

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**LEVANTAMENTO DE FUNGOS CAUSADORES DE
PODRIDÃO DE ESPIGA EM MILHO E
VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Stenocarpella maydis***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KATIANE FEDRIGO

GUARAPUAVA-PR

2014

KATIANE FEDRIGO

**LEVANTAMENTO DE FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO DE ESPIGA EM
MILHO E VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Stenocarpella maydis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva

Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Cacilda Márcia Duarte Rios Faria – Unicentro
Co-orientadora

GUARAPUAVA-PR

2014

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

F294I Fedrigo, Katiane
Levantamento de fungos causadores de podridão de espiga em milho e variabilidade genética em *Stenocarpella maydis* / Katiane Fedrigo. – – Guarapuava, 2015
xiii, 59 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2015

Orientador: Paulo Roberto da Silva
Co-orientadora: Cacilda Márcia Duarte Rios Faria
Banca examinadora: Paulo Roberto da Silva, Rodrigo Rodrigues Matiello, Marcos Ventura Faria, Cacilda Márcia Duarte Rios Faria

Bibliografia

1. Agronomia. 2. Patologia de grãos. 3. Marcadores moleculares. 4. ISSR. 5. Similaridade genética. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

CDD 633.15

Katiane Fedrigo

**LEVANTAMENTO DE FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO DE ESPIGA EM MILHO
E VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Stenocarpella maydis***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 18 de dezembro de 2014.


Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva
(UNICENTRO)


Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello
(UEPG)


Prof. Dr. Marcos Ventura Faria
(UNICENTRO)


Profª. Drª. Cacilda Marcia Duarte Rios Faria
(UNICENTRO)

GUARAPUAVA-PR

2014

Dedico

Aos meus pais, Clademir e Maria Goreti, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charlie Chaplin)

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.
- À Universidade Estadual do Centro-Oeste, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade do curso de mestrado.
- Ao meu orientador, Dr. Paulo Roberto Da Silva pela colaboração, os maiores e sinceros agradecimentos. Obrigada pela sua confiança, paciência, orientação e conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho. Orientador é a palavra ideal para defini-lo.
- À minha co-orientadora, Dr^a Cacilda Márcia Duarte Rios Faria pelos ensinamentos durante o mestrado e pelo apoio e amizade.
- À minha família que é o pilar de toda minha vida. Aos meus pais Clademir e Maria Goreti, por sempre estarem ao meu lado de coração aberto e certo e me apoiarem em todas as minhas escolhas. Aos meus irmãos, Karina, Luis Gustavo e João Vitor por compreenderem minha distância.
- Ao meu namorado, Luiz Antônio por ser minha inspiração, por compreender a minha distância e estar sempre me auxiliando nos trabalhos, nos estudos e me dando força para seguir em frente.
- À Renata, pela amizade e por me ajudar e auxiliar nos experimentos no laboratório.
- Aos colegas dos laboratórios de Fitopatologia e Genética Molecular pela amizade e pelos ensinamentos, em especial a Carla Daiane Leite, ao Leandro, ao Felipe, a Juliana, a Daiane e ao Jesus.
- Aos meus avós, tios, tias, primos e primas, em especial a minha vó Jatir, que sempre me incentivaram nos estudos. À minha segunda família, Clarice, Alcindo e Marta, pelo estímulo e apoio.
- Aos meus amigos, que compreenderam a minha distância e ausência, principalmente nas datas especiais.
- Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que isso fosse possível!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Importância socioeconômica do milho.....	2
2.2 Doenças do milho.....	3
2.3 Grão ardido.....	4
2.4 Podridão de espiga por <i>Stenocarpella maydis</i>	5
2.5 Sintomatologia da doença.....	6
2.6 Ciclo da doença.....	6
2.6.1 Fontes de inóculo.....	6
2.6.2 Disseminação.....	7
2.6.3 Infecção e colonização.....	7
2.7 Manejo da doença.....	8
2.8 Variabilidade genética de <i>S. maydis</i>	8
2.8.1 Marcadores moleculares.....	9
2.8.1.1 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).....	10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo geral.....	17
4.2 Objetivos específicos.....	17
5. CAPÍTULO I – LEVANTAMENTO EM GRÃOS DE MILHO DE FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO DA ESPIGA E ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES PARA CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Stenocarpella maydis</i>.....	19
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
5.1 INTRODUÇÃO.....	21

5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.2.1 Locais de coleta.....	23
5.2.2 Local das análises.....	23
5.2.3 Teste de patologia de grãos.....	24
5.2.4 Isolamento de <i>Stenocarpella maydis</i>	24
5.2.4.1 Obtenção de cultura monospórica de <i>S. maydis</i>	24
5.2.4.2 Crescimento micelial de <i>S. maydis</i>	25
5.2.5 Crescimento micelial de fungos causadores da podridão da espiga.....	25
5.2.6 Competição de fungos causadores de podridão de espiga.....	26
5.2.7 Análises estatísticas.....	27
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.3.1 Teste de patologia de grãos.....	28
5.3.2 Crescimento micelial de <i>S. maydis</i>	31
5.3.3 Crescimento micelial e competição de fungos causadores da podridão da espiga.....	32
5.4 CONCLUSÕES.....	35
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
6. CAPÍTULO II – VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Stenocarpella maydis</i>.....	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
6.1 INTRODUÇÃO.....	42
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
6.2.1 Local das análises.....	44
6.2.2 Extração de DNA.....	44
6.2.3 Quantificação do DNA.....	44
6.2.4 Amplificação do DNA.....	45
6.2.5 Análises estatísticas – ISSR.....	45
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.3.1 Seleção de <i>primers</i>	48
6.3.2 Variabilidade genética.....	51
6.4 CONCLUSÕES.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE SIGLAS

AA	Aveia-Ágar
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BOD	Biochemical Oxygen Demand
BSA	Batata-Sacarose-Ágar
°C	Graus Celsius
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
CV	Coeficiente de Variação
CRD	Completely Randomized Design
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EMR	Effective Multiplex Ratio
G	Gramas
HCl	Ácido Clorídrico
IF	Intervalo dos Fragmentos
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
IVCM	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial
M	Marcador de peso molecular
M	Molar
MC	Meio de Cenoura
MI	Marker Index
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NT	Número Total de fragmentos amplificados
PIC	Polymorphic Information Content
PCR	Polimerase Chain Reaction
PVC	Policloreto de Vinila
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified of Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism

RNase	Ribonuclease
RP	Resolving Power
SSR	Simple Sequence Repeat
TE	TRIS-EDTA
TRIS-HCL	(Hydroxymethyl) Aminomethane Hydrochloride
UBC	University of British Columbia
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-Oeste
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
UV	Ultravioleta
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Amostras de grãos de milho coletadas de diferentes cultivares nas safras 2012/13 e 2013/14. Guarapuava: Unicentro, 2014.....	23
Tabela 2. Descrição dos tratamentos relativos ao crescimento micelial fungos causadores de podridão de espiga. Guarapuava: Unicentro, 2014.....	26
Tabela 3. Descrição dos tratamentos relativos à porcentagem de inibição de crescimento micelial de <i>S. maydis</i> . Guarapuava: Unicentro, 2014.....	27
Tabela 4. Incidência média de fungos causadores das podridões de espiga em grãos de milho oriundos de diferentes locais. Guarapuava, Unicentro, 2014.....	29
Tabela 5. Índice de velocidade de crescimento micelial (cm) de <i>S. maydis</i> em diferentes meios de cultura. Guarapuava, Unicentro, 2014.....	31
Tabela 6. Índice de velocidade de crescimento micelial de fungos causadores de podridão de espiga. Guarapuava: Unicentro, 2014.....	33
Tabela 7. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Stenocarpella maydis</i> em cultivo pareado em meio de cultura BSA+A a 25°C. Guarapuava: Unicentro, 2014.....	33
Tabela 8. Codificação e local de coleta dos isolados de <i>Stenocarpella maydis</i> utilizadas neste estudo. Guarapuava: Unicentro, 2014.....	44
Tabela 9. <i>Primers</i> ISSR utilizados para amplificação do DNA de seis isolados de <i>Stenocarpella maydis</i> provenientes dos municípios de Guarapuava, São Jorge d'Oeste e Vitorino. Guarapuava: Unicentro, 2014.....	46
Tabela 10. Relação dos 42 primers ISSR utilizados com seus respectivos parâmetros em <i>Stenocarpella maydis</i> . Número total de fragmentos amplificados (NT), intervalo dos fragmentos (IF), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), índice de marcador (MI) e poder de resolução (RP). Os <i>primers</i> sombreados foram os 10 com melhores valores combinados dos índices PIC, MI e RP. Guarapuava: Unicentro, 2014.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentagem média de incidência de fungos em grãos de milho baseados na análise do *Blotter Test* de grãos oriundos de diferentes localidades dos estados do Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul. Guarapuava, Unicentro, 2014.....31
- Figura 2.** Padrão de amplificação dos *primers* ISSR UBC 859 e UBC 886 nos seis isolados de *S. maydis*. A seta a esquerda indica o fragmento de 600 pb. M = marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. Guarapuava: Unicentro, 2014.....48
- Figura 3.** Dendrogramas dos seis isolados de *Stenocarpella maydis* gerados com dados dos marcadores ISSR. **A)** dendrograma obtido utilizando 21 *primers*; **B)** dendrograma obtido utilizando os 10 *primers* mais informativos; **C)** dendrograma obtido utilizando os 10 *primers* com melhores valores de PIC; **D)** dendrograma obtido utilizando os 10 *primers* com melhores valores de RP. I1 - São Jorge d'Oeste; I2 - Vitorino R₃; I3 - Vitorino R₄; I4 - Guarapuava; I5 - Vitorino R₈; I6 - Vitorino R₁. Guarapuava: Unicentro, 2014.....52

RESUMO

FEDRIGO, K. **Levantamento de fungos causadores de podridão de espiga em milho e variabilidade genética em *Stenocarpella maydis***. 2014. 72p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Unicentro.

O objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento dos principais fungos causadores de podridão da espiga em grãos de milho e estimar a variabilidade genética de *S. maydis* utilizando marcadores moleculares ISSR. As amostras de grãos de milho coletadas em diferentes municípios foram submetidas ao teste de patologia de sementes (*Blotter Test*). Para o teste de crescimento micelial de *S. maydis*, o experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 4 (meios de cultura) x 2 (antibiótico) x 2 (regime de luz), com quatro repetições. Os meios de cultura testados foram aveia-ágar (AA), batata-dextrose-ágar (BDA), batata-sacarose-ágar (BSA) e meio de cenoura (MC) e o antibiótico utilizado foi o cloranfenicol a 150mg L⁻¹. Para o crescimento micelial e teste de competição de fungos causadores da podridão da espiga, foram utilizados os fungos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *S. maydis*. Para seleção de *primers* e avaliação da variabilidade genética o DNA dos isolados de *S. maydis* foi extraído pelo método CTAB e a amplificação dos fragmentos através da técnica da PCR utilizando 42 *primers* ISSR. Os índices PIC (conteúdo de informação polimórfica), MI (índice do marcador) e RP (poder de resolução) foram calculados para determinar os 10 *primers* ISSR mais informativos. Os resultados do teste de patologia de grãos indicaram que o fungo *Stenocarpella* spp foi o que apresentou a menor incidência (1,13%) e o *Fusarium* spp. a maior (49,56%). Para o crescimento micelial, os meios BDA e BSA se destacaram. Em relação ao crescimento micelial e competição de fungos causadores de podridão de espiga, destacou-se o fungo *Penicillium* spp., pois evidenciou elevado antagonismo ao patógeno *S. maydis*. Em relação à variabilidade genética, dos 42 *primers* utilizados, 50% apresentaram bons produtos de amplificação. A análise de agrupamento possibilitou separar isolados de *S. maydis* do mesmo município (I2, I3, I5 e I6 – Vitorino) em grupos diferentes e não agrupou o I4 (Guarapuava) aos demais isolados. Os *primers* UBC 848, 873, 808, 811, 807, 827, 861, 868, 809 e 835 foram os que apresentaram melhores resultados para análise da variabilidade genética. A similaridade genética média entre os isolados foi de 34%, mostrando a existência de alta variabilidade genética entre os seis isolados de *S. maydis*.

Palavras-chave: Patologia de grãos; marcadores moleculares; ISSR, similaridade genética.

ABSTRACT

FEDRIGO, K. **Survey in corn grain of the fungi that cause maize ear rot and genetic variability of *Stenocarpella maydis***. Thesis, 2014. 72p. (Master in Agronomy). Unicentro.

The objective of this study was to survey the main fungi that cause ear rot in corn grains and to estimate the genetic variability of *S. maydis* using ISSR molecular markers. Samples of corn grains collected in different municipalities were subjected to seed pathology test (*Blotter Test*). For the mycelial growth of *S. maydis* test, the experiment was completely randomized design (CRD) in a factorial arrangement 4 (culture media) x 2 (antibiotic) x 2 (light regime), with four replications. The tested media were oatmeal agar (AA), potato dextrose agar (PDA), potato sucrose agar (BSA) and medium carrot (MC) and the antibiotic used was chloramphenicol 150 mg L⁻¹. For mycelial growth and competition test fungi that cause ear rot, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *S. maydis* fungi were used for selection of primers and evaluation of the genetic variability of the DNA isolated from *S. maydis* was extracted by the CTAB method and the amplification of the fragments by PCR technique using 42 ISSR *primers*. The PIC (polymorphic information content), MI (marker index) and RP (resolving power) indices were calculated to determine the 10 ISSR *primers* more information. The results of the grain pathology test indicated that the fungus *Stenocarpella* spp was the one with the lowest incidence (1.13%) and *Fusarium* spp. the highest (49.56%). For mycelial growth, the BDA and BSA media stood out. Regarding the mycelial growth and competition of fungi that cause ear rot, stood out the fungus *Penicillium* spp., as evidenced high antagonism to the pathogen *S. maydis*. In relation to genetic variability, the 42 *primers*, 50% showed good amplification products. Cluster analysis allowed separate isolates of *S. maydis* the same city (I2, I3, I5 and I6 - Vitorino) in different groups and did not group the I4 (Guarapuava) to other strains. UBC primers 848, 873, 808, 811, 807, 827, 861, 868, 809 and 835 showed the best results for the analysis of genetic variability. The mean genetic similarity among isolates was 34%, showing the existence of high genetic variability among the six isolates of *S. maydis*.

Keywords: grain Pathology; molecular markers; ISSR, genetic similarity.

1. INTRODUÇÃO

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

A elevada produção desse grão no Brasil é devido aos avanços da tecnologia e ao clima propício ao desenvolvimento da cultura, juntamente à sua capacidade de resistência aos estresses causados pelo ambiente.

Com a ampla diversidade de épocas de semeadura nas diferentes regiões de cultivo, a cultura fica no campo quase o ano todo, o que facilita o surgimento de novos problemas, principalmente aqueles relacionados com a disseminação de patógenos. As questões fitossanitárias decorrem devido aos graves problemas relacionados à morte de plântulas, podridão de raízes, caules, espigas e grãos.

As podridões de espiga e os grãos ardidos são causados por patógenos que podem afetar o rendimento da cultura, diminuindo a qualidade e o peso dos grãos. Os fungos relacionados a essas doenças são *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Gibberella* spp., *Penicillium* spp., e *Stenocarpella* spp. A incidência desses nos grãos de milho ainda é um problema devido à produção de micotoxinas. Os principais fungos toxigênicos predominantes na cultura do milho são do gênero *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Stenocarpella*. Dentre estes, merece destaque o *Stenocarpella maydis*, que infecta colmos, espigas e conseqüentemente os grãos, podendo deixá-los inviáveis.

Para o manejo adequado da diplodia (doença causada por *Stenocarpella maydis*) é necessário o conhecimento do agente etiológico desta doença. Portanto, para entender a dinâmica das populações de fungos é necessário estudar sua variabilidade genética.

