



MARINA DE RESENDE FARIA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INÓCULO
DE PATÓGENOS EM SEMENTES: SUA
RELAÇÃO COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA
E QUANTIFICAÇÃO DO DNA FÚNGICO POR
qPCR**

LAVRAS – MG

2016

MARINA DE RESENDE FARIA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INÓCULO DE PATÓGENOS EM
SEMENTES: SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA E
QUANTIFICAÇÃO DO DNA FÚNGICO POR qPCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração Patologia de Sementes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. José da Cruz Machado

Coorientadora

Dra. Carolina da Silva Siqueira

LAVRAS – MG

2016

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

Guimarães, Marina de Resende Faria.

Avaliação do potencial de inóculo de patógenos em sementes:
sua relação com a qualidade fisiológica e quantificação do DNA
fúngico por qPCR / Marina de Resende Faria Guimarães. – Lavras:
UFLA, 2016.

42 p.: il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador (a): José da Cruz Machado.

Bibliografia.

1. patologia de sementes. 2. fungos. 3. milho. 4. soja. 5.
algodão. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARINA DE RESENDE FARIA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE INÓCULO DE PATÓGENOS EM
SEMENTES: SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA E
QUANTIFICAÇÃO DO DNA FÚNGICO POR qPCR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração Patologia de Sementes, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de março de 2016.

Dr. Sarah da Silva Costa Guimarães

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

Dr. João Almir Oliveira

Dr. José da Cruz Machado
Orientador

Dra. Carolina da Silva Siqueira
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2016**

Aos meus pais, Janette e José Francisco, ao meu irmão Renato, aos meus avós, João e Maria, e aos meus tios, pelo amor, carinho, confiança em mim depositada e compreensão pelos dias em que estive ausente.

Ao Gabriel, pelo companheirismo, conforto, paciência e incentivo em todos os momentos. Sem seu apoio, carinho e, principalmente, seu amor, nada seria possível.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade em realizar o mestrado e pela estrutura disponível, e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor e orientador José da Cruz Machado, pela orientação, ensinamentos, oportunidade e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Fitopatologia, por compartilharem seus conhecimentos e estarem sempre disponíveis para nos ajudar.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões para a elaboração deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes: Polly, Iarinha, Bárbara, Stelio, Jonas, Mirella, Ângela, Mirian, Hudson e Elenice pela amizade e momentos de descontração. Em especial à Sueny e Carol, pela amizade, pelas risadas e pelo suporte, além da ajuda incondicional, para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas, que mesmo de longe, dão-me forças para continuar. Às amigas Elícia, Jeanny, Mirian e Priscilla, por compartilharem os mesmos sentimentos e sempre estarem presentes para que a caminhada se tornasse mais fácil e prazerosa.

Aos meus pais, José Francisco e Janette e a toda a minha família, pelo amor, força e incentivo, sempre.

Ao Gabriel, pelo amor, carinho e compreensão, e por sempre me apoiar e dar o sustento de que preciso.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser concluído. Muito obrigada!

