Feb. 2005.

DORRANCE, A. E.; MILLER, O. K.; WARREN, H. L. Comparison of *Stenocarpella maydis* isolates for isozyme and cultural characteristics. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 675-680, 1999.

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

FREITAS, M. A. **Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho**. 2006. 164 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

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

GRUNVALD, A. K. et al. Predicting the oil contents in sunflower genotype seeds using nearinfrared reflectance (NIR) spectroscopy. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 233-237, Apr./June 2014.

GUTKOSKI, L. C. et al. Avaliação da composição química de milho seco e armazenado em silo tipo alambrado com ar natural forçado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 879-885, out./dez. 2009.

HART, J. R.; NORRIS, K. H.; GOLUMBIC, C. Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanol extracts. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 39, p. 94-99, 1962.

HELM, D. et al. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 1, p. 69-79, 1991.

LANE, D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, Oct. 1985.

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

LORBER, A.; KOWALSKI, B.R. Estimation of prediction error for multivariate calibration. **Journal of Chemometrics**, Chichester, v. 2, p. 93-109, 1988.

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

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

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

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.

MALONE, G. et al. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 7-13, 2006.

MARIO, J. L.; PRESTES, A. M. Avaliação da resistência à mancha foliar causada por *Diplodia macrospora* em genótipos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 280, 1997.

MARIO, J. L.; REIS, E. M.; BONATO, E. R. Reação de híbridos de milho inoculados, em espigas, com *Diplodia maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 155-158, 2003.

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

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

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

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

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n.1, p. 131-136, 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**, Pelotas, v. 26, n. 2, p. 144-149, 2004.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Sanidade de sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/07 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 7, n. 1, p. 30-36, 2008.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

PADILHA, L. et al. Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, p.198-204, 2001.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica, 75).

PINTO, N. F. J. A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 134-138, 2004.

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

RAMOS, A. T. M. et al. Levantamento da micoflora presente em grãos ardidos e sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 36, n. 3, p. 257-259, 2010.

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.

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.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SANTOS, G. A.; PEREIRA, A. B.; KORNDÖRFER, G. H. Uso do Sistema de Análises por Infravermelho Próximo (NIR) para análises de matéria orgânica e fração argila em solos e teores foliares de silício e nitrogênio em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 100-108, jan./fev. 2010.

SIQUEIRA, C. S. et al. Effects of *Stenocarpella maydis* in seeds and in the initial development of corn. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 79-86, 2014.

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NEIMAN, T. A. **Princípios da análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: BOOKMAN, 2002. 836 p.

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

SZEGHALMI, A.; KAMINSKY, S.; GOUGH, K. M. A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, p. 1779-1789, 2007.

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.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores morfofisiológicos e isoenzimáticos na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 413-418, 2004.

TRALAMAZZA, S. M. **Validação da técnica de espectroscopia no infravermelho na taxonomia e sistemática do gênero *Aspergillus***. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

VIDIGAL, D. S. et al. Teste de condutividade elétrica para sementes de pimenta. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 168-174, 2008.

VIEIRA, M. G. G. C. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro**. 1996. 187 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

WHELEHAN, O. P. et. al. Detection of ovarian câncer using chemometric analysis of proteomic profiles. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Belin, v. 84, n. 1, p. 82-87, Feb. 2006.

WISER, W. J.; KRAMER, H. H.; ULLSTRUP, A. J. Evaluating inbred lines of corn for resistance to Diplodia ear rot. **Agronomy Journal**, Madison, v. 52, p. 624-626, 1960.

XIA, Z.; ACHAR, P. N.; J. Random Amplified Polymorphic DNA and Polymerase Chain Reaction Markers for the Differentiation of *Stenocarpella maydis* in Maize Seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 149, p. 35-44, 2001.

ZENI, D. **Determinação de cloridrato de propranolol em medicamentos por espectroscopia no infravermelho com calibração multivariada (PLS)**. 2005. 64 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.