

179

Circular
TécnicaSete Lagoas, MG
Dezembro, 2012**Autores**

Rodrigo Veras da Costa¹
Eng.-Agr., D.Sc. em
Fitopatologia, Pesquisador
da Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG, rodrigo.
veras@embrapa.br

Dagma Dionísia da Silva²
Eng.-Agr., D.Sc. em
Fitopatologia, Pesquisadora
da Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG,
dagma.silva@embrapa.br

Luciano Viana Cota³
Eng.-Agr., D.Sc. em
Fitopatologia, Pesquisador
da Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG, luciano.
cota@embrapa.br

Fabrcio Eustáquio Lanza⁴
Eng.-Agr., Doutorando
em Fitopatologia na
Universidade Federal
de Viçosa, Viçosa, MG,
falanza@bol.com.br

Metodologia para Avaliação da Reação de Genótipos de Milho à *Fusarium verticillioides* em Casa de Vegetação

Introdução

O fungo *Fusarium verticillioides* (=F. moniliforme) é um patógeno amplamente distribuído nas principais regiões produtoras de milho do Brasil e do mundo, e é considerada uma das principais espécies de fungos que infectam essa cultura (KOMMEDAHL; WINDELS, 1981; NELSON et al., 1993). Esse patógeno causa doenças em, praticamente, todos os estágios de desenvolvimento da planta, causando severas podridões em raízes, colmos e grãos (KEDERA et al., 1992; MUNKVOLD et al., 1997). Além do seu efeito na produtividade e na qualidade dos grãos, *F. verticillioides* pode produzir vários compostos tóxicos, como ácido fusárico, fusarinas, giberelinas, moniliforminas e fumonisinas (MARASAS, et al., 1984; NELSON et al., 1993). Recentemente, as fumonisinas têm recebido grande atenção por estarem associadas a um grande número de enfermidades em animais domésticos e de laboratório (HARRISON et al., 1990; NELSON et al., 1993; OSWEILER et al., 1992; RILEY et al., 1993; ROSS et al., 1991). Além disso, o consumo de alimentos contaminados com essas micotoxinas está associado à incidência de câncer de esôfago em humanos em diversas partes do mundo. As fumonisinas podem ser encontradas tanto em grãos podres (ardidos) quanto em grãos assintomáticos (BACON et al., 1992; BULLERMAN; TSAI, 1994).

O uso de cultivares resistentes é a principal medida para o manejo de *F. verticillioides* em milho. Portanto, é de suma importância a constante avaliação e a seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento. Para isso, torna-se necessário o estabelecimento de métodos padronizados de inoculação que permitam uma avaliação rápida e segura da reação de genótipos de milho quanto à infecção causada por esse patógeno. Considerando a inexistência de métodos rápidos e padronizados para a inoculação de *F. verticillioides* em plântulas de milho, esse trabalho teve como objetivo propor uma metodologia para a inoculação de *F. verticillioides* em plântulas de milho, em condição de casa de vegetação.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG. O isolado de *F. verticillioides* utilizado foi obtido de uma amostra de grãos de milho cultivado na área experimental da Embrapa.

Obtenção do Isolado de *F. verticillioides* e Preparo do Inóculo

Os grãos, provenientes das amostras de campo, foram previamente desinfestados utilizando-se hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos e, posteriormente, foram lavados em água destilada estéril por três vezes. Após a lavagem, os grãos foram transferidos para caixas tipo Gerbox contendo papel de filtro umedecido, as quais foram mantidas em câmara tipo BOD sob fotoperíodo de 12 horas a 25 °C, durante 10 dias. Os grãos apresentando sintomas de podridão e com colônias (crescimento micelial) típicas de *Fusarium* spp. foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo

meio BDA, a partir da qual foram obtidas culturas monospóricas do fungo. Por meio de preparo de lâminas, o fungo *F. verticillioides* foi identificado com base na análise morfológica típica, que se resume na produção de longas cadeias de microconídios produzidas em monofíalides (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Para o preparo do inóculo no método Canjiquinha + Fungo (CF) foi utilizado, como substrato, milho triturado (canjiquinha) esterilizado. Para tal, a canjiquinha foi acondicionada em Erlenmeyers de 1 litro, preenchendo o volume de 800 ml, e a umidade foi padronizada para 20%. Os Erlenmeyers contendo a canjiquinha foram autoclavados duas vezes a 120 °C por 30 minutos. Posteriormente, 10 discos de micélio (1 cm de diâmetro) retirado de colônias de *F. verticillioides* dias foram transferidos para cada Erlenmeyers contendo a canjiquinha autoclavada. Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora tipo BOD durante 20 dias a 25 °C e luz intermitente.