RESUMO

Um aspecto importante em estudos sobre interação de patógenos e sementes de espécies hospedeiras é o grau de colonização dos tecidos das sementes por esses agentes. Dependendo da intensidade desse tipo de associação, é possível estimar as consequências em ambientes de cultivo. Diante do que já se conhece em sanidade de sementes e tendo-se em mãos métodos moleculares para a detecção dos fungos *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão e *Corynespora cassiicola* em sementes de soja, objetivou-se, neste estudo, avaliar o vigor das sementes em função dos diferentes potenciais de inóculo, por meio do teste de germinação e condutividade elétrica, e quantificar os potenciais de inóculo, por meio de PCR em tempo real. Os isolados dos fungos foram inoculados nas sementes de milho, algodão em diferentes potenciais de inóculo, representados pela exposição das sementes a colônias fúngicas pelos períodos de tempo: 0, 24, 48, 96 horas; e em sementes de soja nos potenciais de 0, 36, 108 e 144 horas. As sementes foram submetidas aos testes de germinação, condutividade elétrica, sanidade e qPCR. Com relação ao *blotter test*, na maioria dos patossistemas houve uma maior incidência do fungo com o aumento do potencial de inóculo; apenas no caso do milho, quando inoculado com *S. maydis* que a incidência foi igual para todos os potenciais de inóculo. Foi observada uma queda na porcentagem de germinação de todas as espécies, com o aumento do potencial de inóculo, assim como também ocorreu maior degradação das membranas das sementes, havendo maior perda de exsudatos com o aumento do potencial de inóculo. Pelo teste de qPCR confirmou-se que as sementes com maior potencial de inóculo foram mais afetadas negativamente, indicando que os danos causados nas sementes aconteceram em decorrência da maior concentração dos patógenos. Sendo assim, conclui-se que há uma relação estreita entre os potenciais de inóculo dos patógenos em estudo, a quantidade de DNA e o desempenho fisiológico das sementes infectadas por estes agentes.

Palavras-chave: patologia de sementes; fungos; milho; soja; algodão

ABSTRACT

An important aspect in studies on the interaction of fungi and host seeds is the degree of colonization of the tissues by these agents. Depending on the intensity of this type of association, it is possible to estimate the consequences in farming environments. Having in mind what is already known in seed health and taking in consideration molecular methods for detection of *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* in corn seeds, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* in cotton and *Corynespora cassiicola* in soybean seeds, the aim of this study was to evaluate the effect of different inoculum potentials of those pathogens on seeds, through the germination and electrical conductivity tests, and quantify the inoculum potentials, by real time PCR. The fungi isolates were inoculated on corn and cotton seeds in different inoculum potentials, represented by the exposition of the seeds to the fungal colonies for 0, 24, 48, 96 hours; and 0, 36, 108 and 144 hours for soybeans. The seeds were submitted to germination, electrical conductivity, health tests and qPCR. Based on the blotter test, there was a higher incidence of fungus in most pathosystems with the increasing inoculum potential. Except for corn seeds inoculated with *S. maydis*, the incidence was similar for all inoculum potentials. A decrease in germination percentage was observed in all species, with the increase in the inoculum potential; the same was observed in the degradation of the seeds membranes, with great loss of exudates with increasing inoculum potential. By qPCR test it was confirmed that the seeds with the greatest inoculum potential were most negatively affected, indicating that the damage occurred in the seeds due to the higher concentration of pathogens. Therefore, it was concluded that there is a close relationship between inoculum potential of pathogens, the amount of DNA and physiological performance of seeds infected with these agents.

Keywords: seed pathology; fungi; maize; soybean; cotton

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Aspectos gerais da importância da qualidade sanitária de sementes.....	13
2.2	Interação entre fungos fitopatogênicos e sementes de milho, soja e algodão.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Obtenção de isolados e determinação do perfil das sementes.....	20
3.2	Inoculação de sementes.....	21
3.3	Testes de avaliação da qualidade de sementes.....	22
3.3.1	Teste de germinação.....	22
3.3.2	Teste de condutividade elétrica.....	22
3.3.3	Testes de Sanidade.....	23
3.3.3.1	<i>Blotter test</i>	23
3.3.3.2	Quantificação de DNA fúngico.....	23
3.6.1	Extração de DNA.....	23
3.6.2	PCR em tempo real (qPCR)	24
3.7	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1	Desempenho fisiológico das sementes inoculadas e quantificação do inóculo.....	26
5	CONCLUSÕES.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Considerada um dos principais insumos da agricultura moderna, a semente, além de veículo de reprodução das plantas, é determinante do sucesso ou insucesso de uma cultura, porque sua qualidade reflete, significativamente, na produtividade agrícola.

A qualidade da semente envolve aspectos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários. A condição sanitária é extremamente importante para a produção de plantas de alta qualidade, pois sendo as sementes eficazes na disseminação de agentes fitopatogênicos, estes podem ser levados ao campo, provocando redução na germinação e vigor, afetando o estande da cultura e reduzindo quantitativa e qualitativamente a produção.