As técnicas utilizadas para estudo da variabilidade genética são várias, porém os marcadores moleculares baseados em PCR são os mais indicados, pois acessam a informação diretamente no DNA, não sofrendo influência ambiental. Dentre os marcadores baseados em DNA, os ISSRs provaram serem ferramentas úteis na descrição da variabilidade genética de vários grupos de fungos, por não ter necessidade de conhecimento prévio do genoma, apresentar elevado polimorfismo e reprodutibilidade.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento de fungos causadores de podridão de espiga em milho e estimar a variabilidade genética de *S. maydis* utilizando marcadores moleculares ISSR.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância socioeconômica do milho

O milho é uma das culturas mais importantes da agricultura brasileira. Antigamente era considerado somente uma opção de cultura, sendo plantado em locais inapropriados (FANCELLI e DOURADO-NETO, 2003). Com o passar do tempo, entrou no grupo dos cereais exportáveis no Brasil, devido sua importância caracterizada pelas diversas formas de utilização, que vai desde a alimentação de humanos e animais até as indústrias de alta tecnologia (DUARTE et al., 2009).

Na safra agrícola de 2013/2014, a área cultivada na primeira safra atingiu aproximadamente 6,7 milhões de hectares, com redução de 1,3% quando comparada com a área cultivada na safra anterior. A produção apresentou redução de 6,8%, saindo de 34 milhões de toneladas para 32 milhões, isso pode ter ocorrido em função das adversidades climáticas. Na região Sul, a redução na produção deve-se à diminuição da área cultivada no estado do Paraná, pressionada pelo plantio de variedades precoces de soja. Quando comparada a safra anterior, houve decréscimo de 8,2%, atingindo 14 milhões de toneladas (CONAB, 2014).

Pela ampla diversidade de épocas em que o milho é semeado nas diferentes regiões do Brasil, sendo que alguns desses locais possuem características ambientais impróprias, a cultura fica no campo quase todo o ano. Estas condições facilitam a produção de inóculo de um grande número de patógenos, com elevada alteração no grau de incidência, proporcionando graves problemas à produção. Noemalmente os danos estão associados a morte de plântulas e as podridões de espigas, raízes e caules, bem como as doenças foliares, as quais diminuem a capacidade fotossintética da planta fazendo com que ela pare de crescer (BONALDO et al., 2010).

Embora a natureza proporcione grande influência ambiental para o desenvolvimento da cultura, os produtores e os técnicos podem evitar as influências negativas do ambiente por meio da melhora das práticas de manejo. Dentre estas podemos citar o emprego de cultivares mais resistentes, rotação de culturas, tratamento de sementes, controle de plantas daninhas e de insetos com táticas de controle culturais ou até mesmo com produtos químicos, com o objetivo de diminuir as pragas na lavoura do milho e preservação dos inimigos naturais (CRUZ et al., 2013).

A qualidade sanitária e fisiológica das sementes interfere nos índices de produtividade

da cultura do milho, pois exerce papel fundamental tanto no estabelecimento da lavoura quanto na disseminação de patógenos (CARVALHO et al., 2004).

2.2 Doenças do milho

O milho é considerado uma planta tolerante a diversos tipos de estresse, seja de natureza biótica ou abiótica. A temperatura, a fitotoxidez por fertilizantes, herbicidas e fungicidas, a deficiência nutricional e o estresse hídrico são agentes causadores de estresse abiótico, ou seja, não infecciosos. Os estresses bióticos são provocados por vírus, bactérias, nematoides, fungos, plantas parasíticas e insetos e demandam técnicas de manejo para evitar a combinação de fatores favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos (JULIATTI e SOUZA, 2005).

Alguns organismos que se desenvolvem nos sistemas agrícolas possuem estrutura de resistência às mudanças, pois aqueles adaptados e competitivos são competentes para estabelecer um nicho ecológico. A agricultura promove a ruptura desse equilíbrio provocando perda da estabilidade biológica do sistema, fazendo com que esses organismos ataquem a lavoura e causem doenças, reduzindo dessa forma o potencial produtivo e a qualidade da cultura (DOURADO NETO e FANCELLI, 2000).

O manejo das doenças do milho, até o início da década de 90, era feito por meio do uso de cultivares resistentes. A ocorrência de clima favorável juntamente com os sistemas de plantios e cultivos empregados, a utilização indiscriminada de cultivares vulneráveis, à ausência de rotação de culturas, a expansão da área cultivada e o nível tecnológico incorreto contribuíram para a multiplicação e preservação de inóculos de diversos patógenos, deixando a cultura do milho exposta a condições edafoclimáticas favoráveis a incidência de doenças (JULIATTI et al., 2007; JARDINE e LACA-BUENDÍA, 2009).

Segundo Sangoi et al. (2000), as doenças que apresentam importância econômica, devido a intensidade e continuidade em que acontecem, são as foliares, podridões do colmo e de espigas. Um dos fatores importantes para a ocorrência de podridões do colmo e da espiga é a alta densidade de plantas e a época de semeadura (DENTI e REIS, 2001). O elevado número de plantas por unidade de área limita a atividade fotossintética, o que influencia a taxa de enchimento de grãos pelos fotoassimilados. Sendo assim, os grãos ficam mais leves e frágeis sendo mais propensos à incidência de podridões (SANGOI et al., 2000).

As podridões de espiga ocorrem em todos os locais onde o milho é cultivado e podem ser causadas pelos patógenos presentes no colmo (RIBEIRO et al., 2005). Em áreas de

monocultura e plantio direto, onde o índice de chuvas é elevado desde o período de germinação até a colheita, o grau de incidência de grão ardido é elevado (FONTOURA et al., 2006).

2.3 Grãos ardidos

Os grãos de milho são considerados ardidos quando possuem pelo menos um quarto de sua área descolorida, e sua cor varia em diferentes tons de marrom, roxo e vermelho (PINTO et al., 2007). Quanto aos danos associados aos grãos ardidos, estes podem ser qualitativos, ou seja, estão relacionados com a qualidade dos grãos e quantitativos, ligados com os grãos de menor peso (ALVES et al., 2012).

Em razão dos grãos doentes serem mais leves, a redução da produção é devido aos grãos ardidos terem qualidade inferior, em consequência do baixo valor nutricional (COSTA et al., 2013). Com isso, há desvalorização do produto no mercado, diminuindo o valor de venda e gerando um percentual referente à incidência de grãos ardidos. A taxa máxima usada como padrão de qualidade para grãos ardidos, utilizada pela maioria dos órgãos de comercialização e cooperativas é 6% (PINTO et al., 2007) e o valor máximo para exportação é 2% (MENDES et al., 2012).

Além dos danos acima citados, com a presença de restos culturais sobre a superfície do solo, as doenças antigas podem reaparecer com maior agressividade e intensidade, e as doenças novas se manifestarem mais rapidamente, favorecendo a sobrevivência de vários fitopatógenos na cultura (CASA et al., 2006). A presença dos patógenos provoca a diminuição na produtividade e na qualidade sanitária de grãos, pois a colonização de fungos nas sementes paralisa o processo normal de enchimento de grãos e reduz o peso das espigas (ZAMBOLIM et al., 2000).

No processo de colonização dos grãos, ainda pode ocorrer produção de micotoxina pelos fungos toxigênicos, provocando danos físicos como descolorações dos grãos, diminuição de carboidratos, de proteínas e de açúcares totais. As micotoxinas são metabólitos secundários que não representam importância no desenvolvimento e crescimento de fungos, porém estas substâncias variam de compostos simples a complexos (DINIS et al., 2007).

Nem todos os fungos são toxigênicos, mas alguns produzem um ou mais metabólitos secundários. A presença do fungo toxigênico não provoca necessariamente a produção de micotoxinas, as quais estão ligadas com a habilidade de biossíntese do fungo e das condições ambientais existentes (CASELA et al., 2006). Dentre as micotoxinas de importância agro

econômica destacam-se as aflatoxinas, diplotoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, toxinas tremorgênicas e alcaloides de doenças de cereais (ZAIN, 2011).

Os fungos responsáveis por produzir essas micotoxinas estão presentes nos grãos ardidos e são responsáveis pelas podridões de espigas e sementes. Essas doenças são causadas basicamente por fungos de armazenamento, (*Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*) e de campo, (*Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, *Gibberella zae*, *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*) (PINTO et al., 2007).

2.4 Podridão de espiga por *Stenocarpella maydis*

O nome comum de uma doença geralmente está associado aos sintomas, regiões de infecção na planta e a presença/coloração dos sinais do patógeno, auxiliando na diagnose. O fungo *S. maydis* é responsável por uma das doenças mais antigas no Brasil e é encontrado na maioria das regiões que cultivam o cereal. Este patógeno causa a diplodia, conhecida como podridão branca da espiga e podridão do colmo, as quais reduzem a qualidade do grão e o potencial produtivo (BRESSAN e FIGUEIREDO, 2003; CASA et al., 2006;).

As espécies *S. maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. zae* (Scw.) Lev.] e *S. macrospora* Earle in Bull.] [Sin. *Diplodia macrospora* Earle] pertencem à classe Ascomycetes e Ordem Dothideales. No ciclo biológico dessas espécies, a forma anamórfica predomina, ou seja, tem reprodução assexuada e não há fase teleomórfica conhecida (CASA et al., 2006).

Os picnídios de *S. maydis* possuem paredes densas, são subepidérmicos, alongados ou em forma de globo, tendo coloração marrom escura a preta e diâmetro de 150-300 µm. O fungo forma nas células internas da parede do picnídio, células conidiogênicas enteroblásticas, fialídicas, cilíndricas. Os conídios são pardo-oliva a pardos, fusiformes, retos ou levemente curvados, bicelulados, geralmente com um septo, porém pode apresentar dois ou nenhum e medem 15-34 x 5-8 µm. Os conidióforos geralmente são inexistentes. Os picnídios e conídios de *S. macrospora* são semelhantes aos de *S. maydis*, porém seus conídios são o dobro ou o triplo do tamanho, tendo de um a três septos e medem 44-82 x 7,5-11,5 µm (CASA et al., 2006).

As duas espécies podem ser diferenciadas pela coloração do crescimento micelial em meio de cultura (REIS et al., 2004), pelo tamanho, forma e cor dos conídios (CASA et al., 2006) e pelo teste de patologia de sementes, pois no *Blotter test* o micélio das colônias

diferencia-se pela coloração, sendo o micélio das colônias de *S. maydis* de coloração pardo-escuro a escura, com formação de picnídios na massa miceliana, enquanto o micélio de *S. macrospora* apresenta coloração branca e sem formação de picnídios (MARIO e REIS, 2001).

Casa et al. (2007) estudaram o efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio de *S. macrospora* e *S. maydis* e verificaram que não ocorreu crescimento micelial das duas espécies nos extremos de temperatura (5 e 45°C). Para *S. maydis* a temperatura que proporcionou melhor crescimento micelial foi próxima a 26°C. Em relação aos períodos de luminosidade, sob fotoperíodo de 12 horas as colônias cresceram mais rápido do que aquelas submetidas à luz constante, sendo que o micélio do fungo cobriu a placa completamente após 84 horas de incubação.

2.5 Sintomatologia da doença

Segundo Kimati et al. (2005), na podridão do colmo, na parte externa, há uma alteração de cor, variando do palha ao marrom escuro, e a medula encontra-se fragmentada, apresentando mudança de cor. Quando o tecido está senescido, o *S. maydis* produz picnídios pardo-negros, os quais estão agrupados no tecido dos nós, o que é um sinal importante para diagnosticar a doença. As plantas que são atacadas de modo severo, geralmente têm morte precoce. A presença de espigas decumbentes é um sinal que o colmo está infectado.

Na espiga, os primeiros sintomas começam na base, ocorrendo despigmentação e deixando-a com cor parda. Quando a espiga apresenta coloração pardo-cinza a esbranquiçada, está com os grãos enrugados e leves e as palhas estão aderidas aos grãos, é sinal de que a infecção aconteceu logo após a polinização e o micélio do fungo está crescendo. Os sintomas também podem atingir os grãos, estes, quando doentes, apresentam coloração cinza fosco a marrom. Quando as espigas são contaminadas no final do ciclo, não apresentam manifestações externas, porém quando os grãos são retirados da espiga, é possível observar o micélio do fungo crescendo entre eles (DUARTE et al., 2009).

2.6 Ciclo da doença

2.6.1 Fontes de inóculo

Os resíduos de plantas de milho infectados por *S. maydis*, deixados no solo, e sementes infectadas são as principais fontes de inóculo e de disseminação do patógeno. Essa

doença está presente em todas as regiões do Brasil, com predomínio na Região Sul, onde as altitudes são mais elevadas. Nessa região, as doenças associadas com a germinação de sementes, podridões da espiga e do colmo, ocorrem devido à presença do fungo *S. maydis* (CASA et al., 2000).

Os fungos *S. maydis* e *S. macrospora* são parasitas necrotróficos, devido a isso sua sobrevivência depende se há palha ou não no solo. Os resíduos culturais de milho deixados na lavoura de um ano para o outro, em sistema de monocultura, contribuem para a germinação de conídios de *S. maydis* e *S. macrospora*, o que confirma a importância do inóculo primário nestes resíduos como fonte de infecção primária para plantas de milho (CASA et al., 2003).

2.6.2 Disseminação

A semente infectada é um dos principais métodos de disseminação de *S. maydis*, o que a torna responsável pela introdução do fungo em novas áreas de cultivo de milho distantes da região de origem (CASA et al., 2006).

A dispersão vertical e horizontal dos conídios de *Stenocarpella* spp. foram relatadas por Casa et al. (2004). Os resultados mostraram que até 25 cm de altura, mais de 60% dos conídios de *S. maydis* e *S. macrospora* foram coletados. Esses dados auxiliam na compreensão do porque os colmos são infectados entre o primeiro e segundo entrenó pelas podridões causadas por *Stenocarpella* spp. Acima de 50 cm foi coletado somente 20 a 30% dos conídios para ambos os fungos, mostrando uma redução de 50% quando comparado com a altura de 25 cm. Isso pode ter acontecido devido à relação do tamanho e o peso dos conídios e/ou do cirro inteiro ter sido liberado do picnídio. Outro fator importante é a altura do respingo das gotículas d'água sobre o corpo frutífero contendo os conídios, o que não permite que grande quantidade deles seja capturada a alturas superiores a 25 cm da fonte de inóculo.

2.6.3 Infecção e colonização

A principal fonte de inóculo para a podridão branca da espiga são as sementes infectadas. O micélio do fungo presente no endosperma da semente retoma sua atividade vital e cresce do interior à superfície da semente, quando esta entra em contato com a água. Portanto, o patógeno consegue sobreviver saprofiticamente em restos de cultura, raízes, colmos, espigas e grãos em monoculturas no sistema de plantio direto. Dessa forma, o inóculo

possui condições ideais para esporulação, liberação e dispersão dos conídios (CASA et al., 2003; TRENTO, 2004).

A infecção da espiga ocorre a partir de conídios disseminados pelo vento, ou seja, os conídios são carregados e depositados pela força da gravidade nas espigas, preservando o inóculo viável por muito tempo (CASA et al., 2004; REIS e MARIO, 2003).

As plantas também ficam predispostas à infecção de *Stenocarpella* spp. devido a alta densidade de plantas nas lavouras, ao baixo nível de potássio, alto nível de nitrogênio e a redução da área foliar ocasionada por outras doenças (FONTOURA et al., 2006; CASA et al., 2007).

2.7 Manejo da doença

As características de *S. maydis* de infectar somente plantas de milho, não formar estruturas de repouso e os conídios serem dispersos pelo vento a curtas distâncias, permitem manejar a doença reduzindo ou eliminando o inóculo na sua fonte (CASA et al., 2006).