No método da suspensão de esporos do fungo (SEF), o isolado monospórico de *F. verticillioides* foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA, as quais foram incubadas em câmara BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante 10 dias. Após esse período, foram adicionados 10 ml de água estéril em cada placa e os esporos foram removidos do meio com o auxílio de um pincel. A suspensão de esporos obtida foi ajustada para 10^6 esporos/ml com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Condução do Experimento em Casa de Vegetação

Foram utilizados dois híbridos simples da Embrapa Milho e Sorgo, BRS1040 e BRS1010, os quais foram semeados em vasos de 5 litros contendo terra vermelha de barranco (horizonte C). Foram avaliados dois métodos de preparo do inóculo: 1) canjiquinha + fungo (CF); e 2) suspensão de esporos do fungo (SEF). Em ambos casos, o inóculo foi adicionado ao solo imediatamente antes do plantio. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 28 tratamentos dispostos em arranjo fatorial triplo $2 \times 2 \times 7$ (cultivar x método de inoculação x doses) e quatro repetições. Cada

parcela foi constituída por um vaso contendo quatro plantas. No método CF, foram utilizadas as doses de 0, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 gramas de canjiquinha colonizadas por *F. verticillioides*. No método SEF, foram utilizadas as doses de 0, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 ml da suspensão de esporos. Além destes tratamentos, foram utilizadas testemunhas adicionais compostas das mesmas quantidades mencionadas anteriormente de canjiquinha e água, porém, estéreis (sem a presença do fungo).

Para a inoculação no método CF e testemunhas, a canjiquinha, contendo ou não o fungo, foi incorporada nos primeiros 5 cm do solo (Figura 1). Posteriormente, os híbridos foram semeados, na proporção de quatro sementes por vaso, os quais foram mantidos em casa de vegetação a 28 °C e irrigadas diariamente. No método SEF, a suspensão de inóculo e a água estéril foram vertidas sobre a semente no solo, antes do fechamento das covas. Posteriormente, as plantas foram mantidas em casa de vegetação nas mesmas condições citadas anteriormente.

As avaliações foram realizadas aos 30 dias após plantio (DAP). A primeira avaliação consistiu da contagem do número de plantas vivas por vaso (stand). Posteriormente, as plantas foram cortadas na altura do colo, pesadas, acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa a 60 °C. Após 48 horas, os sacos foram retirados da estufa e pesados novamente, determinando-se, por diferença, o peso da matéria fresca (PMF) e o peso da matéria seca (PMS), respectivamente.

Os dados de stand, PMF e PMS foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$, submetidos aos testes de normalidade, homogeneidade, aditividade do modelo e análise de variância (Teste F). Quando necessário, os dados foram submetidos a uma análise de regressão (ajuste do modelo linear simples ou quadrática) a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR.



Figura 1. Ilustração processo inoculação com *Fusarium verticillioides* pelo método Canjiquinha + Fungo (CF) em vasos, sob condição de casa de vegetação (A). Detalhes da mistura do inóculo no solo do vaso (B).

Resultados e Discussão

Para a variável stand, os fatores método de preparo do inóculo, doses e a interação tipo de inóculo x doses foram significativos ($P \leq 0,05$). Os demais fatores e interações não foram significativos. Para as variáveis PMF e PMS foram significativos os fatores método de preparo do inóculo, híbridos, doses e a interação tipo de método x doses. As demais interações não foram significativas.