A associação de patógenos com sementes é uma das maiores preocupações na produção de qualquer espécie propagada por essas estruturas. Nesse sentido, a detecção e identificação de patógenos em lotes de sementes e em outros materiais de propagação vegetal é uma das mais importantes etapas no sistema de produção agrícola, uma vez que associada a outras medidas de manejo, pode favorecer a que o agricultor consiga produções com rentabilidade econômica, além de outras vantagens.

Um aspecto a ser considerado é o conhecimento do nível de potencial de inóculo dos patógenos nessa interação. Dependendo do nível desse potencial nas sementes, é possível estimar, na prática, a ocorrência das doenças em campos de cultivo, e prever o desempenho sanitário das sementes, com a finalidade de controlar as doenças delas originadas. A quantificação do inóculo de patógenos nas sementes infectadas ou contaminadas é, portanto, de extremo valor por inúmeras razões. De modo geral, os atuais métodos de detecção de patógenos em amostras de sementes, oferecem pouca, ou quase nenhuma informação sobre o grau de associação dos patógenos com as sementes afetadas, limitando-se apenas a revelar o percentual de incidência desses agentes, na amostra submetida à

análise. Uma forma eficaz e moderna para quantificar inóculo de patógenos em sementes é o uso de técnicas moleculares por meio de reação em cadeia da polimerase, PCR, que, em tempo real, qPCR, possibilita a visualização da quantidade de DNA do patógeno presente nas sementes em análise. A técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) tem sido bastante utilizada, pois permite a visualização da quantidade de fragmentos de DNA do patógeno em estudo durante a reação, por meio da utilização de sondas fluorescentes e *primers* específicos. Em geral, os métodos moleculares são mais rápidos, específicos e seguros para a detecção de patógenos de interesse.

Diante do exposto e tendo-se em mãos métodos moleculares já desenvolvidos para a detecção dos patógenos: *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *Corynespora cassiicola* em sementes de seus hospedeiros, milho, algodão e soja, os objetivos deste trabalho foram: (1) avaliar o vigor das sementes em função dos diferentes potenciais de inóculo, por meio do teste de germinação e condutividade elétrica, e (2) quantificar os potenciais de inóculo, por meio de PCR, em tempo real (qPCR).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos gerais da importância da qualidade sanitária de sementes

A associação de patógenos com sementes é uma das maneiras que favorecem a sobrevivência e a disseminação desses agentes, uma vez que as sementes, sendo o insumo mais importante para a implantação de uma lavoura, possuem grande capacidade de manter viáveis as estruturas de muitos fitopatógenos por longos períodos em comparação com outras partes vegetais (MACHADO, 1988; TANAKA; MACHADO, 1985). Por meio dessa via, inúmeras doenças podem ser disseminadas a longas distâncias e causar prejuízos

elevados, dependendo das condições de ambiente e de outros fatores que favoreçam o seu desenvolvimento (MACHADO et al., 2004).

Os fitopatógenos podem estar associados às sementes na sua superfície, no seu interior ou misturados a elas. Eles se apresentam nas mais variadas formas de propagação, desde o micélio, esporos até estruturas de resistência, além de outras estruturas específicas dos mais diversos grupos de fungos, bactérias, nematoides e vírus (SANTOS; PARISI; MENTEM, 2011). Dentre os agentes patogênicos que podem associar-se às sementes de plantas, os fungos formam o maior grupo, seguido das bactérias e, em menor proporção, estão os vírus e nematoides (MACHADO, 2000).

A relação patógeno – semente é um fenômeno já amplamente conhecido em todo o mundo e que tem sido responsável por uma série de consequências danosas. Machado e Pozza (2005) relatam, dentre as consequências, a perda do poder germinativo e vigor das sementes, introdução aleatória e precoce de inóculo nas áreas de plantio, acúmulo de inóculo no solo, aumento da suscetibilidade de plantas a estresses variados, morte de plântulas originadas de sementes contaminadas, contaminação e possível inutilização temporária de áreas para o cultivo de algumas espécies vegetais, contaminação de equipamentos de beneficiamento de sementes, disseminação do patógeno a longas distâncias, queda de produção e de qualidade, entre outros.

