



AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES *FUSARIUM* NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO

Jéssika Angelotti¹; Cleilton Novais da Silva²; Carolina Bertuzzi Pereira³; Dauri José Tessmann⁴

RESUMO: Várias espécies de fungos do gênero *Fusarium* estão envolvidas em podridões de raízes, colmos e espigas e morte de plântulas do milho (*Zea mays*). As espécies *F. equiseti*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides* foram encontradas em associação com podridões de espigas de milho, em amostras oriundas da região Centro Sul do Brasil. A identificação dessas espécies foi realizada com o emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, as informações sobre a patogenicidade dessas espécies em diferentes fases do desenvolvimento do milho são escassas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium* na germinação e desenvolvimento de plântulas de milho. Verificou-se que todas as espécies estudadas foram patogênicas a plântula de milho causando necroses nas raízes, porém os isolados não inibiram a germinação de sementes de milho.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos fitopatogênicos; Patógenos; *Zea mays*.

1. INTRODUÇÃO

O milho tem grande importância econômica e social para o Brasil, tanto na agricultura de subsistência como na agricultura comercial. A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação humana e animal até a indústria de alta tecnologia. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de milho, produzindo aproximadamente 6,7% da produção global, seguindo os Estados Unidos, a China e a União Europeia.

Segundo CONAB (2012), a produção brasileira na safra 2010/2011 é da ordem de 65 milhões de toneladas cultivados em 15,6 milhões de hectares, distribuídos em todo o território nacional. A produção em duas safras anuais em algumas regiões do país torna o Brasil um dos principais produtores mundiais. Essa produção intensiva de milho proporcionou o aumento de algumas doenças na cultura. Dentre as quais, destacam-se àquelas causadas por fungos do gênero *Fusarium*, não apenas pelos danos na produtividade das lavouras, mas também porque contaminam grãos com micotoxinas (REIS et al., 2004). As espécies de *Fusarium* causam morte de plântulas, podridões de

¹ Acadêmica de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica (PIC). jeangelotti@hotmail.com.

² Doutoranda do curso de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. cleilton@gmail.com.

³ Mestranda do curso de Pós- Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Carol_bertuzzi@hotmail.com.

⁴ Orientador, Professor Doutor do Curso em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná.

djtessmann@uem.br.

colmos e espigas, e contaminam os grãos com diferentes micotoxinas, com destaque para fumonisinas, tricotecenos e zearalenona (BOTALLICO, 1998).

As principais espécies de *Fusarium* patogênicas ao milho são pertencente ao grupo monofilético denominado *Gibberella fujikuroi*. Dentro deste grupo as espécies que tem sido mais estudada neste patossistema são: *F. verticillioides* (teleomorfo: *Gibberella moniliformis*), *F. proliferatum* (teleomorfo: *Gibberella intermedia*), *F. subglutinans* (teleomorfo: *Gibberella subglutinans*) (LESLIE e SUMMERELL, 2006). Porém outras espécies também podem afetar sementes, colmos e espigas, sendo que sua ocorrência é mais restrita, e conseqüentemente menos estudada (BOTALLICO, 1998).

Espécies pertencentes ao grupo *Gibberella fujikuroi* como *F. andiyazi* (Maracas, Rheeder, Lamprecht, Zeller e Leslie) e *F. equiseti* ((Corda) Saccardo) (não pertencentes ao grupo *G. fujikuroi*) tem sido encontrada associadas à podridões na espiga de milho, porém não existem informações no Brasil sobre patogenicidade das espécies nas diferentes fases de desenvolvimento do milho. Considerando que a espécies do gênero *Fusarium* causam prejuízos consideráveis e que seu controle ainda é um desafio, novos estudos devem ser realizados a fim de gerar informações sobre a virulência e interação patógeno-hospedeiro. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a patogenicidade de diferentes espécies de *Fusarium* sob a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e Identificação de espécies através de PCR: Amostras de espigas de milho com sintomas de podridão foram coletadas em lavouras de milho das principais regiões produtoras no estado do Paraná. Em seguida, foram obtidos isolados monospóricos utilizados para posterior extração de DNA genômico utilizando o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). A identificação dos isolados dos isolados foi realizada através da técnica de PCR utilizados iniciadores específicos para espécies de *F. verticillioides* e *F. subglutinans* conforme protocolo descrito por Mulè et. al., (2004). A confirmação da espécie *F. equiseti* foi baseada no sequenciamento da porção do gene fator de alongação-1alfa, com os iniciadores Ef1 e Ef2 descritos por Geiser et al. (2004).

Produção de inoculo: Isolados monospóricos das espécies *F. equiseti*, *F. andiyazi*, *F. verticillioides* e *F. subglutinans* foram repicados para placas com SNA e incubados a 23° C durante sete dias. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de água esterilizada e com auxílio de hemacitômetro a concentração da solução foi ajustada para 10⁶ esporos/mL.