O stand médio de plantas foi menor para o método CF do que para o método SEF: 3,1 e 3,8 plantas/vaso, respectivamente. No método CF, foi verificada uma tendência de redução no stand de plantas com o aumento das doses do inóculo aos 30 DAP (Figuras 2 e 3). O valor de R^2 para essa variável foi de 0,95. O stand para o tratamento testemunha foi de 3,91 plantas/vaso. O menor valor de plantas viáveis, 1,06 plantas/vaso, foi detectado no tratamento submetido à maior dose de inóculo, 200 g/vaso (Figura 3). O método SEF não foi eficiente em transmitir *F. verticillioides* para as plântulas de milho uma vez que não foram observadas diferenças significativas no número de plantas viáveis entre a testemunha (sem inóculo) e todas as doses de inóculo testadas (Figura 2).

Quanto às variáveis PMF e PMS, foram detectadas diferenças entre os métodos utilizados. Para ambas as variáveis, o método

CF resultou em menor valor quando comparado ao método SEF. Os valores PMF nos métodos CF e SEF foram de 10,9 e 25,3 g/vaso, respectivamente. Para PMS, os valores obtidos nos métodos CF e SEF foram de 2,2 e 3,4 g/vaso, respectivamente. Foram detectadas diferenças significativas para PMF e PMS entre os híbridos utilizados. O híbrido BRS1040 apresentou valores de PMF (18,4 g/vaso) e PMS (3,0 g/vaso) superiores ao observado para o híbrido BRS1010, 16,3 e 2,6 g/vaso, respectivamente.

No método CF, foi verificado aumento de PMF e PMS até a dose de 75 g/vaso (Figura 4). A partir dessa dose, houve uma redução acentuada de ambas as variáveis até a dose de 200 g/vaso de inóculo. No método SEF, não foi verificada qualquer tendência de redução dos valores de PMF e PMS entre os valores obtidos nas diferentes doses e a testemunha sem inóculo, confirmando que este não é um bom método para a infestação do solo com *F. verticillioides* (Figura 4). Nas testemunhas constituídas pelas diferentes doses de canjiquinha sem a presença do fungo, foi observado um aumento linear de PMF e PMS com o aumento da quantidade de canjiquinha adicionada aos vasos. Esses resultados evidenciam que a canjiquinha pura atua fornecendo nutrientes e promovendo um aumento do crescimento das plantas. Esses resultados explicam o aumento em PMF e PMS observado

nos tratamentos inoculados pelo método CF até a dose de 75 g/vaso. A menor quantidade de inóculo do fungo, presente nas doses iguais e inferiores a 75 g/vaso, foi insuficiente para interferir nos processos de germinação das sementes e no crescimento das plantas, porém, a quantidade de canjiquinha presente nestas doses foi suficiente para fornecer nutrientes às plantas, permitindo um maior crescimento destas quando comparadas às testemunhas. Esses

resultados demonstram uma maior eficiência do método CF para a inoculação de *F. verticillioides* em plântulas de milho, sob condição de casa de vegetação. A baixa eficiência do método SEF é atribuída, provavelmente, ao fato de o fungo *F. verticillioides* necessitar de um substrato para o seu estabelecimento e a sua sobrevivência, no solo, até o momento da infecção na semente ou plântula.