A semente possui propriedades de grande importância tanto como organismo biológico, como insumo agrícola. O termo qualidade, quando aplicado à semente, reflete ao desempenho de lotes em diferentes condições de campo, podendo ser avaliado pelo estabelecimento do estande ideal, pelo potencial produtivo, determinado pelas características de melhoramento; ou mesmo pela ausência de pragas, doenças e plantas invasoras, fornecendo, assim,

a base para a produção rentável (CARVALHO; FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI, 2006; MARCOS FILHO, 2005).

O uso de sementes com elevada qualidade fisiológica e sanitária, está entre as estratégias mais eficazes para diminuir a disseminação de patógenos. A qualidade fisiológica está relacionada à capacidade da semente em exercer suas funções vitais e expressar seu potencial, caracterizando-se pela germinação, dormência e vigor. Portanto, os efeitos sobre a qualidade da semente na presença de patógenos, geralmente são traduzidos pelo decréscimo na porcentagem de germinação, diminuição de estande, aumento de plântulas anormais, redução do vigor das plântulas e, conseqüentemente, queda no rendimento (BOTELHO et al., 2013; TOLEDO et al., 2009).

A qualidade sanitária tem sido frequentemente deixada em segundo plano, o que salienta a importância da sanidade de sementes, uma vez que 90% das espécies destinadas à produção de alimentos no mundo são propagadas por sementes e essas plantas estão sujeitas ao ataque de doenças, cuja maioria de seus agentes causais pode ser transmitida pelas sementes (BARROCAS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2014; ZANCAN et al., 2015;).

Tendo em vista os possíveis danos causados pela presença de patógenos nas sementes, o controle de doenças se faz necessário e é baseado no tratamento de sementes. Por meio desta medida, inúmeras doenças podem ser controladas preventivamente, o que contribui com a redução dos custos de produção e a diminuição do nível de poluição ambiental (OLIVEIRA; RODRIGUES, 2012).

2.2 Interação entre fungos fitopatogênicos e sementes

As sementes são componentes essenciais na produção de alimento para a população em todo o planeta, e grande parte das lavouras agrícolas depende

dessa forma de propagação. O milho e a soja estão entre os principais insumos no segmento produtivo agrícola, caracterizando-se, economicamente, pelas diversas formas de utilização que vão, desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. Assim também o algodão se destaca no contexto socioeconômico em razão da utilização de sua fibra, óleo e outros subprodutos. Sendo essas culturas amplamente difundidas e cultivadas em diversas regiões do país, estão sujeitas a variadas condições climáticas e expostas a diversas adversidades.

De modo geral, as sementes são um dos agentes mais eficazes na disseminação de doenças em plantas, sendo causadas por vírus, bactérias, nematoides e fungos que, por sua vez, apresentam maior representatividade quando comparados aos demais grupos de patógenos associados às sementes (BRASIL, 2009b). O entendimento da associação desses microrganismos patogênicos com as sementes é de fundamental importância, em razão dos reflexos que eles podem causar às plantas originadas, sobretudo por afetar a quantidade e qualidade do produto final. Podem estar veiculados internamente à semente, na forma de micélio dormente, ou externamente por meio dos conídios aderidos.

As sementes constituem-se em uma das principais fontes de inóculo primário das doenças (CIA; SALGADO, 1997), as quais estão entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos, e levam a perdas de produção em até 20% (VIDOR et al., 2003). Dessa forma, uma das medidas para o controle dos fungos reside no uso de sementes de boa qualidade sanitária, livres da presença de quaisquer estruturas fúngicas em seus tecidos ou tratadas com fungicidas recomendados, evitando-se, assim, a introdução do patógeno em áreas livres ou a reintrodução de isolados mais agressivos em áreas tradicionais (MACHADO, 2000; MEYER; CAMPOS, 2009; NEERGAARD, 1979).