O manejo das podridões de grãos envolve ações integradas, como a rotação de culturas, o uso de cultivares resistentes e sementes livres de patógenos, a destruição de restos culturais infectados, o manejo do solo e a sincronia nas épocas de semeadura (JULIATTI et al., 2007). A rotação de culturas em híbridos com elevado nível de resistência fúngica é a melhor alternativa, porém são necessários dois ou três anos para reduzir o inóculo para níveis aceitáveis (SPADARO e GULLINO, 2004).

2.8 Variabilidade genética de *S. maydis*

Na literatura não há relatos sobre a existência de raças de *S. maydis*. No entanto, sabe-se da existência de variação no grau de agressividade desse patógeno.

Latterell e Rossi (1983) verificaram durante os estádios iniciais de desenvolvimento das plantas de milho que *S. maydis* é menos agressivo que *S. macrospora*.

Dorrance et al. (1999) compararam 46 isolados de *S. maydis* advindos de laboratórios de fitopatologia e empresas dos Estados Unidos e da África do Sul. Os autores observaram que houve baixo nível de polimorfismo de isoenzimas, variando pouco para 10 enzimas avaliadas. Com relação à agressividade do patógeno estudado, esperavam maior variação. A justificativa para a limitada variação em isoenzimas é a especialização do fungo ao hospedeiro.

Para o estudo da genética de fungos as técnicas moleculares são muito utilizadas. Os dados moleculares são importantes no desenvolvimento da sistemática, bioquímica e ecologia de fungos (BRIDGE, 2002). O desenvolvimento da tecnologia molecular favoreceu as pesquisas relacionadas com a identificação de espécies desconhecidas, estudos de variabilidade genética, caracterização e detecção de patógenos (BRIDGE, 2002; WANG et al., 2005).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método viável para auxiliar rapidamente várias doenças relacionadas com fungos e tem como base a análise direta das moléculas de DNA (LEE et al., 2002).

2.8.1 Marcadores moleculares

Marcadores genéticos são utilizados em pesquisas básicas, na caracterização de germoplasma, em isolamentos de genes, na introgressão assistida de alelos favoráveis, na produção de variedades melhoradas e para obter informações sobre a variação genética dentro das populações. Estes marcadores podem ser divididos em três classes: morfológicos (variação em nível de fenótipo), bioquímicos (variação no nível de produto do gene) e moleculares (variação no DNA) (WANI et al., 2013).

Os marcadores moleculares são sequências específicas de DNA capazes de diferenciar dois ou mais indivíduos (MILACH, 1998). Esses marcadores permitem identificar rapidamente linhagens, híbridos, cultivares e espécies, a fim de auxiliar em estudos de diversidade e variabilidade genética, estimar o grau de parentesco, facilitar a construção de mapas de ligação, associações com características agronômicas e estabelecer relações filogenéticas mais precisas (BENKO-ISEPPON et al., 2003; MOULIN et al., 2012; MIR e VARSHNEY, 2013).

Os marcadores moleculares podem ser divididos em dois grupos, os marcadores baseados em hibridização e os baseados em PCR. O RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) foi um dos primeiros marcadores a ser desenvolvido e utiliza a técnica de hibridização, através do uso de enzimas de restrição. As principais limitações desse marcador são devido ao elevado tempo e custo para as análises (SARTORETTO e MELLO FARIAS, 2010). Os marcadores minissatélites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) são semelhantes ao RFLP, diferindo apenas no tipo de sonda utilizada (MARANO et al., 2010).

A primeira geração de marcadores de DNA incluindo o RFLP não correspondeu às

expectativas desejadas. Devido a isso, as técnicas baseadas em PCR surgiram para suprir as limitações e necessidade dos marcadores baseados em hibridização (MILACH, 1998). Os principais marcadores baseados em PCR são o RAPD (Random Amplified of Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (WANI et al., 2013).

O marcador RAPD é simples e rápido (SHI et al., 2010; REZK et al., 2012), porém apresenta baixa reprodutibilidade (ADZITEY et al., 2013). O marcador AFLP gera elevado grau de polimorfismo, mas é uma técnica muito elaborada (MEUDT e CLARKE, 2007; MANICA-BERTO et al., 2013). Os SSR são codominantes, apresentam alto grau de polimorfismo, porém para sua otimização é uma técnica trabalhosa e cara (VARSHNEY et al., 2005). O marcador aleatório ISSR é dominante, porém consiste em uma técnica simples, rápida, barata, eficiente (VEIGA et al., 2011), não é necessário o conhecimento prévio do genoma, o que facilita sua aplicação (REDDY et al., 2002).

2.8.1.1 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

O marcador ISSR é baseado na técnica de PCR e envolve a amplificação de fragmentos de DNA entre duas regiões microssatélites repetidas e opostas. A sequência do *primer* ISSR abrange uma repetição de microssatélites que geralmente se ancora na extremidade 3' ou 5', com uma a quatro bases que podem ser específicas ou degeneradas (WANG et al., 2009).

O marcador ISSR apresenta vantagem por ser simples, pela aplicabilidade em várias espécies sem conhecimento prévio do genoma, por permitirem a análise de elevado número de *loci* e por produzirem fragmentos com grande reprodutibilidade. Entretanto, uma desvantagem dos marcadores ISSR é a expressão dominante, ou seja, não diferenciam os indivíduos heterozigotos dos homozigotos (VEIGA et al., 2011).

O ISSR é uma ótima ferramenta para analisar a variabilidade genética dentro de espécies associadas e também, para estudos de genética de populações de fungos patogênicos, possibilitando obter informações úteis para medidas de controle de doenças (CHADHA e GOPALAKRISHNA, 2007; TAKATSUKA, 2007).

Armengol et al. (2010) estudaram a análise da estrutura populacional de *Rosellinia necatrix* em *Cyperus esculentus* utilizando sequência inter simples repetida (ISSR). Os resultados evidenciaram que a partir dos 17 isolados estudados, 4 dos 7 *primers* geraram fragmentos polimórficos, sendo que o ISSR1 gerou fragmentos com tamanho entre 350 a

1260 pb. A análise evidenciou índice de polimorfismo de 81%, resultando em 8 diferentes padrões de fragmentos.

Thangavelu et al. (2012) avaliaram a diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (*Foc*) de isolados da Índia e observaram a amplificação de ISSR de 107 isolados de *Foc* utilizando 10 *primers* que produziram de 3 a 14 fragmentos, sendo que 2 em 10 *primers* foram polimórficos. O tamanho dos fragmentos de PCR gerados variou de 100 a 4500 pb. A matriz de distância entre os acessos foi calculada com base no *fingerprintg* obtido e variou de 0,27 a 1,00. Esses resultados indicaram a existência de grande diversidade genética entre os isolados de *Foc* na Índia.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADZITEY, F.; HUDA, N.; ALI, G.R.R. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and applications to foodborne pathogens isolated from ducks. **3 Biotech**, Berlin, v.3, p.97-107, 2013.
- ALVES, E.N.T.D.; VERDOLIN, A.L.G.; COSTA, R.V.da.; COTA, L.V.; SILVA, D.D.da.; SILVA, O.A.da. **Alternativas de Controle para Redução de Grãos Ardidos na Cultura do Milho**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24, 2012, Águas de Lindóia, 26 a 30 de Agosto de 2012.
- ARMENGOL, J.; VICENT, A.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; ABAD-CAMPOS, P.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J. Analysis of population structure of *Rosellinia necatrix* on *Cyperus esculentus* by mycelial compatibility and inter-simple sequence repeats (ISSR). **Plant Pathology**, London, v.59, p.179-185, 2010.
- BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MÜHLBAUER, F.; KAHL, G. Molecular markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.103, p.379-386, 2003.
- BONALDO, S.M.; PAULA, D.L.; CARRÉ-MISSIO, V. Avaliação da aplicação de fungicida em milho “safrinha” no município de Boa Esperança – Paraná. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.5, n.1, p.1-7, 2010.
- BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J.E.F. **Potencial de isolados de *Streptomyces* spp. no controle de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho**. Sete Lagoas. 2003 (Comunicado Técnico, ISSN 1679-0162).
- BRIDGE, P. The history and application of molecular mycology. **Mycologist**, Cambridge, v.16, p. 90-99, 2002.
- CARVALHO, M.C.; MACHADO, J.C.; VON PINHO, R.E.V.; POZZA, E.A.; PRADO, P.E.R. Relação do tamanho das sementes de milho e doses de fungicida no controle de *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.389-393, 2004.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; SEVERO, R.; DENTI, E.; TRENTO, S.; BLUM, M.M.C. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: Sandini, I.A.; Fancelli, A.L. (Eds.) **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava. Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. 2000.
- CASA, R.T., REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.355-361, 2003.
- CASA, R.T., REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.141-147, 2004.

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.

CASA, R.T.; MOREIRA, E.N.; BOGO, A.; SANGOI, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p.353-357, 2007.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A. da S.; PINTO, N.F.J. de A. **Doenças na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica/ Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-1150).

CASTELANI, L.; DUARTE, K.M.R. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 2, 2011.

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. **Current Science**, Bangalore, v.93, p.688-692, 2007.

CONAB. Indicadores da Agropecuária. Extraído de www.conab.com.br em 30/08/2014.

COSTA, D.M.; MACHADO, L.C.; BITTENCOURT, F.; PEREIRA, L.C. Qualidade do milho para nutrição animal comercializado a varejo e métodos para determinação da umidade. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v.5, n.2, p.25-34, 2013.

CRUZ, I.; VALICENTE, F.H.; VIANA, P.A.; MENDES, S.M. **Risco Potencial das Pragas de Milho e de Sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 40 p. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 150).

DENTI, E.A.; REIS, E.M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência das podridões da base do colmo e no rendimento de grãos do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p. 635-639, 2001.

DINIS, A.M.P.; LINO, C.M.; PENA, A.S. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Coimbra, v.44, p.553-557, 2007.

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.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A.L. **Produção de Milho**. Guaíba: Agropecuária. 2000. 360p.

DUARTE, R.P.; JULIATTI, F.C.; LUCAS, B.V.; FREITAS, P.T. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.4, p.112-122, 2009.

FANCELLI, A. L., DOURADO-NETO, D. **Milho: estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba. ESALQ/USP. 2003. 208p.

FONTOURA, D.D.A.; STANGARLIN, J.R.; TRAUTMANN, R.R.; SCHIRMER, R.; SCHWANTES, D.O.; ANDREOTTI, M. Influência da população de plantas na incidência de doenças de colmo em híbridos de milho na safrinha. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.28, n.4, p.545-551, 2006.

JARDINE, D.F.; LACA-BUENDÍA, J.P. Eficiência de fungicidas no controle de doenças foliares na cultura do milho. **FAZU em Revista**, Uberaba, v.6, p. 11-52, 2009.

JULIATTI, F.C.; SOUZA, R.M. Efeitos de épocas de plantio na severidade de doenças foliares e produtividade de híbridos de milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.21, n.1, p.103-112, 2005.

JULIATTI, F.C.; ZUZA, J.L.M.F.; SOUZA, P.P. DE.; POLIZEL, A.C. Efeito do genótipo de milho e a aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.2, p.34-41, 2007.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas**. Vol 2. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2005. 663p.

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.

LEE, H.K.; TEWARI, J.P.; TURKINGTON, T.K. Quantification of seedborne infection by *Rhynchosporium secalis* in barley using competitive PCR. **Plant Pathology**, London, v.51, p.217-224, 2002.

MANICA-BERTO, R.; PEGORARO, C.; MISTURA, C.C.; BRESOLIN, A.P.S.; RUFATO, A.R.; FACHINELLO, J.C. Similaridade genética entre cultivares de marmeleiro avaliadas por marcadores AFLP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.5, 2013.

MARANO, L.A.; SIMÕES, A.L.; OLIVEIRA, S.F.; MENDES-JUNIOR, C.T. Polimorfismos genéticos e identificação humana: o DNA como prova forense. **Genética na Escola**, v.5, n.1, p.53-56, 2010.

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

MENDES, M.C.; VON PINHO, R.G.; VON PINHO, E.V.R.; FARIA, M.V. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. **Ambiência**, Guarapuava, v.8, n.2, p.275-292, 2012.

MEUDT, H.M.; CLARKE, A.C. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. **Trends in Plant Science**, London, v.12, n.3, 2007.

MILACH SCK. Principais tipos de marcadores e suas características. In: MILACH, S. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: S. C. K. Milach, p. 17-28, 1998.

MIR, R.R.; VARSHNEY, R.K. Future prospects of molecular markers in plants. In: HENRY, R. (Ed.). **Molecular Markers in Plants**, First Edition. John Wiley & Sons, New York, p.169-190, 2013.

MOULIN, M.M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P.; GONZAGA, M.P. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.34, p.139-147, 2012.

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

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Dordrecht, v.128, p.9-17, 2002.

REIS, E.M.; MÁRIO, J.L. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar, e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.143-147, 2003.

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

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.3, p.85-91, 2011.

REZK, N.A., MANSOUR, H., GHONEIM, N.H., RIFAAT, M. Typing of *Salmonella typhi* strains isolated from Egypt by RAPD PCR. **3 Biotech**, v.2, p.17–25, 2012.

RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; SANGOI, A.B.L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.1003-1009, 2005.

SANGOI, L.; SILVA, P.R.F. da; SILVA, A.A. da; ERNANI, P.R.; HORN, D.; STRIEDER, M.L.; SCHMITT, A.; SCHWEITZER, C. Desempenho Agronômico de Cultivares de Milho em Quatro Sistemas de Manejo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.5, n.2, p.218-231, 2000.

SARTORETTO, L.M.; MELLO FARIAS, P.C. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. **Unoesc & Ciências – ACET**, Joaçaba v.1, n.2, p.155-162, 2010.

SHI, X.M., LONG, F., SUO, B. Molecular methods for the detection and characterization of foodborne pathogens. **Pure and Applied Chemistry**, v.82, p.69–79, 2010.

SPADARO, D.; GULLINO, M.L. State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, London, v.91, p.185–194, 2004.

TAKATSUKA, J. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-

simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.42, p.563-571, 2007.

THANGAVELU, R.; MUTHU KUMAR, K.; GANGA DEVI, P.; MUSTAFFA, M.M. Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Isolates (*Foc*) of India by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Analysis. **Molecular Biotechnology**, Dunedin, v.51, p.203-211, 2012.

TRENTO, S.M. **Distribuição de *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* nas principais regiões produtoras de sementes de milho no Brasil**. Pelotas. 2004. 66 p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnoloy**, London, v.23, n.1, p.48-55, 2005.

VEIGA, K.P.S.; ALVES, A.A.C.; MARTINS, M.I.G.; MELO, C.A.F.; CARVALHO, R. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.9, p.1082-1088, 2011.

WANG, S.; MIAO, X.; ZHAO, W.; HUANG, B.; LI, Z.; HUANG, Y. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **Mycological Research**, Cambridge, v.109, n.12, p.1364-1372, 2005.

WANG K, KANG JM, ZHOU H, SHUN Y, YANG QC, DONG J, MENG L. Genetic diversity of *Iris lactea* var. *chinensis* germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v.8, p.4856-4863, 2009.

WANI, S.A.; BHAT, M.A.; ZAFAR, B.; GANAI, M.A.; MAJID, N.; Role of molecular markers in silkworm improvement. **International Journal of Recent Scientific Research**, v.4, p.515-523, 2013.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, Saudi Arabia, v.15, p.129-144, 2011.

ZAMBOLIM, L.; CASA, R. T.; REIS, E. M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.585-595, 2000.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Realizar um levantamento de fungos associados a amostra de grãos de milho e estudar a variabilidade genética entre isolados de *Stenocarpella maydis*.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar o levantamento dos principais fungos causadores do complexo grão ardido em amostras de milho oriundas de diferentes locais de coleta;

- Estabelecer condições para crescimento micelial de *S. maydis in vitro*;

- Estimar a variabilidade genética de isolados monospóricos de *Stenocarpella maydis* utilizando marcadores moleculares ISSR.