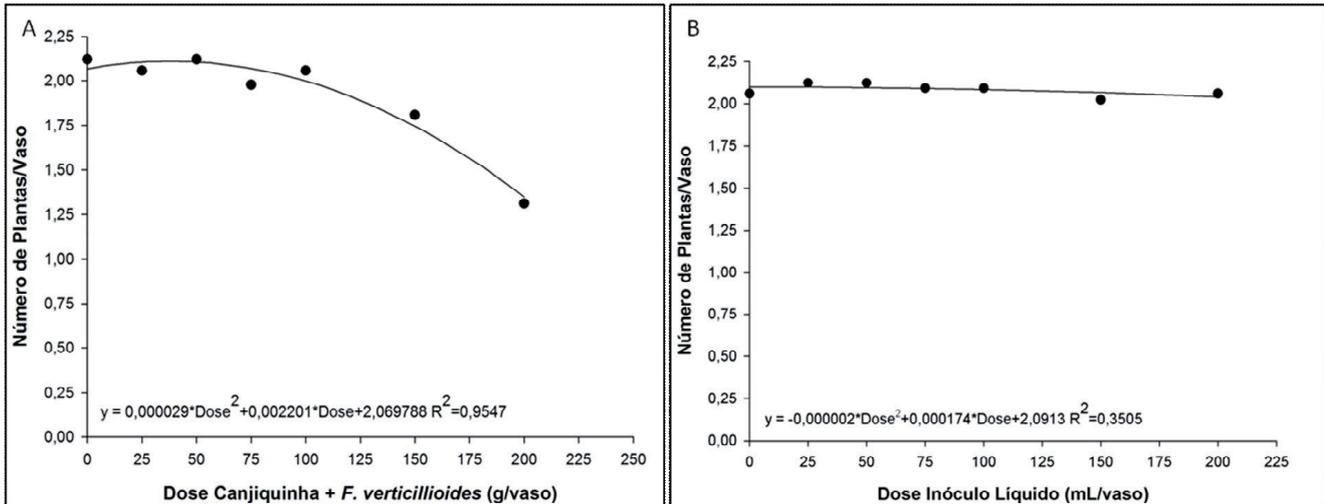


Figura 2. Curvas do número médio de plantas viáveis (stand), por vaso, em função das doses crescentes de inóculo no método canjiquinha + *F. verticillioides* (CF) (A) e suspensão de esporos do fungo (SEF) (B).



Figura 3. Ilustração do desenvolvimento e do número de plântulas de milho em vasos infestados com 200 g/vaso de canjiquinha + fungo (A) e testemunha sem infestação do solo (B), sob condição de casa de vegetação.