Desinfestação e distribuição de sementes em rolo de papel: As sementes foram previamente desinfestadas com álcool 70% por 1 minuto, 0.5% de NaClO por 1 minuto e enxaguadas por três vezes em água esterilizada e secas em papel toalha. Posteriormente, foram distribuídas sobre duas folhas de papel “germitest”, e com auxílio de uma pipeta foi depositado sobre cada semente 20 µL de solução de esporos previamente quantificada como descrito anteriormente. A testemunha constituiu de sementes inoculadas com 20 µL água destilada. Logo em seguida, as sementes foram cobertas com mais uma folha de papel e enroladas; as folhas de papel foram umedecidas com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso seco do papel. Os rolos de papel foram distribuídos em germinador regulado à temperatura constante de 25°C, onde permaneceram por sete dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, onde cada repetição consistiu de rolo de papel com 50 sementes totalizando 400 sementes por tratamento.

Análise estatística: As variáveis mensuradas foram: (i) nº de sementes com algum grau de descoloração e presença de raízes com necrose na região de inserção das raízes na semente, com pelo menos 10 % das raízes necrosadas; (ii) sementes deterioradas com início de germinação visual; e (iii) sementes deterioradas sem germinação. As análises foram realizadas com auxílio do programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância (Ferreira, 2000)). As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os dados foram transformados em Raiz quadrada de $Y + 1.0 - \text{SQRT}(Y + 1.0)$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de patogenicidade mostrou que as espécies *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. equiseti* causaram necroses nas raízes de plântulas inoculadas, porém não causam redução aparente na germinação de sementes nem deterioração significativa em condições na qual foi conduzido este ensaio (tabela 1).

Tabela 1. Patogenicidade de isolados de *F. equiseti*, *F. subglutinans* e *F. verticillioides*, expressa na germinação e deterioração de sementes e necrose de raízes de plântulas de milho.

Espécie/isolado	Sementes deterioradas (%)	Germinação sementes (%)	Plântulas com raízes necrosadas (%)
<i>F. equiseti</i> /1	2,7 ^{ns}	97,2 ^{ns}	4,0 b ¹
<i>F. equiseti</i> /2	5,0	95,0	4,36 b
<i>F. subglutinans</i> /1	5,2	94,8	4,93 b
<i>F. subglutinans</i> /2	3,7	96,3	3,93 b
<i>F. verticillioides</i> /1	3,7	96,2	5,15 c
<i>F. verticillioides</i> /2	2,7	97,2	5,42 c
Testemunha	1,5	98,5	3,14 a
CV (%)			16,5

¹ médias seguidas da mesma letra na coluna vertical não diferem entre si de acordo com o Teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. CV, coeficiente de variação.

Os resultados deste estudo em relação à *F. verticillioides* foram parcialmente concordantes àqueles obtidos por Cumagun et al. (2009) em que os autores verificaram que isolados de *F. verticillioides* foram patogênicos as plântulas de milho. As pesquisas sobre espécies de *F. subglutinans* patogênicas a plântulas de milho são escassas. Neste estudo, foi confirmada a patogenicidade desta espécie. Broders et al. (2007), avaliando diferentes níveis de virulência de espécies de *Fusarium* em sementes de milho e soja observou que todos os isolados de *F. graminearum* mostraram-se altamente virulentos as duas culturas, enquanto, *F. subglutinans* apresentou baixo nível de virulência tanto para milho quanto para soja.

Em relação à espécie *F. equiseti* poucas são as informações sobre a patogenicidade ao milho. Porém, em estudos realizado por Broders et al. (2007) estes autores constataram a patogenicidade dessa espécie em sementes de milho e soja. Segundo, Bottalico (1998) algumas espécies de *Fusarium* podem ser consideradas patógenos fracos ou oportunistas, porém são capazes de produzir consideráveis quantidades de toxinas.

Este trabalho permitiu gerar informações sobre a patogenicidade de algumas espécies de *Fusarium* em milho, contribuindo para o esclarecimento da complexa relação deste patossistema.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a patogenicidade das espécies *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. equiseti* em plântulas de milho, uma vez que estas espécies causaram necroses em raízes. Porém, essas espécies não interferiram na germinação de sementes de milho.

5. REFERÊNCIAS

BOTTALICO, A. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology*, v. 80, p. 85-103. 1998.

BRODERS, K. D., LIPPS, PAUL, P. E., P. A., DORRANCE, A. E. Evaluation of *Fusarium graminearum* Associated with Corn and Soybean Seed and Seedling Disease in Ohio. **Plant Disease**, v. 91, p. 1155-1160, 2007.

CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Grãos. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 2 de ag. 2013.

CUMAGUN, C.J.R., RAMOS, J.S., DIMAANO, A. O., MUNAUT, F., VAN HOVE, F. Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* from corn in the Philippines. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 405- 412, 2009.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** : versão 5.3 (Build 75). Lavras: DEX/UFLA, 2003.

GEISER, D., JIMÉNEZ-GASCO, M. K., SEOGCHAN., M., VEERARAGHAVAN, N., WARD, T., ZHANG, N., O'DONNELL, K. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 473-479, 2004.

FERREIRA, D. F. **SISVAR** : versão 5.3 (Build 75). Lavras: DEX/UFLA, 2003.

LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory manual**. Ames, Iowa: Blackwell Professional, 2006, 388 p.

MULÈ, G., SUSCA, A., STEA, G., MORETTI, A. Species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 495-502, 2004.

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.