Para apresentação dos materiais e métodos, resultados e discussão esta dissertação será apresentada em dois capítulos conforme segue:

CAPÍTULO I

LEVANTAMENTO EM GRÃOS DE MILHO DE FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO DA ESPIGA E ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES PARA CRESCIMENTO MICELIAL DE *Stenocarpella maydis*

CAPÍTULO II

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Stenocarpella maydis*

5. CAPÍTULO I
LEVANTAMENTO DE FUNGOS CAUSADORES DE PODRIDÃO DE ESPIGA EM
MILHO E ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES PARA CRESCIMENTO
MICELIAL DE *Stenocarpella maydis*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento dos principais fungos causadores do complexo grão ardido em milho e estabelecer condições para o crescimento micelial de *S. maydis*, a partir de culturas monospóricas deste fungo. As amostras de grãos de milho coletadas em diferentes municípios foram submetidas ao teste de patologia de sementes (*Blotter Test*). Para o crescimento micelial de *S. maydis*, foi instalado experimento no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com tratamentos em arranjo fatorial 4 (meios de cultura) x 2 (antibiótico) x 2 (regime de luz), com quatro repetições. Foram testados os meios de cultura aveia-ágar (AA), batata-dextrose-ágar (BDA), batata-sacarose-ágar (BSA) e meio de cenoura (MC). O antibiótico utilizado foi o cloranfenicol 150mg L⁻¹. Para o crescimento micelial e teste de competição de fungos causadores da podridão da espiga, foram utilizados os fungos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Stenocarpella maydis*. O delineamento foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e quatro repetições. Os resultados do teste de patologia de grãos indicaram que o fungo *Stenocarpella* spp foi o que apresentou a menor incidência (1,13%) e o *Fusarium* spp. a maior incidência (49,56%) nas amostras de grãos avaliados. Para o crescimento micelial, os meios BDA e BSA foram os que apresentaram maior velocidade de crescimento. Em relação ao crescimento micelial e competição de fungos causadores de podridão de espiga, destacou-se o fungo *Penicillium* spp., pois evidenciou elevado antagonismo ao patógeno *S. maydis*. Adicionalmente, os resultados permitem concluir que a baixa incidência de *S. maydis* nas amostras de grãos coletados seja devido ao efeito de inibição de outros fungos presentes nestes grãos de milho amostrados.

Palavras-chave: Patologia de grãos; *Blotter Test*; crescimento micelial.

ABSTRACT

The objective of this study was to survey the main fungi grain complex burned in corn and establish conditions for the mycelial growth of *S. maydis*, from monosporic cultures of this fungus. Samples of corn grains collected in different municipalities were subjected to seed pathology test (*Blotter Test*). For the mycelial growth of *S. maydis* experiment was conducted in a completely randomized design (CRD), with treatments in a factorial arrangement 4 (culture media) x 2 (antibiotic) x 2 (light regime), with four replications. The tested media were oatmeal agar (OA), potato dextrose agar (PDA), potato sucrose agar (PSA) and carrot medium (CM). The antibiotic used was chloramphenicol 150 mg L⁻¹. For mycelial growth and competition test fungi that cause ear rot, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Stenocarpella maydis* fungi were used. The design was completely randomized with eight treatments and four replications. The design was completely randomized with eight treatments and four replications. The results of the grain pathology test indicated that the fungus *Stenocarpella* spp. was the one with the lowest incidence (1.13%) and *Fusarium* spp. the highest incidence (49.56%) in the samples evaluated grains. For mycelial growth, the BDA and BSA media were those with the highest growth rate. Regarding the mycelial growth and competition of fungi that cause ear rot, stood out the fungus *Penicillium* spp., as evidenced high antagonism to the pathogen *S. maydis*. Additionally, the results showed that the low incidence of *S. maydis* in grain samples collected is due to the inhibitory effect of other fungi present in these sampled corn kernels.

Keywords: Grain pathology; *Blotter Test*; mycelial growth.

5.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas mais importantes da agricultura. Pela importância econômica na agricultura nacional tem recebido investimentos em melhoramento e técnicas de manejo, tornando-se um dos grãos mais importantes do Brasil. A utilização deste cereal vai desde a alimentação humana e animal até a indústria de alta tecnologia (DUARTE et al., 2009).

Em função da grande diversidade de épocas de semeadura nas diferentes regiões do País, a cultura fica no campo quase todo o ano, o que facilita a produção de inóculo de um grande número de patógenos, levando a graves problemas na produção (BONALDO et al., 2010). Além disso, com o uso de cultivares suscetíveis e o manejo cultural incorreto das lavouras, pode-se elevar o grau de incidência de doenças, incluindo as podridões de sementes e espigas (REIS et al., 2011).

As podridões de espiga ocorrem em todos os locais de cultivo do milho e podem ser causadas pelos patógenos presentes no colmo, pois estes são capazes de infectar as espigas e favorecer a ocorrência de grãos ardidos (RIBEIRO et al., 2005). Essas doenças são causadas por fungos de armazenamento como o *Penicillium* spp. e o *Aspergillus* spp. e de campo, como o *Fusarium verticillioides*, o *F. subglutinans*, o *F. graminearum*, o *F. sporotrichioides*, a *Gibberella zeae*, a *Stenocarpella macrospora* e a *Stenocarpella maydis* (PINTO et al., 2007).

A elevada incidência desses fungos nos grãos de milho ainda é um problema devido à produção de micotoxinas, que são compostos secundários ligados com a habilidade de biossíntese do fungo e das condições ambientais existentes (CASELA et al., 2006). Os fungos toxigênicos predominantes na cultura do milho são do gênero *Fusarium* spp., seguido por *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Stenocarpella* spp. (RAMOS et al., 2010).

A diagnose e a identificação, em laboratório, dos fungos presentes nos grãos é de extrema importância. O teste de sanidade de grãos, *Blotter Test*, é uma opção viável para a avaliação de fungos causadores de podridões de espigas, pois permite observar a ocorrência de cada fungo (MENDES et al., 2011).

Ramos et al. (2010) realizaram um levantamento da micoflora em grãos ardidos em sementes de milho e verificaram que as incidências fúngicas foram compatíveis com o padrão brasileiro, sendo os fungos mais incidentes *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., seguidos por *Aspergillus* spp., *Cladosporium* sp., *Cephalosporium* sp. e *Stenocarpella* spp.

O *S. maydis* é o principal agente etiológico da diplodia e a reprodução dessa espécie ocorre via conídios, predominando a forma anamórfica (CASA et al, 2006). O clima quente e

úmido propicia o processo de infecção e de desenvolvimento do fungo nas primeiras semanas após a polinização das plantas de milho (CASA et al., 2007).

A esporulação de *S. maydis* em diferentes meios de cultura foi estudada por Silva e Juliatti (2005). Esses autores observaram que para esporulação deste fungo, os meios de grãos de sorgo e o de farinha de aveia com ágar e vitamina propiciaram melhor produção de conídios, com $2,6 \times 10^6$ e $2,3 \times 10^6$ esporos mL⁻¹, respectivamente.

Os objetivos deste trabalho foram realizar o levantamento dos principais fungos causadores da podridão da espiga em diferentes amostras de grãos de milho e estabelecer condições para o crescimento micelial de *S. maydis in vitro* a partir de culturas monospóricas do patógeno.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Locais de coleta

Tabela 1 Amostras de grãos de milho coletadas de diferentes cultivares nas safras 2012/13 e 2013/14. Guarapuava: Unicentro, 2014.

MUNICÍPIO	AMOSTRAS	CONDIÇÃO DE COLETA	MUNICÍPIO	AMOSTRAS	CONDIÇÃO DE COLETA
Aquidaban	1	Armazenamento	Itapejara d'Oeste	1	Armazenamento
Assis	1	Campo		2	Campo
Chateaubriand					
Campo Mourão	1	Campo		3	Campo
Candói	1	Campo	Jaçanã	1	Armazenamento
Cascavel	1	Armazenamento	Marialva	1	Armazenamento
	2	Campo		2	Armazenamento
	3	Campo	Passo Fundo	1	Campo
Coronel Vivida	1	Armazenamento	Pinhão	1	Campo
	2	Campo	Quedas do Iguaçu	1	Campo
Cruzeiro d'Oeste	1	Campo	Salto do Lontra	1	Campo
	2	Campo	Santa Fé	1	Campo
	3	Campo	São João	1	Armazenamento
	4	Campo		2	Campo
	5	Campo	São Jorge d'Oeste	1	Campo
Dois Vizinhos	1	Armazenamento	São Pedro do Ivaí	1	Campo
	2	Campo		2	Campo
	3	Campo	Toledo	1	Armazenamento
Francisco Beltrão	1	Campo	Verê	1	Armazenamento
Iguatemi	1	Campo		2	Campo
	2	Campo		3	Campo
	3	Campo		4	Campo
Itambé	1	Campo	Vitorino	1	Campo
	2	Campo			

5.2.2 Local das análises

As análises foram conduzidas no laboratório de Fitopatologia do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro, *Campus* Cedeteg, em Guarapuava, Paraná.

5.2.3 Teste de patologia de grãos

Nas amostras coletadas retirou-se aleatoriamente grãos para realização do teste de patologia de grãos, *Blotter Test*, com a finalidade de se obter as estruturas dos fungos. Para esse teste, os grãos foram desinfestados em hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos e após, lavadas três vezes com água destilada esterilizada. Vinte e cinco grãos foram colocados em gerbox contendo papel de filtro esterilizado e umedecido com ágar-água a 5%. As caixas de germinação foram acondicionadas por 24 horas em temperatura ambiente sob luz fluorescente e após, mantidas em freezer à -20°C, por 24 horas. Posteriormente, os gerbox foram colocados, durante 15 dias em câmara de incubação à 25°C, com fotoperíodo de 12 horas (MARIO e REIS, 2001). A avaliação da incidência dos diferentes fungos nos grãos foi efetuada utilizando microscópio estereoscópico. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 45 tratamentos e oito repetições. Cada amostra foi considerada um tratamento (Tabela 1).

Estruturas dos fungos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BSA+ A (Batata-Sacarose-Ágar + Antibiótico) para crescimento do micélio. A diferenciação de *S. maydis* e *S. macrospora* foi baseada na observação morfológica dos conídios, através do tamanho e número de septos.

5.2.4 Isolamento de *Stenocarpella maydis*

5.2.4.1 Obtenção de cultura monospórica de *S. maydis*

Os picnídios contendo os conídios de *S. maydis* foram transferidos com auxílio de agulha estéril para placas de Petri com meio de cultura AA (aveia-ágar) que foram mantidas a 25°C até a formação de novos picnídios. Novamente, com auxílio de agulha estéril, um dos picnídios foi transferido para meio ágar-água e deixado por 12 horas em câmara de incubação tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) para germinação dos conídios. Após esse procedimento, para se obter uma cultura monospórica de *S. maydis*, apenas um conídio foi transferido para o meio BSA+A. Essa metodologia foi aplicada para todos os isolados de *S. maydis*. O isolado de Guarapuava foi proveniente da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Unicentro, Guarapuava – PR.

5.2.4.2 Crescimento micelial de *S. maydis*

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com os tratamentos dispostos em arranjo fatorial 4 (meios de cultura) x 2 (antibiótico) x 2 (regime de luz), com quatro repetições e repetido duas vezes. O primeiro fator foi os meios de cultura, o segundo a utilização ou não de antibiótico e o terceiro, o regime de luz empregado, sendo fotoperíodo de 12 horas e escuro contínuo. Os meios de cultura testados foram aveia-ágar (AA), batata-dextrose-ágar (BDA), batata-sacarose-ágar (BSA) e meio de cenoura (MC) e o antibiótico utilizado foi o cloranfenicol 500mg, na concentração de 150 mg L⁻¹.

Para determinar o crescimento micelial do fungo, discos de micélio de oito mm de diâmetro de um isolado monospórico de *S. maydis* foram repicados para o centro das placas de Petri com os respectivos meios de cultura identificados. Após a repicagem, as placas foram vedadas com fita PVC e colocadas em câmara incubadora tipo B.O.D., com temperatura ajustada para 25°C.

A primeira avaliação do crescimento micelial foi realizada 48 horas após a incubação e seguiu até 96 horas, quando em pelo menos uma placa o micélio atingiu a borda. Para essa avaliação utilizou-se medidas opostas da colônia fúngica com uso de paquímetro digital.

As medidas foram utilizadas para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) por meio da fórmula de Maguire, adaptada por Oliveira (1991):

$$IVCM = (\Sigma (D - Da)) / N$$

Sendo:

D = diâmetro médio da colônia (cm)

Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior (cm)

N = número de dias após a repicagem.

5.2.5 Crescimento micelial de fungos causadores de podridão de espiga

Para avaliar o crescimento micelial dos fungos *Aspergillus* ssp., *Fusarium* spp., *S. maydis* e *Penicillium* spp. discos de micélio de 5mm de diâmetro foram colocados em um dos lados da placa que continha meio BSA+A. O experimento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições (Tabela 2). Os experimentos foram realizados por duas vezes para confirmação dos resultados.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos relativos ao crescimento micelial fungos causadores de podridão de espiga. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Tratamentos	Descrição
01	<i>S. maydis</i>
02	<i>Fusarium</i> spp.
03	<i>Aspergillus</i> spp.
04	<i>Penicillium</i> spp.

A primeira avaliação do crescimento micelial foi realizada 48 horas após a incubação e seguiu até quando em pelo menos uma placa o micélio atingiu a borda. Para essa avaliação utilizou-se medidas horizontais das colônias fúngicas com uso de paquímetro digital.

Os resultados foram utilizados para o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) por meio da fórmula de Maguire, adaptada por Oliveira (1991):

$$IVCM = (\Sigma (D - D_a)) / N$$

Sendo:

D = diâmetro médio da colônia (cm);

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior (cm);

N = número de dias após a repicagem.

5.2.6 Competição de fungos causadores da podridão da espiga

Os isolados dos fungos utilizados neste experimento foram aqueles obtidos das amostras de grãos de milho, descritos anteriormente. O experimento foi feito utilizando o método de culturas pareadas, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (Tabela 3) e quatro repetições, por duas vezes para confirmação dos resultados. Cada placa de Petri de 10 cm, contendo meio de cultura BSA+A, recebeu dois discos de micélio de 5mm de diâmetro dispostos em dois pontos opostos e equidistantes das bordas da placa, contendo estruturas dos prováveis antagonistas, sendo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp, e do fitopatógeno *S. maydis*. Como tratamento testemunha utilizou-se *S. maydis* cultivado isoladamente, colocando um disco de micélio de 5 mm de diâmetro sempre no mesmo lado da placa em que o patógeno foi disposto (MELLO et al, 2007).

Tabela 3. Descrição dos tratamentos relativos à porcentagem de inibição de crescimento micelial de *S. maydis*. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Tratamentos	Descrição
01	<i>S. maydis</i>
02	<i>S. maydis</i> + <i>Fusarium</i> spp.
03	<i>S. maydis</i> + <i>Aspergillus</i> spp.
04	<i>S. maydis</i> + <i>Penicillium</i> spp.

As placas foram mantidas em câmaras de incubação do tipo B.O.D. a 25°C e fotoperíodo de 12 horas. As avaliações iniciaram após 48 horas de incubação e seguiram até o momento em que pelo menos numa placa do tratamento testemunha o micélio atingisse a borda oposta. Os diâmetros das colônias foram medidos e comparados com o crescimento do tratamento testemunha, através de paquímetro digital.

O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial foi feito através da aplicação da fórmula de Menten et al. (1976):

$$I(\%) = [(crtest - crtrat) / crtest] \times 100$$

Sendo:

crtest = crescimento radial testemunha;

crtrat = crescimento radial tratamento.

5.2.7 Análises estatísticas

Os dados do crescimento micelial de todos os experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste de Tukey a 1%. Quando necessário, os dados do crescimento micelial foram transformados pela raiz quadrada de $x+1$ para homogeneidade e normalidade. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2009).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Teste de patologia de grãos

Os fungos identificados e quantificados a partir das diferentes amostras de grãos de milho obtidos neste trabalho foram *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Stenocarpella* spp.