Cada doença tem destaque em uma época do ano e em determinada região, variando de acordo com as condições climáticas do local. Casela, Ferreira e Pinto (2006), realizando trabalhos de monitoramento de doenças na cultura do milho, demonstraram que a mancha branca, a cercosporiose, ferrugem polissora, ferrugem tropical, ferrugem comum e helmintosporiose, causadas pelos patógenos *Pantoea ananas*, *Cercospora zea-maydis*, *Puccinia polysora*, *Physopella zae*, *Puccinia sorghi* e *Bipolaris maydis*, respectivamente, estão entre as principais doenças da cultura.

A expansão da área cultivada com plantio direto provocou a alteração do microclima e na biologia do agroecossistema, levando à sobrevivência de fitopatógenos no solo e fazendo com que doenças antigas ressurgissem e novas doenças se manifestassem (CASA, REIS; ZAMBOLIM, 2006; REIS, CASA, BRESOLIN, 2004). As podridões do colmo e da espiga causadas pelos fungos *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* são doenças antigas no Brasil e se destacam por estarem presentes em todas as regiões produtoras de milho (CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006), causando reduções no rendimento variando entre 0,67 a 50% em campos com incidência de 4 a 72% (DENTI; REIS, 2003).

A podridão do colmo interfere no desenvolvimento normal da planta, afetando suas funções, ocasionando quebra da base do colmo, acamamento e morte prematura da planta, o que, no final do ciclo, reflete no processo de enchimento de grãos, enquanto que a podridão da espiga pode causar redução na produtividade e na qualidade dos grãos colhidos (CASA, 1996; CASA; REIS; ZAMBOLIM, 2006; SHURTLEFF, 1992; REIS).

Em relação à soja, as doenças estão entre os principais fatores limitantes do rendimento dessa cultura, sendo elas, em geral, de difícil controle. O número de doenças causadas por bactérias, fungos, nematoides e vírus aumenta a cada safra com a expansão da cultura para novos ambientes. Dentre as doenças

fúngicas responsáveis pelas maiores perdas, destacam-se o cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), a antracnose (*Colletotrichum dematium* var. *truncata*), o crestamento foliar de cercospora (*Cercospora kikuchii*), a mancha "olho-de-rã" (*C. sojina*), a seca da haste e da vagem (*Phomopsis sojae* e outras espécies), a podridão branca (*Sclerotinia sclerotiorum*) e a mancha alvo (*Corynespora cassiicola*) (WEI, 1950; YORINORI et al., 1993).

Em consequência do aumento da semeadura de cultivares suscetíveis e da baixa eficiência dos fungicidas comumente aplicados na cultura da soja, a mancha-alvo, causada pelo fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis), tem aumentado sua incidência nas últimas safras, sendo encontrada em, praticamente, todas as regiões de cultivo de soja do Brasil (GODOY et al., 2012, 2013).

O referido fungo apresenta uma ampla gama de hospedeiros, sobrevive em hastes, raízes, sementes e em áreas de pousio por dois anos ou mais. Além disso, pode sobreviver saprofiticamente em restos culturais de um grande número de espécies vegetais (SINCLAIR; BACKMAN, 1989). Cultivares suscetíveis podem sofrer completa desfolha prematura, intensas manchas nas hastes e apodrecimento das vagens, pelas quais o fungo atinge a semente de modo a ser disseminado para outras áreas.

Outra cultura de grande importância para a economia brasileira é o algodoeiro, que está entre as mais importantes culturas de fibras no mundo. Anualmente, uma média de 35 milhões de hectares de algodão são plantados por todo o planeta. A cultura do algodoeiro está sujeita à incidência de um elevado número de doenças, cujos agentes etiológicos são, em sua maioria, transportados e/ou transmitidos por sementes. Diversas doenças que podem ser disseminadas a longas distâncias e, dependendo das condições de ambiente e outros fatores que

favorecem o seu desenvolvimento, podem causar prejuízos dos mais elevados (MACHADO, 2000).