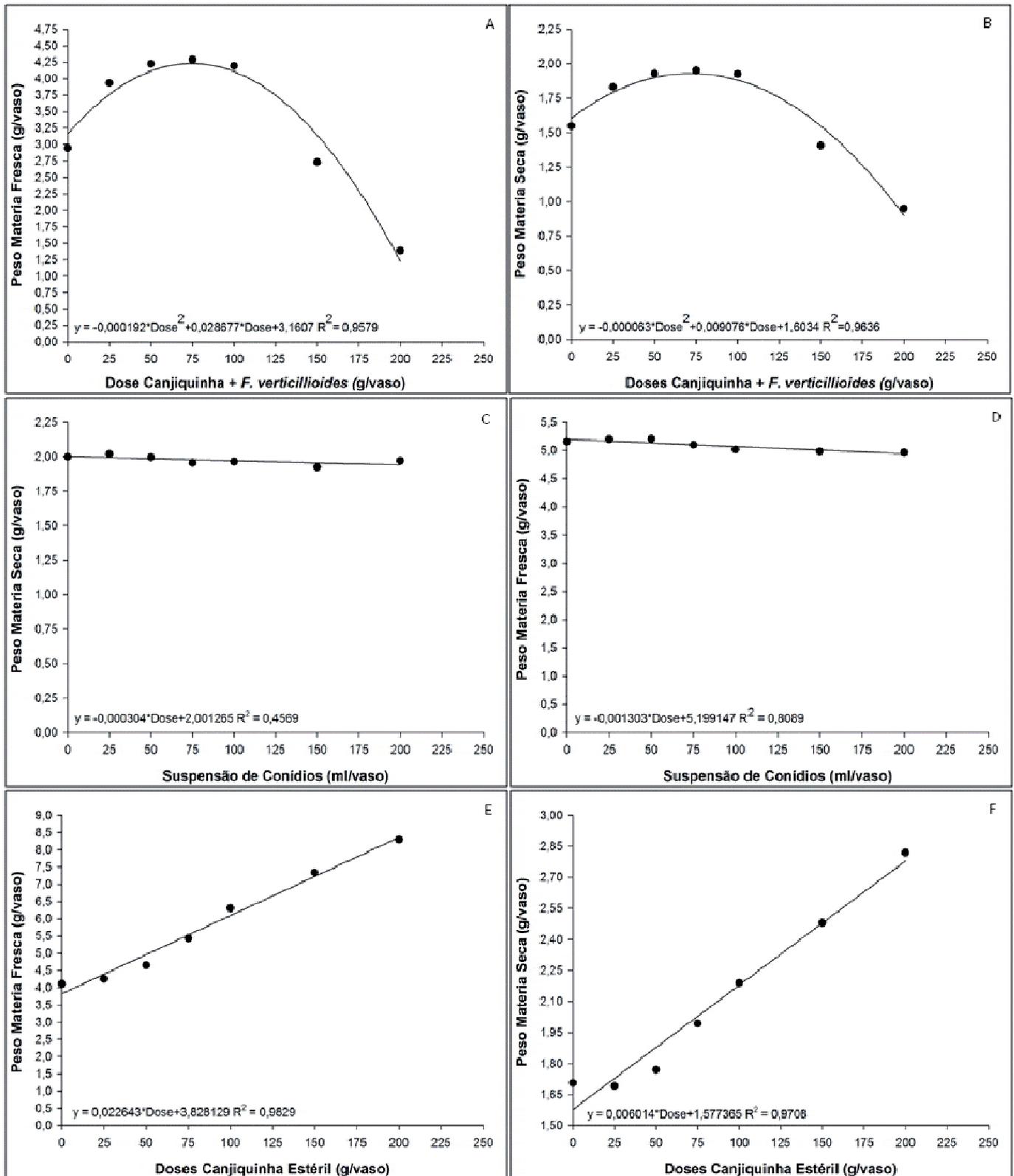


Figura 4. Curvas de regressão do peso de matéria fresca em função das diferentes doses de canjiquinha + fungo (A), suspensão de conídios (C) e canjiquinha estéril (E) e peso de matéria seca em função das diferentes doses de canjiquinha + fungo (B), suspensão de conídios (D) e canjiquinha estéril (F), inoculados via solo em condição de casa de vegetação.

Conclusões

O método de preparo de inóculo baseado na utilização de canjiquinha como substrato para o crescimento de *F. verticillioides* mostrou-se eficiente para a inoculação deste patógeno em plântulas de milho, via solo, em condição de casa de vegetação. Os melhores resultados foram obtidos na dose de 200 g/vaso de canjiquinha + fungo. Este método tem potencial para ser utilizado em larga escala para inoculação em casa de vegetação. A inoculação em plântulas tem a grande vantagem de reduzir o tempo necessário para a avaliação da reação de genótipos de milho ao referido patógeno.

O método de suspensão de esporos não apresentou eficiência para a inoculação de *F. verticillioides* nas condições estabelecidas no presente trabalho.

Referências

- BACON, C. W.; BENNETT, R. M.; HINTON, D. M.; VOSS, K. A. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 144-148, 1992.
- BULLERMAN, L. B.; TSAI, W. J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, p. 541-546, 1994.
- HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREENE, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE JR., J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 2, p. 217-221, 1990.
- KEDERA, C. L.; LESLIE, J. F.; CLAFLIN, L. E. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. (Abstr.). **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 1138, 1992.
- KOMMEDAHL, T.; WINDELS, C. E. Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J. (Ed.). **Fusarium: diseases, biology, and taxonomy**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1981. p. 91-103.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2006.
- MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. **Toxigenic Fusarium species: identity and mycotoxicology**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1984.
- MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 209-217, 1997.
- NELSON, P. E.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 233-252, 1993.
- OSWEILER, G. D.; ROSS, P. F.; WILSON, T. M.; NELSON, P. E.; WITTE, S. T.; CARSON, T. L.; RICE, L. G.; NELSON, H. A. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, p. 53-59, 1992.
- RILEY, R. T.; NORRED, W. P.; BACON, C. W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 167-189, 1993.
- ROSS, P. F.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; OSWEILER, G. O.; WILSON, T. M.; OWENS, D. L.; NELSON, H. A.; RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B1 in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, The Hague, v. 114, p. 129-135, 1991.

**Circular
Técnica, 179**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2012): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

**Comitê de
publicações**

Presidente: Presidente: Sidney Netto Parentoni.
Secretário-Executivo: *Elena Charlotte Landau.*
Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio
Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana
e Rosângela Lacerda de Castro.

Expediente

Revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros.*
Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro.*
Tratamento das ilustrações: *Tânia Mara A. Barbosa.*
Editoração eletrônica: *Tânia Mara A. Barbosa.*