Os resultados do teste de patologia dos grãos evidenciaram que as incidências de *Fusarium* spp. *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Stenocarpella* spp. ficaram concentradas nas faixas de 0 a 95%, 4 a 85%, 0 a 53% e 0 a 50%, respectivamente (Tabela 4).

A maior incidência de *Fusarium* spp. (95%) foi observada no município de Dois Vizinhos (amostra 3) e a menor (0%), nos municípios de Dois Vizinhos (amostra 1) e Toledo. Para o *Penicillium* spp., a maior incidência (85%) ocorreu no município de Toledo e a menor em Dois Vizinhos (amostra 3), com 4%. Em relação à *Aspergillus* spp., a menor incidência (0%) foi encontrada nos municípios de Cascavel (amostras 2 e 3), São João (amostra 2) e São Pedro do Ivaí (amostra 2), e a maior (53%), em Coronel Vivida (amostra 1). Para o fungo *Stenocarpella* spp., observou-se que somente nos municípios de Vitorino e São Jorge d'Oeste este fungo foi incidente, com 50 e 1% de incidência, respectivamente (Tabela 4).

Barros e Juliatti (2012) fizeram levantamento de fungos em amostras de sementes de milho através de testes de sanidade de sementes, pelo método *Blotter Test* e verificaram que a maior incidência foi de *Fusarium* spp. com 37%, seguido de *Penicillium* spp. com 17%.

A microbiota fúngica de três híbridos de milho provenientes de três regiões distintas do estado de São Paulo foram avaliadas por Almeida et al. (2000), que observaram a incidência de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. com 71,10; 46,70 e 22,70% respectivamente. Os níveis de incidência relatados pelos autores corroboram com os aqui contrados, indicando que estes gêneros de fungos são predominantes sobre outros.

Dilkin et al. (2000) avaliaram cinco híbridos de milho recém-colhidos, com 18% de umidade, no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul e encontraram contaminações de 57,10; 23,60 e 14,3% de *Fusarium* spp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., respectivamente.

A alta incidência de *Fusarium* spp. pode ser explicada com base nas características do fungo, que apresenta elevada taxa de esporulação e dispersão (MENDES et al., 2011) em condições de umidade e temperatura mais elevadas (BENTO et al., 2012). O fungo *Fusarium* spp. não afeta necessariamente a germinação das sementes, porém causa deterioração e compromete o desenvolvimento radicular da plântula (MUNKVOLD e O'MARA, 2002).

Tabela 4. Incidência média de fungos causadores das podridões de espiga em grãos de milho oriundos de diferentes locais. Guarapuava, Unicentro, 2014.

MUNICÍPIO	AMOSTRAS	CONDIÇÃO DE COLETA	% INCIDÊNCIA			
			<i>Fusarium</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Stenocarpella</i> spp.
Aquidaban	1	Armazenamento	38	41	21	0
Assis	1	Campo	57	30	13	0
Chateaubriand						
Campo Mourão	1	Campo	46	42	12	0
Candói	1	Campo	33	35	32	0
Cascavel	1	Armazenamento	7	74	19	0
	2	Campo	49	51	0	0
	3	Campo	77	23	0	0
Coronel Vivida	1	Armazenamento	1	46	53	0
	2	Campo	63	27	10	0
Cruzeiro d'Oeste	1	Campo	35	45	20	0
	2	Campo	76	21	3	0
	3	Campo	50	29	21	0
	4	Campo	54	28	18	0
	5	Campo	48	30	22	0
Dois Vizinhos	1	Armazenamento	0	49	51	0
	2	Campo	82	10	8	0
	3	Campo	95	4	1	0
Francisco Beltrão	1	Campo	55	25	20	0
Iguatemi	1	Campo	72	21	7	0
	2	Campo	48	50	2	0
	3	Campo	64	34	2	0
Itambé	1	Campo	73	25	2	0
	2	Campo	48	48	4	0
Itapejara d'Oeste	1	Armazenamento	22	37	41	0
	2	Campo	63	23	14	0
	3	Campo	52	47	1	0
Jaçanã	1	Armazenamento	37	42	21	0
Marialva	1	Armazenamento	39	56	5	0
	2	Armazenamento	57	30	13	0
Passo Fundo	1	Campo	55	27	18	0
Pinhão	1	Campo	77	18	5	0
Quedas do Iguaçu	1	Campo	43	29	28	0
Salto do Lontra	1	Campo	69	16	15	0
Santa Fé	1	Campo	53	45	2	0
São João	1	Armazenamento	28	36	36	0
	2	Campo	49	51	0	0
São Jorge d'Oeste	1	Campo	59	20	20	1
São Pedro do Ivaí	1	Campo	86	13	1	0
	2	Campo	50	50	0	0
Toledo	1	Armazenamento	0	85	15	0
Verê	1	Armazenamento	28	28	27	0
	2	Campo	52	37	11	0
	3	Campo	88	8	4	0
	4	Campo	52	47	1	0
Vitorino	1	Campo	0	36	14	50

Cappelini et al. (2005) verificaram que, na ausência de condições favoráveis ao desenvolvimento da cultura, com disponibilidade hídrica, temperatura e preparo do solo, houve correlações negativas entre a incidência de *F. verticilloides* e o desempenho das sementes, sendo o maior efeito nocivo do fungo em sementes de baixa qualidade fisiológica.

A elevada incidência encontrada neste trabalho para os fungos *Penicillium* e *Aspergillus* possivelmente deve-se ao fato de algumas amostras de grãos serem provenientes de armazenamentos em silos e galpões e ainda a semente ser acometida por danos mecânicos durante a colheita, favorecendo a contaminação por fungos desses gêneros (BARROZO et al., 2011).

A presença dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* indica existência de grãos deteriorados, sendo que estes patógenos podem causar danos aos embriões, promovendo a descoloração e alterações nutricionais (MARQUES et al., 2009). O amido é o principal componente do milho (HENRIQUE et al., 2007), que o torna um substrato perfeito para contaminação fúngica (BANKOLE e ADEBANJO, 2003).

A composição nutricional dos grãos de milho pode ser afetada diretamente pelas condições climáticas, como o regime de chuvas, a temperatura e a umidade relativa, o que interfere na maior ou menor produtividade (REAL et al., 2013). Almeida et al. (2000) concluíram que estes fatores tem influência direta no nível de contaminação fúngica, como também no potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* e de *Fusarium moniliforme* para a produção de micotoxinas nos grãos deste cereal.

Em relação à baixa incidência de *Stenocarpella* spp. *in vitro*, pode ter ocorrido devido a presença de outros patógenos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., terem inibido seu crescimento durante o período de incubação. No campo, essa baixa incidência pode ser em consequência das condições não favoráveis ao seu desenvolvimento, como baixa umidade, temperaturas muito elevadas ou muito inferiores, utilização de fungicidas (CARVALHO et al., 2004) e híbridos resistentes (MENDES et al., 2011).

No total foram analisados 9.000 grãos não tratados com fungicidas, provenientes dos diferentes municípios de coleta. A partir dos dados relativos à incidência, verificou-se que *Fusarium* spp. foi o mais frequente com 49,56%, seguido por *Penicillium* spp. com 34,87%, *Aspergillus* spp. com 14,10% e o menos frequente, *Stenocarpella* spp. com 1,13% (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados por Nerbass et al. (2008) que avaliaram sementes de milho provenientes dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e constataram que o fungo *Fusarium* spp. foi o mais incidente com 14,4%, seguido por *Penicillium* spp. com 12,40%, *Aspergillus* spp. com 8,40% e *Stenocarpella* spp. com 0,10%.

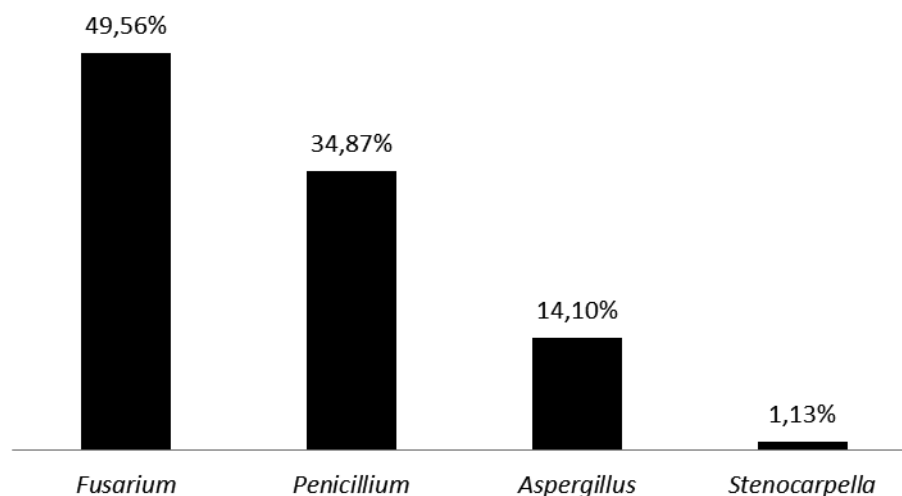


Figura 1. Porcentagem média de incidência de fungos em grãos de milho baseados na análise do *Blotter Test* de grãos oriundos de diferentes localidades dos estados do Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul. Guarapuava, Unicentro, 2014.

5.3.2 Crescimento micelial de *S. maydis*

O crescimento micelial de *Stenocarpella maydis* ocorreu em todos os meios, com ou sem antibiótico, quando submetidos aos dois diferentes regimes de luminosidade avaliados, porém houve diferença significativa somente entre os meios de cultura utilizados, destacando-se os meios BDA e BSA (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de velocidade de crescimento micelial (cm) de *S. maydis* em diferentes meios de cultura. Guarapuava, Unicentro, 2014.

Meios de cultura	Experimento 1	Experimento 2
BDA	2,42 a	1,83 a
BSA	2,59 a	2,22 a
MC	1,39 b	0,97 b
AA	0,55 c	1,13 b
CV(%)	7,30	11,16

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Casa et al. (2007) estudaram o efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento micelial de *S. maydis* e verificaram que o crescimento do micélio foi mais rápido sob fotoperíodo de 12 horas, sendo que o micélio do fungo atingiu a borda da placa antes que aquelas sob luz contínua. Os autores relataram que a maior taxa de crescimento micelial foi

observada numa amplitude de 23 a 28°C de temperatura de cultivo.

Kuhnem Júnior et al. (2012) estudando os efeitos da temperatura, regime de luz e substratos na produção e germinação de picnídios de *S. maydis*, demonstraram que houve diferença significativa entre os substratos testados, sendo que a maior taxa de germinação foi verificada utilizando grãos de cevada. Em relação ao regime de luz, os autores verificaram que não houve diferença significativa sobre a produção e porcentagem de germinação dos picnídios de *S. maydis* entre 12 horas de fotoperíodo e luz contínua. Porém, níveis mais baixos de produção e percentual de germinação foram encontrados sob condição de escuridão contínua, independente do substrato e da temperatura.

Em relação ao crescimento micelial do fungo foi observado que não houve diferença significativa entre os meios BDA e BSA no primeiro e no segundo experimento, mas nestes meios quando comparados com os meios MC e AA, o fungo apresentou maior velocidade de crescimento. Lazarotto et al. (2014) também observaram que os melhores meios de cultura para crescimento micelial de *Fusarium chlamydosporum* foram o BDA e o BSA. Isso pode ser explicado porque os meios BDA e BSA apresentam maior riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos, que estimulam a reprodução de vários fungos (SILVA e TEIXEIRA, 2012).

No experimento um, os meios de cenoura (MC) e aveia ágar (AA) diferiram estatisticamente entre si, sendo que o MC proporcionou maior crescimento micelial que AA, porém este resultado não ocorreu no segundo experimento, onde os meios MC e AA não diferiram estatisticamente.

5.3.3 Crescimento micelial e competição de fungos causadores da podridão da espiga

Após seis dias de incubação, período em que a testemunha atingiu a outra borda da placa, foi observado que houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo que a testemunha (*S. maydis*) apresentou maior índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) com 2,31 cm, seguida de *Fusarium* spp. com 1,74 cm e o menor IVCM foi verificado em *Aspergillus* spp., com 0,66 cm, porém este resultado não diferiu estatisticamente do crescimento de *Penicillium* spp., 0,84 cm (Tabela 6).

Tabela 6. Índice de velocidade de crescimento micelial de fungos causadores de podridão de espiga. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Tratamentos	Descrição	IVCM (cm)
01	<i>S. maydis</i>	2,31 a
02	<i>Fusarium</i> spp.	1,74 b
03	<i>Aspergillus</i> spp.	0,66 c
04	<i>Penicillium</i> spp.	0,84 c
CV(%)		7,46

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Em relação ao antagonismo de *S. maydis* com *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. observou-se que *Fusarium* spp. inibiu o desenvolvimento de *S. maydis* em 41,50% (Tabela 7). O fungo *Fusarium* spp. pode ter inibido o desenvolvimento de *S. maydis* devido as micotoxinas produzidas, principalmente fumonisina, que são elaboradas a partir de uma estrutura característica da esfinganina que é um composto intermediário na biossíntese dos esfingolipídeos (ALMEIDA et al., 2005).

Tabela 7. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Stenocarpella maydis* em cultivo pareado em meio de cultura BSA+A a 25°C. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Tratamentos	Descrição	% inibição
01	<i>S. maydis</i>	0,00
02	<i>S. maydis</i> + <i>Fusarium</i> spp.	41,50
03	<i>S. maydis</i> + <i>Aspergillus</i> spp.	39,50
04	<i>S. maydis</i> + <i>Penicillium</i> spp.	59,50
05	<i>S. maydis</i> + <i>Fusarium</i> + <i>Aspergillus</i> + <i>Penicillium</i>	52,50

Os esfingolipídeos são componentes essenciais da membrana das células de fungos (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004) e a rota biossintética desse componente, forma as ceramidas. Após a formação da ceramida, há adição de açúcares fosforilados. A primeira adição de fosfatidilinositol, catalisada pela fosfatidilinositolceramida sintase, é inibida por concentrações nanomolares de um depsipeptídeo cíclico produzido pela levedura *Aureobasidium pullulan* (NAGIEC et al., 1997).

Portanto, a semelhança das fumonisinas com a molécula de esfinganina é explicada pelo seu mecanismo de ação, que está relacionado com a inibição ou quebra dos esfingolipídeos, que estão relacionados com várias funções da célula, dentre elas, a morte celular (MERRIL JÚNIOR, 1991).

O fungo *Aspergillus* spp. foi o que apresentou menor antagonismo, com 39,50% de inibição em relação a *S. maydis* (Tabela 7). No tratamento cinco foi possível observar que os três fungos pareados inibiram o crescimento micelial de *S. maydis* em 52,50%.

Esses gêneros já foram relatados como antagonistas a fitopatógenos em estufa, como no trabalho de Ethur et al. (2005), que *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. inibiram o desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro. Neste trabalho, o cultivo pareado de *S. maydis* com os fungos *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. evidenciou que o patógeno demonstrou crescimento micelial comprometido. Assim, a baixa incidência de *S. maydis* nas diferentes amostras de grãos de milho aqui estudadas pode ter ocorrido devido ao crescimento dos demais fungos estudados, que afetaram o desenvolvimento normal deste patógeno sobre os grãos das espigas.