De uma maneira geral, o algodoeiro é uma planta hospedeira de mais de 250 agentes patogênicos, já descritos na literatura, dentre os quais destacam-se os fungos, vírus, bactérias e nematoides (SALVATIERRA, 2008). Em meio às doenças que ocorrem, a ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), o mosaico das nervuras (*Vírus do Mosaico das Nervuras - VMN*), a mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) e as manchas foliares (*Alternaria macrospora*, *Alternaria alternata*, *Ramularia aréola*) são consideradas as mais importantes doenças que afetam essa cultura (CHIAVEGATO, 2001).

A ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, é transmitida, principalmente, via sementes contaminadas ou infectadas, nas quais o patógeno pode ser veiculado externamente na forma de conídios e internamente na forma de micélio dormente (ABRAHÃO, COSTA, 1949; CIA; SALGADO, 2005; TANAKA, 1990; PIZZINATO; CIA; FUZZATO, 1994; TANAKA; MENTEN, 1991), e sobrevive em restos culturais depositados no solo, especialmente onde o algodoeiro é cultivado em rotação de cultura. O fungo afeta várias espécies do gênero *Gossypium*, o que lhe garante sobreviver na ausência do algodoeiro cultivado (VIDOR et al., 2003).

Os prejuízos causados pela ramulose podem ser severos, alguns autores relatam 20 a 30% de perdas, podendo atingir 85% em casos extremos e totais em caso de distribuição generalizada no campo (ABRAHÃO, 1961; ABRAHÃO; COSTA, 1949; CARVALHO et al., 1984; COSTA; FRAGA JÚNIOR, 1937).

Em estudo sobre o desempenho de sementes de algodão, sob restrição hídrica, na presença de *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, observou-se que a

presença do patógeno na semente compromete a emergência de plântulas de algodão, e que os danos causados às sementes são crescentes com o aumento do estresse causado pela restrição hídrica (BARROCAS et al., 2014).

Vários são os métodos convencionais que podem ser utilizados na detecção de patógenos em sementes, sendo que a escolha de um método em particular depende do tipo do patógeno ou da espécie a ser detectada. O principal método utilizado é o do papel filtro (*blotter test*), porém, atualmente, a técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) tem sido bastante utilizada por ser eficiente na detecção e quantificação de fitopatógenos presentes em diversas culturas (BARROS et al., 2008; DURESSA et al., 2012; GAO et al., 2004; SOUSA et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia e no Laboratório de Análise de Sementes, no setor de sementes do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Obtenção de isolados e determinação do perfil das sementes

O isolado de *Stenocarpella maydis* (CML 698), patogênico ao milho, foi obtido da Coleção Micológica de Lavras, no laboratório de Micologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os isolados de *S. macrospora* (CMLAPS10) patogênico ao milho; *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (CMLAPS 262), patogênico ao algodão e *Corynespora cassiicola* (CMLAPS 312), patogênico à soja, foram obtidos da Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA.

As sementes de milho utilizadas no trabalho eram da cultivar RB9077 PRO, as de soja, da cultivar M7110 PRO e as de algodão da variedade DP 1240B2RF. Os perfis dos lotes das sementes de todas as espécies em estudo foram determinados de acordo com testes indicados nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009a). As sementes de milho apresentaram 94% de germinação, as de algodão, 98%, e as de soja, 85%. Pelo teste de sanidade, aplicado para todos os lotes de sementes, não foram detectados nenhum dos fungos em estudo.

3.2 Inoculação de sementes

As sementes de milho e algodão foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por um minuto e, em seguida, lavadas com água destilada por três vezes e, então, colocadas para secar sobre papel “germitest” em condições assépticas de laboratório, em temperatura ambiente, por três dias. Para sementes de soja, apenas alterou-se o tempo de desinfestação para 30 segundos.