5.4 CONCLUSÕES

- Os fungos causadores de podridão da espiga identificados em grão de milho foram o *Fusarium* spp., o *Penicillium* spp., o *Aspergillus* spp. e o *Stenocarpella maydis*;
- *Fusarium* spp. e *Stenocarpella maydis* foram os fungos com o maior e menor índice de incidência nas amostras de grãos de milho, respectivamente;
- O crescimento micelial de *S. maydis* foi melhor nos meios BDA e BSA, independentemente do regime de luz e da utilização de antibiótico.
- O fungo *Penicillium* spp. evidenciou uma boa taxa de inibição do crescimento micelial de *S. maydis*.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M.A.B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L.M.V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, p.321-326, 2000.
- ALMEIDA, A.P.; SABINO, M.; FONSECA, H.; CORRÊA, B. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.64, p.1-9, 2005.
- BANKOLE, S.A.; ADEBANJO, A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island v.2, p.254-263, 2003.
- BARROS, F. C.; JULIATTI, F. C. Levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia no período 2001-2008. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.1, p.77-86, 2012.
- BARROZO, L.M.; GOMES, D.P.; SILVA, R.P.; ROSA, M.S.; SALUN, J.D.; SILVA, B.M.S. Qualidade física e sanitária de sementes de *Zea mays* L. colhidas por colhedoras radiais. **Scientia Agropecuaria**, Trujillo, v.2, p.239-246, 2011.
- BENTO, L.F.; CANEPPELE, M.A.B.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE, P.J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.71, p.44-49, 2012.
- BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.5, p.159-172, 2004.
- BONALDO, S.M.; PAULA, D.L.; CARRÉ-MISSIO, V. Avaliação da aplicação de fungicida em milho “safrinha” no município de Boa Esperança – Paraná. **Campo Digit@al**, Campo Mourão, v.5, n.1, p.1-7, 2010.
- CAPPELINI, L. T. D.; PANIZZI, R. de C.; VIEIRA, R. D.; GALLI, J. A. Effect of *Fusarium moniliforme* on the quality of maize seeds. **Científica**, Jaboticabal, v.33, n.2, p. 185-191, 2005.
- CARVALHO, M.C.; MACHADO, J.C.; VON PINHO, R.E.V.; POZZA, E.A.; PRADO, P.E.R. Relação do tamanho das sementes de milho e doses de fungicida no controle de *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.389-393, 2004.
- 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.
- CASA, R.T.; MOREIRA, E.N.; BOGO, A.; SANGOI, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p.353-357, 2007.
- CASELA, C.R.; FERREIRA, A. da S.; PINTO, N.F.J. de A. **Doenças na Cultura do Milho**.

Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Circular Técnica/ Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-1150).

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; HICKMANN, J.L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.137-141, 2000.

DUARTE, R.P.; JULIATTI, F.C.; LUCAS, B.V.; FREITAS, P.T. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.4, p.112-122, 2009.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; DA SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; DA ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.127-133, 2005.

HENRIQUE, W.; BELTRAME FILHO, J.A.; LEME, P.R.; LANNA, D.P.D.; ALLEONI, G.F.; COUTINHO FILHO, J.L.V.; SAMPAIO, A.A.M. Avaliação da silagem de grãos de milho úmido com diferentes volumosos para tourinhos em terminação. Desempenho e característica de carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.1, p.183-190, 2007.

KUHNEM JÚNIOR, P.R.; CASA, R.T.; BOGO, A.; AGOSTINETO, L.; BOLZAN, J.M.; MIQUELUTI, D.J. Effects of temperature, light regime and substrates on the production and germination of *Stenocarpella maydis* pycnidiospores. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá v.34, n.1, p.11-16, 2012.

LAZAROTTO, M.; MEZZOMO, R.; MACIEL, C.G.; FINGER, G.; MUNIZ, M.F.B. Mycelia growth and sporulation of *Fusarium chlamydosporum* species complex under diferente culture conditions. **Revista Ciências Agrárias**, Recife, v.57, n.1, p.35-40, 2014.

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

MARQUES, O.J.; VIDIGAL FILHO, P.S.; DALPASQUALE, V.A.; SCAPIM, C.A.; PRICINOTTO, L.F.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.31, n.4, p.667-675, 2009.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R., BRAÚNA, L.M., PÁDUA, R.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, Habana, v.11, p.3-9, 2007.

MENDES, M.C.; VON PINHO, R.G.; MACHADO, J.C.; ALBUQUERQUE, C.J.B.; FALQUETE, J.C.F. Qualidade sanitária de grãos de milho com e sem inoculação a campo dos fungos causadores de podridões de espiga. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.5, p.931-939, 2011.

MENTEN, J.O.M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia**

Brasileira, Brasília, v.1, n.2, p.57-66, 1976.

MERRIL JUNIOR, A.H. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 23, p.83-104, 1991.

MUNKVOLD, G.P.; O'MARA, J.K. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium spe* cies. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p.143-150, 2002

NAGIEC, M.M.; NAGIEC, E.E.; BALTISBERGER, J.A.; WELLS, G.B.; LESTER, R.L.; DICKSON, R.C. Sphingolipid Synthesis as a Target for Antifungal Drugs: Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomices cerevisiae* by the AUR1 gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.272, p.9809-9817, 1997.

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 Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.7, n.1, p.30-36, 2008.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

RAMOS, A.T.M; MORAES, M.H.D.; CARVALHO, R.V.; CAMARGO, L.E.A. Levantamento da micoflora presente em grãos ardidos e sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.3, p.257-259, 2010.

REAL, G.S.C.P.C.; COUTO, H.P.; MATOS, M.B.; CHIQUIERI, M.S.L.; CHIQUIERI, J. Milho: influência de sua qualidade no setor avícola brasileiro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.12, n.3, p.326-335, 2013.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.3, p.85-91, 2011.

RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; SANGOI, A.B.L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, p.1003-1009, 2005.

SANTOS, P.L.; FIRMINO, A.C.; TOZZE JUNIOR, H.J.; BARROS, S.A.; FURTADO, E.L. Comportamento de *Ceratocystis* sp. “in vitro” sob diferentes temperaturas, meios de cultura e pH. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, Avaré, v.1, n.1, p.07-17, 2011.

SILVA, A.R.; JULIATTI, F.C. Esporulação de *Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* em diferentes meios de cultura. **Biosciense Journal**, Uberlândia, v.21, n.3, p.127-131, 2005.

SILVA, F. DE A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, J.L.; TEIXEIRA, R.N.V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agro@ambiente On-line**, Boa vista, v.6, n.1, p.47-52, 2012.

6. CAPÍTULO II

VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Stenocarpella maydis*

RESUMO

A podridão do colmo e da espiga do milho são doenças causadas pelo fungo *Stenocarpella maydis* e causa prejuízos econômicos para a agricultura. O conhecimento da biologia da espécie é importante para as técnicas de manejo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de seis isolados monospóricos de *S. maydis* utilizando o marcador molecular ISSR. O DNA dos isolados de *S. maydis* foi extraído pelo método CTAB e a amplificação dos fragmentos através da técnica da PCR utilizando 42 *primers* ISSR. Os índices PIC (conteúdo de informação polimórfica), MI (índice do marcador) e RP (poder de resolução) foram calculados para determinar os 10 *primers* ISSR mais informativos para os estudos da variabilidade genética de *S. maydis*. A similaridade genética entre os indivíduos foi calculada com base no coeficiente de Jaccard e o dendrograma de similaridade entre os isolados a partir do método UPGMA. Dos 42 *primers* utilizados, 50% apresentaram bons produtos de amplificação. A média de polimorfismo foi de 90,44%. Os valores de PIC, MI e RP variaram de 0,31 a 0,45, 4,84 a 18,46 e 0,40 a 10,00, respectivamente. A análise de agrupamento evidenciou a mesma tendência na topologia dos dendrogramas gerados, possibilitando separar isolados de *S. maydis* do mesmo município (I2, I3, I5 e I6 – Vitorino) em grupos diferentes e não agrupando o I4 (Guarapuava) em relação aos demais isolados, evidenciando a alta variabilidade genética. Os *primers* UBC 848, 873, 808, 811, 807, 827, 861, 868, 809 e 835 foram os que apresentaram melhores resultados para análise da variabilidade genética. A similaridade genética média entre os isolados foi de 34%, mostrando a existência de alta variabilidade genética entre os seis isolados de *S. maydis*.

Palavras-chave: Podridão da espiga; ISSR; similaridade.

ABSTRACT

The stem rot diseases and maize cob are caused by the *Stenocarpella maydis* fungus and cause economic damage to agriculture. The knowledge of species' biology is important for management techniques. This study aimed to evaluate the genetic variability of six single spore isolates of *S. maydis* using ISSR molecular marker. The isolated DNA of *S. maydis* was extracted by the CTAB method, and the amplification of fragments by PCR technique using 42 ISSR *primers*. The PIC (polymorphic information content), MI (marker index) and RP (resolving power) indices were calculated to determine the 10 ISSR *primers* more informative for studies of genetic variability of *S. maydis*. The genetic similarity among individuals was calculated using Jaccard coefficient and the dendrogram of similarity among isolates from the UPGMA method. Of the 42 *primers*, 50% had good amplification products. The polymorphism average was 90.44%. The PIC, MI and RP values ranged between 0.31 to 0.45, 4.84 to 18.46 and 0.40 to 10.00, respectively. Cluster analysis showed the same trend in the topology of the generated dendrograms, allowing separate isolates of *S. maydis* the same city (I2, I3, I5 and I6 - Vitorino) in different groups and not gathering the I4 (Guarapuava) in relation to other isolated, suggesting a high genetic variability. The UBC 848, 873, 808, 811, 807, 827, 861, 868, 809 and 835 *primers* showed the best results for the analysis of genetic variability. The mean genetic similarity among isolates was 34%, showing the existence of high genetic variability among the six isolates of *S. maydis*.

Keywords: Ear rot; ISSR; similarity.

6.1 INTRODUÇÃO

O fungo *S. maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc.; *D. zae* (Scw.) Lev.] é o agente etiológico da podridão de diplodia, também conhecida como podridão do colmo e da espiga, na cultura do milho (BRESSAN e FIGUEIREDO, 2003; CASA et al., 2006).

Os sintomas na espiga iniciam quando a palha despigmenta e fica com coloração parda. Quando a infecção ocorre logo após a polinização, o micélio do fungo aparece entre os grãos, a espiga vai tornando-se esbranquiçada, as palhas ficam aderidas aos grãos, e estes ficam enrugados e leves. Porém, quando são infectadas no final do ciclo, não há manifestações externas, mas é possível ver o micélio do fungo crescendo entre os grãos. Os grãos, quando infectados pela doença, apresentam coloração cinza fosco a marrom (DUARTE et al., 2009).

As sementes infectadas são a principal fonte de inóculo, pois a infecção inicia-se na espiga pelos conídios disseminados pelo vento e o micélio do fungo cresce entre os grãos deixando o inóculo viável por muito tempo (CASA et al., 2004; CASA et al., 2006; REIS e MARIO, 2003). O manejo das podridões de grãos envolve ações integradas de manejo, como rotação de culturas, manejo do solo, época de semeadura, destruição de restos culturais, utilização de cultivares resistentes e sementes livres de patógenos (JULIATTI et al., 2007).

A detecção de fungos através da análise do DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em combinação com marcadores moleculares provou ser uma alternativa viável para diagnosticar várias doenças e tem sido utilizada para identificar e quantificar vários patógenos de plantas (LEE et al. 2002; BARROCAS et al., 2012).

Os marcadores moleculares são sequências específicas de DNA capaz de diferenciar dois ou mais indivíduos. Esta ferramenta molecular possibilitou identificar e diferenciar linhagens, híbridos, cultivares e espécies. Além disso, estimar o grau de parentesco, a diversidade e variabilidade genética, detectar polimorfismos a níveis de *loci* específicos, de *locus* de características quantitativas (QTLs) e ao nível da totalidade do genoma. Adicionalmente, facilitam a construção de mapas de ligação e o mapeamento genômico de características agronômicas (BENKO-ISEPPON et al., 2003; MOULIN et al., 2012; MIR e VARSHNEY, 2013).

Um dos marcadores moleculares baseados em PCR amplamente utilizados são os ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat). A técnica ISSR amplifica fragmentos entre duas

regiões microssatélites repetidas e em sentidos opostos sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma. O *primer* desse marcador ancora na extremidade 5' ou 3', com uma a quatro bases específicas ou degeneradas (WANG et al., 2009). O marcador ISSR possibilita realizar análises de variabilidade genética entre espécies associadas e em populações de fungos patogênicos, podendo fornecer informações úteis para o manejo de doenças (CHADHA e GOPALAKRISHNA, 2007; TAKATSUKA, 2007).

Stenocarpella maydis é um fungo patogênico importante na cultura do milho e nada se conhece sobre a variabilidade genética desta espécie utilizando marcadores. Portanto, visto que o uso de marcadores moleculares é uma ferramenta importante na geração de dados genéticos sobre fungos, este trabalho objetivou avaliar a variabilidade genética entre isolados monospóricos de *Stenocarpella maydis* utilizando o marcador molecular ISSR.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Local das análises

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Unicentro, *Campus Cedeteg*, Guarapuava, Paraná.

6.2.2 Extração de DNA

O DNA de seis isolados de *S. maydis* (Tabela 8), obtidos no Capítulo I, foi extraído de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1987). A partir de culturas puras, o micélio do fungo foi raspado com espátula e macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo, até obter um pó bem fino. Ao tubo contendo micélio macerado foi acrescentado 700 µl de tampão de extração (20mM de EDTA, 100mM de Tris-HCl pH 8,0, 1,4M de NaCl, 2% de CTAB, 0,4% de β-mercaptoetanol). Os tubos foram levados ao banho maria a 65 °C por 45 min. O DNA foi separado da solução por precipitação com clorofórmio álcoolisoamílico (24:1) e centrifugação. Em seguida foram realizadas sucessivas lavagens com etanol para obtenção de um DNA limpo. Depois de seco, o DNA foi ressuspenso em tampão TE tratado com RNase. O DNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

Tabela 8. Codificação e local de coleta dos isolados de *Stenocarpella maydis* utilizadas neste estudo. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Código	Município	Estado	Código	Município	Estado
I1	São Jorge d'Oeste	PR	I4	Guarapuava	PR
I2	Vitorino R ₃	PR	I5	Vitorino R ₈	PR
I3	Vitorino R ₄	PR	I6	Vitorino R ₁	PR

6.2.3 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose a 0,90%, corado com brometo de etídeo. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentado com sistema digital. Para determinação da quantidade de DNA em cada amostra foi utilizado um padrão de peso molecular conhecido o DNA do fago Lambda (λ).

6.2.4 Amplificação do DNA

Para as análises moleculares foram testados 42 *primers* ISSR (Tabela 9), para que destes fossem selecionados os *primers* mais informativos para *S. maydis*.

As reações de amplificação do DNA de cada isolado via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 µL contendo: 20 ng de DNA, 0,2µM de *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U de Taq DNA Polimerase e tampão para PCR 1X. Para a amplificação, o termociclador foi programado para desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45s, temperatura de anelamento dos *primers* por 45s e 72°C por 90s, e por fim foi feito um passo a 72°C por cinco minutos para extensão final dos fragmentos.

Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose a 1,8% a 110 V corado com brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹). O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentado por sistema de captura digital. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb.

6.2.5 Análises estatísticas - ISSR

Somente os fragmentos que apresentaram bom padrão de resolução foram considerados. Os produtos de amplificação dos *primers* ISSR (Tabela 9) foram classificados visualmente quanto à presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos em análise. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada dividindo o número de fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos amplificados.

Neste trabalho foram utilizados três índices para determinar os *primers* ISSR mais informativos sendo: o PIC (conteúdo de informação polimórfica), o MI (índice do marcador) e RP (poder de resolução).

O PIC foi calculado como proposto por Roldán-Ruiz et al. (2000):

$$PIC = 2 f_1 (1 - f_2)$$

Sendo:

f_1 = frequência dos fragmentos presentes no marcador no mesmo *locus*;

$(1 - f_2)$ = frequência dos fragmentos ausentes no marcador no mesmo *locus*.

Tabela 9. *Primers* ISSR utilizados para amplificação do DNA de seis isolados de *Stenocarpella maydis* provenientes dos municípios de Guarapuava, São Jorge d'Oeste e Vitorino. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Primer	Sequência*	TA°C	Primer	Sequência*	TA°C
UBC 807	(AG) ₈ T	52	UBC 848	(CA) ₈ RG	55
UBC 808	(AG) ₈ C	50	UBC 852	(CT) ₈ RA	52
UBC 809	(AT) ₈ T	55	UBC 855	(AC) ₈ YT	55
UBC 810	(GA) ₈ T	52	UBC 856	(AC) ₈ YA	55
UBC 811	(GA) ₈ C	53	UBC 857	(AC) ₈ YG	54
UBC 813	(CT) ₈ T	50	UBC 858	(TG) ₈ RT	52
UBC 814	(CT) ₈ A	50	UBC 859	(TG) ₈ RC	55
UBC 815	(CT) ₈ G	53	UBC 860	(TG) ₈ RA	52
UBC 817	(CA) ₈ A	52	UBC 861	(ACC) ₆	52
UBC 820	(GT) ₈ T	52	UBC 864	(ATG) ₆	50
UBC 822	(TC) ₈ A	55	UBC 866	C(TCC) ₅ TC	55
UBC 823	(TC) ₈ C	55	UBC 868	(GGA) ₆	50
UBC 824	(TC) ₈ G	50	UBC 873	(GACA) ₄	50
UBC 826	(AC) ₈ C	52	UBC 878	GGA(TGGA) ₃ T	54
UBC 827	(AC) ₈ G	53	UBC 881	(GGGGT) ₃	53
UBC 828	(TG) ₈ A	50	UBC 886	VDV(CT) ₇	55
UBC 834	(AG) ₈ YT	52	UBC 889	DBD(AC) ₇	52
UBC 835	(AG) ₈ YC	54	UBC 890	VHV(GT) ₇	54
UBC 836	(AG) ₈ YA	53	UBC 891	HVH(TG) ₇	54
UBC 840	(GA) ₈ YT	53	UBC 899	CATGGTGTGGTTCATTGTTCCA	55
UBC 843	(CT) ₈ RA	54	UBC 900	ACTTCCCCACAGGTAAACACA	55

* Y = (C, T); R = (A, G); H = (A, C, T); B = (C, G, T); V = (A, C, G); D = (A, G, T)

TA°C: temperatura de anelamento do *primer* em graus Celcius.

O índice de marcador (MI) foi calculado de acordo com Varshney et al. (2007):

$$MI = PIC \times EMR$$

A relação efetiva múltipla (EMR) foi calculada da seguinte maneira:

$$EMR = n \times \beta,$$

Sendo:

n = total de fragmentos de amplificação do primer / n° total de isolados analisados;

β = número de fragmentos polimórficos / número de total de fragmentos amplificados.

O poder de resolução (RP), isto é, a distribuição de alelos pelos genótipos amostrados foi calculada de acordo com Prevost e Wilkinson (1999):

$$RP = \sum I_b$$

Sendo I_b calculado pela fórmula:

$$I_b = 1 - (2 |0,5 - p|)$$

Sendo:

p = proporção de indivíduos que contém o fragmento.

Após obtenção dos índices foram calculadas as correlações entre PIC e MI, MI e RP, RP e PIC. Com base nos resultados foram selecionados os 10 *primers* mais informativos para estudos genéticos com o fungo *S. maydis*. A primeira seleção foi definida de acordo com a combinação dos valores dos índices PIC, MI e RP. O segundo critério de seleção baseou-se nos maiores valores do PIC como MI. O terceiro critério adotou-se os maiores valores para o RP e MI. O quarto critério, os maiores valores do RP e do PIC. O último critério levou-se em consideração apenas o maior valor para o RP. Os *primers* selecionados em cada etapa foram eliminados para as próximas seleções.

A similaridade genética entre os isolados de *S. maydis* foi estimada com base no coeficiente de similaridade de Jaccard utilizando o *software* NTSYS 2.2 (Numerical Taxonomy Analyses System) (ROHLF, 2007) e o dendrograma de similaridade entre os isolados do fungo foi obtido pelo método UPGMA. Os coeficientes de similaridade entre os isolados de *S. maydis* bem como a análise de agrupamento dos isolados foram realizadas para os quatro grupos de *primers* ISSRs mais informativos de acordo com os critérios de seleção de *primers* pré-estabelecidos. Um primeiro momento foi utilizado todos os 21 *primers* ISSR, em segundo momento, somente os *primers* mais informativos (com base nos três índices calculados), em terceiro, utilizando os 10 *primers* com maiores valores de PIC e em quarto, os 10 *primers* com maiores valores de RP.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Seleção dos *primers* ISSRs

Entre os 42 *primers* testados nos seis isolados de *S. maydis*, 21 (50%) apresentaram bom perfil de amplificação. Os *primers* UBC 859 e UBC 886 evidenciaram um excelente padrão de amplificação e são apresentados na Figura 2. O número total de fragmentos amplificados pelos 21 *primers* foi de 243, média de 11,5 fragmentos por *primer* (Tabela 10). O número de fragmentos polimórficos foi de 219, com índice médio de polimorfismo de 90,44%. A porcentagem de fragmentos polimórficos variou de 38,40% para o *primer* UBC 891 a 100% para os *primers* UBC 808, 809, 810, 815, 823, 836, 848, 855, 868, 873 e 878. O número de fragmentos amplificados por *primer* e a porcentagem de polimorfismo são apresentados na Tabela 10. O maior número de fragmentos amplificados foi obtido com os *primers* UBC 848 e UBC 890 (18 fragmentos), e o menor com o UBC 828 (5 fragmentos). De maneira geral, os *primers* ISSR amplificaram fragmentos com tamanho individual de 100 a 1700 pb (Tabela 10).

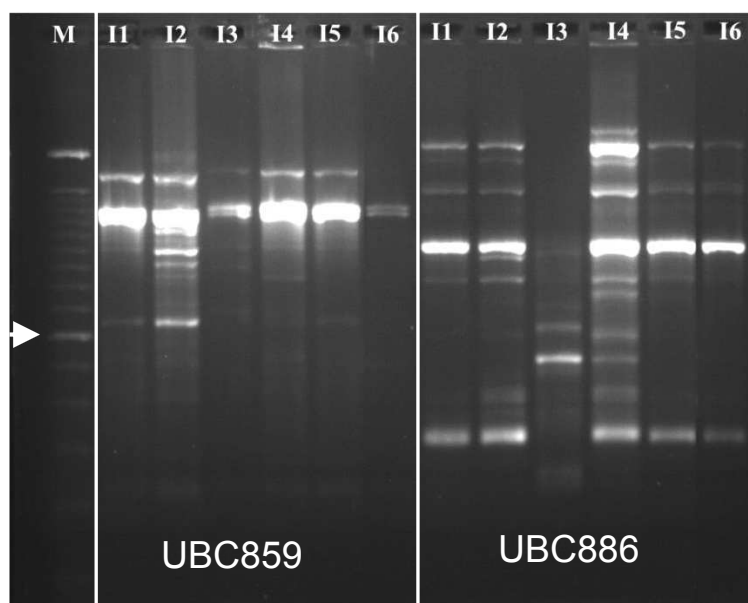


Figura 2. Padrão de amplificação dos *primers* ISSR UBC 859 e UBC 886 nos seis isolados de *S. maydis*. A seta a esquerda indica o fragmento de 600 pb. M = marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Li et al. (2012) estudaram a diversidade genética de isolados de *Phytophthora capsidi* utilizando marcadores moleculares ISSR. Dos 40 *primers* analisados, 13 (32%) produziram

fragmentos claros e robustos. A comparação destes dados com os obtidos neste trabalho evidenciaram a maior eficiência dos *primers* ISSR na análise genética de *S. maydis* do que com o fungo *Phytophthora capsidi*.

Com relação à porcentagem de polimorfismo, Nghia et al. (2008) genotipando isolados de *Corynespora cassiicola* a partir de oito *primers* ISSR amplificaram 106 fragmentos de DNA, com índice de polimorfismo de 91,50%. Archana et al. (2014), trabalhando com o mesmo marcador em *Bipolaris oryzae* relataram elevado polimorfismo (83,33 a 95,45%). Estes resultados encontrados na literatura junto com o presente trabalho confirma o potencial do marcador molecular ISSR para identificar polimorfismo em fungos. O índice de polimorfismo tem sido utilizado por alguns autores para prever a diversidade genética nas espécies. Desta forma, é possível inferir que o elevado polimorfismo molecular encontrado para este marcador esteja associado a alta variabilidade genética entre os seis isolados de *S. maydis*.

Os valores de PIC variaram de 0,31 (UBC 836 e UBC 891) a 0,45 (UBC 811), com média de 0,36 (Tabela 10). Segundo Roldán-Ruiz et al. (2000) o valor do PIC de cada marcador é representado pela probabilidade do marcador estar presente ou ausente em dois indivíduos aleatórios da população. O PIC varia de zero para os marcadores monomórficos a 0,5 para os marcadores presentes em 50% dos genótipos e ausente nos outros 50%. O PIC comprova a existência de variabilidade genética, ou seja, quanto mais próximo de 0,50 for o valor de PIC, maior será a capacidade do *primer* em diferenciar indivíduos de um grupo bem como possibilita estimar a variabilidade genética dentro e entre populações.

O índice MI variou de 4,84 (UBC 891) a 18,46 (UBC 808), com média de 14,01 (Tabela 10), sendo índices superiores aos relatados por Archana et al. (2014), a partir de *primers* ISSR em isolados de *B. oryzae* (MI 3,57 a 8,32). Segundo Tatikonda et al. (2009), não há um valor ideal para MI, assim pode-se analisar os resultados desse índice comparando os valores de cada *primer* utilizado no estudo, os melhores serão sempre os que apresentarem os maiores valores.

Para o cálculo de MI, os valores de PIC são levados em consideração e são multiplicados pelo índice que considera o número total de fragmentos e o número de fragmentos polimórficos, considerando a média entre os níveis de polimorfismo e a capacidade de identificação de *locus* polimórficos, mostrando que o MI é o índice que mede a utilidade do marcador (VARSHNEY et al., 2007).

Tabela 10. Relação dos 42 primers ISSR utilizados com seus respectivos parâmetros em *Stenocarpella maydis*. Número total de fragmentos amplificados (NT), intervalo dos fragmentos (IF), porcentagem de polimorfismo (%P), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), índice de marcador (MI) e poder de resolução (RP). Os primers sombreados foram os 10 com melhores valores combinados dos índices PIC, MI e RP. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Primer	Produto de amplificação	NT	IF	%P	PIC	MI	RP
UBC 807	✓	12	300 - 1200	91,6	0,36	16,20	5,60
UBC 808	✓	8	350 - 1300	100	0,38	18,46	4,40
UBC 809	✓	15	250 - 850	100	0,42	17,25	0,68
UBC 810	✓	8	340 - 850	100	0,34	13,78	3,66
UBC 811	✓	9	300 - 1400	77,7	0,45	17,28	0,74
UBC 813	-	-	-	-	-	-	-
UBC 814	-	-	-	-	-	-	-
UBC 815	✓	9	300 - 1700	100	0,36	14,75	0,55
UBC 817	-	-	-	-	-	-	-
UBC 820	-	-	-	-	-	-	-
UBC 822	-	-	-	-	-	-	-
UBC 823	✓	8	500 - 1600	100	0,32	12,93	0,41
UBC 824	-	-	-	-	-	-	-
UBC 826	-	-	-	-	-	-	-
UBC 827	✓	11	430 - 1250	54,5	0,37	9,89	3,20
UBC 828	✓	5	500 - 1630	80	0,36	11,70	2,00
UBC 834	-	-	-	-	-	-	-
UBC 835	✓	16	100 - 1100	93,7	0,42	16,03	0,66
UBC 836	✓	15	150 - 800	100	0,31	12,90	0,44
UBC 840	-	-	-	-	-	-	-
UBC 843	-	-	-	-	-	-	-
UBC 848	✓	18	350 - 1600	100	0,38	15,50	10,00
UBC 852	-	-	-	-	-	-	-
UBC 855	✓	9	480 - 1600	100	0,33	13,50	0,44
UBC 856	-	-	-	-	-	-	-
UBC 857	-	-	-	-	-	-	-
UBC 858	-	-	-	-	-	-	-
UBC 859	✓	12	230 - 1590	91,6	0,37	14,06	0,57
UBC 860	-	-	-	-	-	-	-
UBC 861	✓	10	420 - 1200	90	0,33	12,37	4,33
UBC 864	-	-	-	-	-	-	-
UBC 866	-	-	-	-	-	-	-
UBC 868	✓	9	390 - 1300	100	0,32	13,00	4,00
UBC 873	✓	12	280 - 1200	100	0,41	16,87	8,66
UBC 878	✓	10	400 - 1600	100	0,35	14,17	0,50
UBC 881	-	-	-	-	-	-	-
UBC 886	✓	16	230 - 1650	87,5	0,36	14,71	0,53
UBC 889	-	-	-	-	-	-	-
UBC 890	✓	18	300 - 1600	94,4	0,36	14,12	0,56
UBC 891	✓	13	390 - 1600	38,4	0,31	4,84	0,40
UBC 899	-	-	-	-	-	-	-
UBC 900	-	-	-	-	-	-	-

Em relação ao RP, os valores variaram de 0,40 (UBC 891) a 10,00 (UBC848), com média de 2,49 (Tabela 10). Segundo Estrada et al. (2007), o RP dos 14 primers ISSR utilizados para avaliar a diversidade genética de isolados de *Beauveria bassiana* variou de 1,10 para o *primer* UBC 891 a 8,90 para o UBC 888. Esses autores observaram que os *primers* com os maiores valores de RP foram os UBC 888, 809, 885 e 810 com 8,90; 7,90; 6,60 e 6,60, respectivamente. Por outro lado, o UBC 873 foi o único *primer* capaz de diferenciar os onze isolados analisados.

O cálculo de RP considera indiretamente o número de fragmentos polimórficos de um *primer* e a quantidade de indivíduos em que esses fragmentos estão presentes. O poder de resolução do *primer* apresenta várias aplicações, sendo a mais importante, a capacidade de separar indivíduos dentro de uma população. Para este índice não há um valor máximo estabelecido, portanto, quanto maior for o valor de RP, maior será o poder de distinção entre os indivíduos (PREVOST e WILKINSON, 1999).

A partir da estimativa dos índices de PIC, MI e RP, foram selecionados os *primers* ISSR mais informativos. Obedecendo aos critérios estabelecidos na metodologia de seleção de *primers*, para o primeiro critério foram selecionados os *primers* UBC 848, 873, 808 e 811; para o segundo UBC 809 e 835; o terceiro UBC 807, o quarto UBC 827 e o quinto UBC 861 e 868, totalizando 10 *primers* (Tabela 10).

Segundo TATIKONDA et al. (2009), os índices PIC, MI e RP são importantes e eficientes na identificação dos *primers* mais informativos. Neste trabalho, a utilização dos índices PIC, MI e RP permitiu selecionar 10 *primers* ISSR mais informativos para separar os isolados de *S. maydis* (Tabela 10).

6.3.2 Variabilidade genética

A similaridade genética entre os seis isolados de *Stenocarpella maydis* obtida a partir de 219 fragmentos polimórficos amplificados através de 21 *primers* ISSR oscilou de 0,27 a 0,53, com similaridade média entre todos os isolados de 0,37. No dendrograma construído com os 21 *primers* (Figura 3A) foi possível observar dois grupos, um constituído por três isolados (I1, I2 e I3) e o outro por dois (I5 e I6). O isolado I4 de Guarapuava permaneceu individualizado.

A similaridade genética entre os isolados de *S. maydis* obtida a partir dos 10 *primers* mais informativos (selecionados com base nos três índices) (Tabela 10) variou de 0,27 a 0,53, com média de 0,33. No dendrograma gerado por estes *primers* é observada a formação de um

grupo com quatro isolados (I1, I2, I3 e I6) e os isolados I4 e I5 não se agruparam (Figura 3B).