Os fungos das três espécies foram repicados para placas de Petri de 15 cm de diâmetro, em meio batata-dextrose-ágar (BDA – 39g de Batata Dextrose Agar, 20g de ágar e 1000mL de água destilada), modificado pela adição de manitol com potencial hídrico ajustado para -1,4 MPa para o milho; e -1,0 MPa para soja e algodão, conforme descrito por Machado et al. (2001b) e segundo cálculo pelo Software SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). Foram repicados cinco discos de micélio por placa, os quais foram mantidos por sete dias em BOD a $25^{\circ}\pm 2C$ e fotoperíodo de 12 horas de luz. Decorrido esse período, as sementes de milho foram distribuídas em camada única e levemente prensadas sobre as colônias de *S. maydis* e *S. macrospora*. O mesmo foi feito para sementes de algodão sobre *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. As respectivas sementes permaneceram por diferentes tempos de inoculação 0, 24, 48 e 96h,

correspondendo aos potenciais de inóculo representados por P0, P24, P48 e P96, respectivamente. As sementes de soja foram colocadas sobre a colônia de *C. cassiicola* por 0, 36, 108 e 144h, representados por P0, P36, P108 e P144. Decorridos os tempos de inoculação, as sementes foram retiradas do contato com o fungo e expostas sob papel “germitest” em condições assépticas de laboratório, em temperatura ambiente, por três dias para secagem, e, então, armazenadas em câmara fria, em sacos de papel, para a posterior realização de testes.

3.3 Testes de avaliação da qualidade de sementes

3.3.1 Teste de germinação

Para cada tratamento (sementes inoculadas e períodos de inoculação), foram feitas quatro repetições de 50 sementes, distribuídas sobre o substrato de papel “germitest” esterilizado, umedecido com 2,5 vezes a massa do papel seco, com água destilada esterilizada. Os rolos foram colocados em germinador com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. As avaliações de germinação do milho foram realizadas no quarto e sétimo dia; do algodão, no quarto e décimo segundo dia, e da soja no quinto e oitavo dia (BRASIL, 2009a).

3.3.2 Teste de condutividade elétrica

Para a avaliação da condutividade elétrica das sementes de milho, algodão e soja, foram utilizadas 200 sementes (quatro repetições de 50 sementes) por tratamento, para cada espécie. Cada subamostra foi previamente pesada em balança de precisão (0,001g) e colocadas para embeber em recipientes contendo 75 mL de água deionizada por 24h em BOD à temperatura de 25°C , no escuro. Ao final desse período, foram efetuadas leituras de condutividade na solução da água de embebição, com o auxílio de um condutímetro MS TECNOPON[®], modelo mCA 150, sendo este previamente

calibrado com uma solução padrão de KCl. Os resultados obtidos foram subtraídos da leitura inicial da água (controle) e divididos pelo peso da amostra, sendo o resultado final expresso em $\mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, conforme descrito por Krzyzanowki, Vieira e França Neto (1999).

3.3.3 Testes de sanidade

3.3.3.1 Blotter Test

Foram utilizadas 200 sementes de cada tratamento (8 placas contendo 25 sementes). As sementes de soja e algodão foram colocadas equidistantes em placas de Petri de 15 cm contendo 3 folhas de papel filtro, embebidas com meio ágar-água 10% contendo o herbicida 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato de sódio) a 5 ppm de concentração e, então, mantidas em câmara de incubação por sete dias à temperatura de $20\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h de luz. Para as sementes de milho, utilizou-se a técnica de congelamento, na qual as placas com as sementes foram mantidas em câmara incubadora pelo período inicial de 24h e, em seguida, em congelador (-20°C) por 24h, e depois retornadas à incubadora por mais cinco dias. Após o período de incubação, foi avaliada a incidência de fungos nas sementes, examinando-as individualmente, com o auxílio de lupa e microscópio estereoscópio (BRASIL, 2009b).

3.3.3.2 Quantificação de DNA fúngico

Extração de DNA

A extração do DNA de cultura fúngica pura foi feita a partir de culturas crescidas em placas de Petri de 15cm, por sete dias, em meio BDA com manitol. O micélio foi raspado, separando-o do meio BDA e, então, macerado em almofariz com nitrogênio líquido até adquirir consistência de um pó fino e, então, transferido para microtubos de 1,5mL em três repetições.