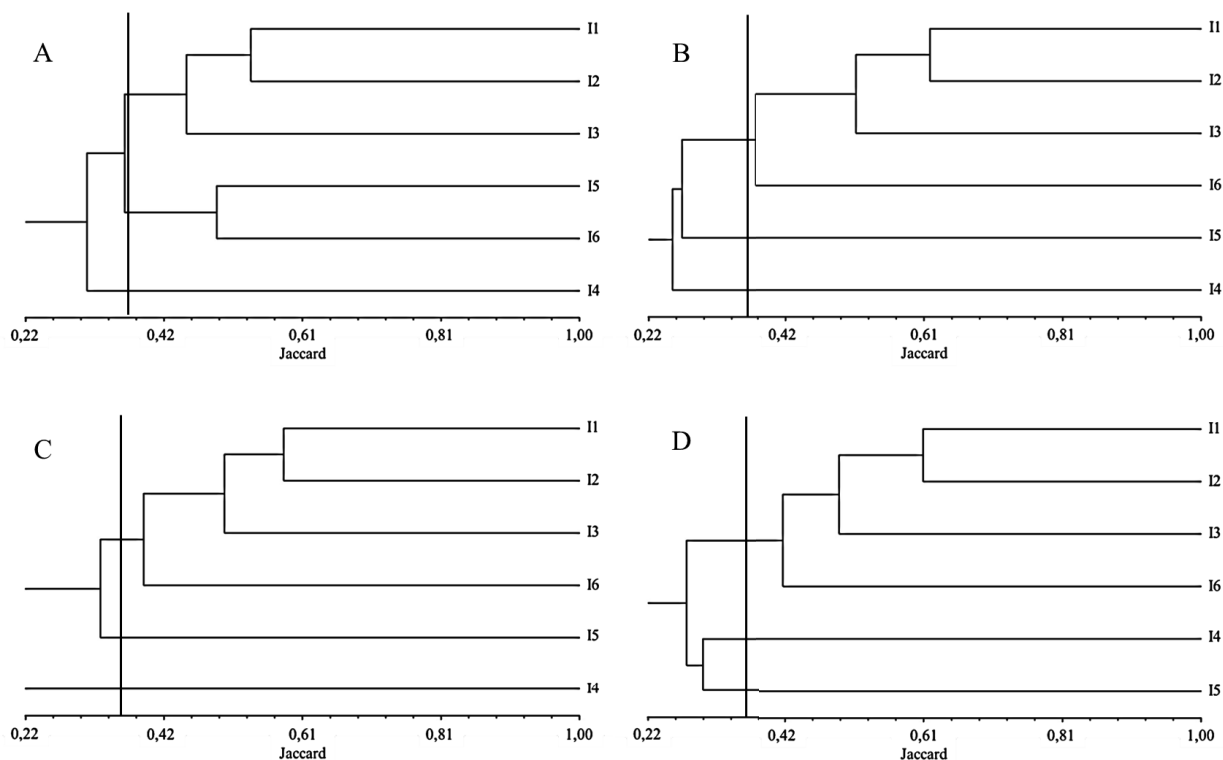


Figura 3. Dendrogramas dos seis isolados de *Stenocarpella maydis* gerados com dados dos marcadores ISSR. **A)** dendrograma obtido utilizando 21 *primers*; **B)** dendrograma obtido utilizando os 10 *primers* mais informativos; **C)** dendrograma obtido utilizando os 10 *primers* com melhores valores de PIC; **D)** dendrograma obtido utilizando os 10 *primers* com melhores valores de RP. I1 - São Jorge d'Oeste; I2 - Vitorino R₃; I3 - Vitorino R₄; I4 - Guarapuava; I5 - Vitorino R₈; I6 - Vitorino R₁. Guarapuava: Unicentro, 2014.

Segundo Roldan-Ruiz et al. (2000), o PIC representa a probabilidade de se achar o marcador em seus dois estados, de ausência e de presença. Para marcadores dominantes os valores de PIC variam de zero, para marcadores monomórficos, até 0,50 para aqueles que estiverem ausentes em metade da amostra e presentes na outra metade. Portanto, quanto mais próximo de 0,50, maior a eficiência do marcador, sendo ampla a sua possibilidade de uso para determinar a variabilidade genética. A similaridade genética entre os isolados de *S. maydis* utilizando os 10 *primers* com maiores valores de PIC (UBC 848, 873, 808, 827, 811, 809, 835, 859, 890 e 815.) oscilou entre 0,16 e 0,58, com média de 0,34. No dendrograma gerado com os *primers* de maior PIC foi observada semelhança com o dendrograma formado pelos

primers mais informativos, que agruparam os isolados I1, I2, I3 e I6 em um grupo e os isolados I4 e I5 não foram agrupados (Figura 3C).

O RP do *primer* é um índice que caracteriza e indica seu potencial discriminatório, o qual está relacionado com a capacidade de separar os isolados de uma mesma população (PREVOST e WILKINSON, 1999). Para este índice não há um valor ótimo estabelecido, portanto os *primers* são classificados de acordo com os maiores valores, sendo estes os que apresentam maior capacidade de discriminação dos genótipos (PREVOST e WILKINSON, 1999). A similaridade genética entre os isolados estudados, obtida utilizando os 10 *primers* com melhores valores de RP (UBC 848, 873, 807, 808, 861, 868, 810, 827, 828 e 811) variou de 0,20 a 0,60, com média de 0,35. O dendrograma gerado a partir destes *primers* mostrou semelhança com os dendrogramas formados pelos 10 *primers* mais informativos e pelos 10 *primers* com os maiores valores de PIC (Figura 3D).

Com relação a similaridade entre isolados de fungos, Kandan et al. (2014) estudaram a diversidade molecular de 36 isolados de *Bipolaris sativa* utilizando oito *primers* ISSR e verificaram que a similaridade genética entre eles variou de 22,10% a 95,50%, sendo que o método UPGMA agrupou os isolados em quatro grandes grupos e dois subgrupos com isolados individuais. Neste trabalho, a menor similaridade obtida tanto com os 21 *primers* ou com os 10 mais informativos foi de 27%.

O isolado I2, de Vitorino mostrou-se mais semelhante ao isolado I1 proveniente do município de São Jorge d'Oeste do que com os outros isolados de Vitorino em todos os dendrogramas (Figura 3). Essa semelhança pode ser explicada devido à proximidade dos municípios, pois os grãos infectados, principal fonte de inóculo (CASA et al., 2006), podem ser armazenados no mesmo local e transportados de um município para outro frequentemente.

A comparação dos dendrogramas obtidos (Figura 3) evidenciou que os isolados I5 e I6 foram agrupados somente no dendrograma com os dados dos 21 *primers*. Também foi observado que o isolado I4 foi agrupado com o isolado I5 somente no dendrograma obtido com os dados de RP (Figura 3). Isso pode ter ocorrido pelo fato do isolado I4 ser de Guarapuava, município mais distante dos outros locais de coleta. Mesmo com estas pequenas diferenças, a disposição de todos os dendrogramas mostra que em todos eles não foi alterado a tendência de posicionamento dos isolados em relação aos seus pares mais próximos (figura 3).

O agrupamento de isolados de mesma origem em grupos diferentes (Figura 3) demonstra que os isolados possuem alta variabilidade genética dentro do mesmo município. Resultados semelhantes foram encontrados por Kumar e Sharma (2011) que observaram que os isolados de *Trichoderma viride* formaram dois subgrupos dentro do *cluster*, sendo que os

isolados Tv2, T15 e TV32 formaram o primeiro subgrupo enquanto Tv4 e TvChen TvNir formaram o outro. Entretanto, o isolado TV12 não se agrupou com nenhum dos dois subgrupos e apresentou pouca similaridade com o ramo principal.

Dinolfo et al. (2010) estudaram a variação genética entre isolados de *Fusarium poae* utilizando marcadores ISSR e verificaram que isolados da mesma região geográfica apareceram em grupos diferentes, considerando os vários ambientes agrícolas onde foram coletados os isolados. Os nossos resultados e os obtidos por Dinolfo et al. (2010) demonstraram que as condições ecológicas, o isolamento geográfico e a rotação de culturas não tiveram efeito significativo sobre a distribuição da variabilidade genética dos isolados.

Os dados relativos aos 10 *primers* mais informativos neste trabalho se destacaram, demonstrando alta variabilidade genética entre os isolados, pois a média entre os coeficientes de similaridade foi a mais baixa (0,33), ou seja, os isolados foram similares em 33%. Estes resultados mostram que a discriminação entre os isolados pode ser feita utilizando somente os *primers* mais informativos. A diminuição do número de *primers* minimiza o custo e o tempo de trabalho em laboratório para realizar as análises (VARSHNEY et al., 2007).

A boa caracterização molecular depende do emprego de marcadores que apresentem boa reprodutibilidade e polimorfismo capazes de diferenciar os isolados quanto a sua variabilidade. Os *primers* ISSR demonstraram alto polimorfismo, reforçando que a base genética do fungo *S. maydis* é ampla. Esses resultados corroboram com a baixa similaridade genética (33%) observada entre os isolados. O poder resolutivo do marcador molecular ISSR possibilita inferir sobre a redução no número de *primers* a serem utilizados em *S. maydis*, ou seja, de 42 *primers* para 10, mantendo a diferenciação eficiente entre os isolados.

A análise da variabilidade genética entre isolados de interesse torna-se muito vantajoso no processo de conhecimento da base genética da espécie, principalmente em relação a fungos de grande interesse agrícola, como *S. maydis*, causador da podridão do colmo e da espiga em milho.

6.4 CONCLUSÕES

- Os *primers* UBC 848, 873, 808, 811, 807, 827, 861, 868, 809 e 835 combinados ofereceram boa discriminação dos isolados de *S. maydis*, podendo substituir os demais *primers* estudados.

- A análise de agrupamento evidenciou a mesma tendência na topologia dos dendrogramas gerados, possibilitando separar isolados de *S. maydis* do mesmo município (I2, I3, I5 e I6 – Vitorino) em grupos diferentes e não agrupando o I4 (Guarapuava) em relação aos demais isolados.

- A similaridade genética média entre os isolados foi de apenas 34%, demonstrando que os isolados de *S. maydis* possuem alta variabilidade genética.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados com o *Blotter Test* mostraram maior incidência do fungo *Fusarium* spp. e menor de *Stenocarpella maydis* nas diferentes amostras de grãos de milho. A baixa incidência de *S. maydis* é causada, em parte, pelos fungos *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. inibirem seu crescimento.

- Para o crescimento micelial de *S. maydis* os meios BDA e BSA se destacaram nos dois experimentos, independentemente do regime de luz e da utilização de antibiótico.

- Os fungos *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. inibiram o crescimento de *S. maydis* em 41,50, 59,50 e 39,50%, respectivamente.

- Os *primers* UBC 848, 873, 808, 811, 807, 827, 861, 868, 809 e 835 combinados ofereceram boa discriminação dos isolados de *S. maydis*, podendo substituir os 42 *primers* utilizados. A similaridade genética média entre os isolados foi de 34%, evidenciando alta variabilidade genética entre os isolados de *S. maydis*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHANA, B.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S. Genetic diversity and population structure among isolates of the brown spot fungus, *Bipolaris oryzae*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v.13, p.238-244, 2014.

BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.da C.; ALMEIDA, M.F. BOTELHO, L.S.; VON PINHO, E.V.R. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. Associated with maize seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.34, n.2, p.218-224, 2012.

BENKO-ISEPPON, A.M.; WINTER, P.; HÜTTEL, B.; STAGGINUS, C.; MÜHLBAUER, F.; KAHL, G. Molecular markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.103, p.379-386, 2003.

BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J.E.F. **Potencial de isolados de *Streptomyces* spp. no controle de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho.** Sete Lagoas. 2003 (Comunicado Técnico, ISSN 1679-0162).

CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIM, L. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.141-147, 2004.

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.

CHADHA, S.; GOPALAKRISHNA, T. Comparative assessment of REMAP and ISSR marker assays for genetic polymorphism studies in *Magnaporthe grisea*. **Current Science**, Bangalore, v.93, p.688-692, 2007.

DINOLFO, M.I.; STENGLIN, S.A.; MORENO, M.V.; NICHOLSON, P.; JENNINGS, P.; SALERNO, G.L. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. **European Journal of Plant Pathology**, The Netherlands, v.127, p.483-491, 2010.

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.

DUARTE, R.P.; JULIATTI, F.C.; LUCAS, B.V.; FREITAS, P.T. Comportamento de diferentes genótipos de milho com aplicação foliar de fungicida quanto à incidência de fungos causadores de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.4, p.112-122, 2009.

ESTRADA, M.E.; CAMACHO, M.V.; BENITO, C. The molecular diversity of diferente isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using inter-macrossatelites (ISSRs). **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v.12, p.240-252, 2007.

JULIATTI, F.C.; ZUZA, J.L.M.F.; SOUZA, P.P. DE.; POLIZEL, A.C. Efeito do genótipo de milho e a aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**,

Uberlândia, v.23, n.2, p.34-41, 2007.

KANDAN, A.; AKHTAR, J.; SINGH, B., DIXIT, D.; CHAND, D.; ROY, A.; RAJKUMAR, S.; AGARWAL, P.C. Molecular diversity of *Bipolaris oryzae* infecting *Oryza sativa* in India. **Phytoparasitica**, Netherlands, v.43, p.5-14, 2014.

KUMAR. M.; SHARMA, P. A study on corroboration between DNA markers (RAPD, ISSR, ITS) and bio-control efficacy of *Trichoderma* species. **Fungal Genomics & Biology**, Orlando, v.1, p.1-6, 2011.

LEE, H.K.; TEWARI, J.P.; TURKINGTON, T.K. Quantification of seedborne infection by *Rhynchosporium secalis* in barley using competitive PCR. **Plant Pathology**, London, v.51, p.217-224, 2002.

LI, P.; CAO, S.; DAI, Y.L.; LI, X.L.; XU, D.F.; GUO, M.; PAN, Y.M.; GAO, Z.M. Genetic diversity of *Phytophthora capsidi* (Pythiaceae) isolates in Anhui Province of China based on ISSR-PCR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p.4285-4296, 2012.

MIR, R.R.; VARSHNEY, R.K. Future prospects of molecular markers in plants. In: HENRY, R. (Ed.). **Molecular Markers in Plants**, First Edition. John Wiley & Sons, 2013.

MOULIN, M.M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P.; GONZAGA, M.P. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.34, p.139-147, 2012.

NGHIA, N.A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M.P.; MALIK, A.; NAPIS, S. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.166, p.189-201, 2008.

PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR *primers* applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.98, p.107-112, 1999.

REIS, E.M.; MÁRIO, J.L. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar, e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, p.143-147, 2003.

ROHLF, R. **NTSYS pc version 2.21m. Numerical taxonomy analysis system for windows**. New York, Exeter Softwares, 2007.

ROLDÁN-RUIZ. I.; DENDAUI. J.; BOCKSTAELE, E.V.; DEPICKER, A.; LOOSE, M.DE. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, p. 125-134, 2000.

TAKATSUKA, J. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. **Applied Entomology and Zoology**, v.42, p.563-571, 2007.

TATIKONDA, L.; WANI, S.P.; KANNAN, S.; BEERELLI, N.; SRUDEVI, T.K.; HOISINGTON, D.A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R.K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jathopha curcas* L. biofuel plant. **Plant Science**, Ottawa, v.176, p.505-513, 2009.

VARSHNEY, R.K.; CHABANE, K.; HENDRE, P.S.; AGGARWAL, R.K.; GRANER, A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, Ottawa, v.17, p.638-649, 2007.

WANG K, KANG JM, ZHOU H, SHUN Y, YANG QC, DONG J, MENG L. Genetic diversity of *Iris lactea* var. *chinensis* germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v.8, p.4856-4863, 2009.