Para a extração do DNA fúngico presente nas sementes inoculadas, foram utilizadas 400 sementes de cada tratamento de milho, soja e algodão. As sementes foram maceradas em moinho A11 Basic IKA, com adição de nitrogênio líquido até atingir a consistência de um pó fino. As amostras foram maceradas do menor para o maior potencial de inóculo e entre cada patossistema o moinho foi limpo e desinfestado com álcool 70%. Desses materiais, foram retiradas três subamostras as quais foram transferidas para microtubos de 1,5mL.

Obtidos os materiais macerados, procedeu-se à extração do DNA com a utilização do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) conforme as recomendações do fabricante.

PCR em tempo real (qPCR)

O qPCR foi realizado em todos os tratamentos de milho, algodão e soja, e cada amostra de DNA foi testada em duplicata com um volume total de reação de 25µL por amostra, utilizando o Kit PCR SYBR Green (Qiagen). Para cada reação, utilizaram-se 12,5µL de SYBR Green, 2 µL do DNA de cada amostra de semente inoculada e, as quantidades necessárias para cada patossistema dos *primers* forward e reverse. Como controle positivo, foi utilizado o DNA do fungo alvo e como controle negativo água ultrapura estéril.

O mix da qPCR de *S. maydis* foi preparado contendo 0,10 µM de forward e 0,60 µM de reverse (Tabela 1). A amplificação constou de desnaturação a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos: desnaturação 95°C, por 30 segundos e anelamento de 60°C por 30 segundos.

Para a reação de *S. macrospora*, o mix foi preparado, utilizando 0,25 µM de forward e 0,75 µM de reverse (Tabela 1). As condições de amplificação foram 95°C por 2 minutos, seguidas de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos e 57°C por 30 segundos.

Na reação com o patógeno *C. cassiicola*, foram utilizados 0,10 µM de cada *primer* (Tabela 1) e as condições de amplificação foram 94°C por 5 minutos e 40 ciclos a 94°C por 30 segundos e 58,5°C por 30 segundos.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizadas nas reações de qPCR para detecção de patógenos em sementes artificialmente inoculadas.

Isolados	<i>Primers</i>	Sequências	Referências
<i>S. maydis</i>	RT.Smay.F	GTT TCC ATG ACC TGC TCA CG	Romero; Wise (2015)
	RT.Smay.R	TGT TGC TCG GTT TCA GGC TTG	
<i>S. macrospora</i>	RT.Smac.F	GGG CAA ATT TTC TCG GAG G	Romero; Wise (2015)
	RT.Smac.R	GCA GCT ATT CAG CGT TCA TC	
<i>C. cassiicola</i>	GA4-F	CCT GCT CCG ACT TTG TTG AG	Dixon et al. (2009)
	GA4-R	GTC TGG GAG CAG CAA AGA CT	
<i>C. gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	CGC F	Dados não publicados	Almeida (2012)
	CGC R		

Para *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, utilizou-se 0,7µL de cada *primer* (Tabela 1) e as condições de ciclo foram de 94°C por 4 minutos, seguidas de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos e 65°C por 45 segundos.

Foram considerados os valores de Ct (*Cycle threshold*) para a determinação da quantidade de DNA presente em cada reação, o qual consiste

no momento em que a reação atingiu seu limiar da fase exponencial, indicando o ponto em que é possível obter a exata quantificação de DNA, baseado na emissão de fluorescência da amostra.

Os valores de DNA foram, então, determinados pelo software Rotor-Gene (Corbett) software version 1.7.75. bycycler Rotor-Gene 6500 (Corbett Research, Mortlake, Australia), a partir da construção de uma curva padrão de diluições em 10 vezes, obtido de culturas fúngicas puras, juntamente com o valor de Ct obtido em cada reação.

3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os testes de germinação, *Blotter test* e condutividade elétrica foram conduzidos sob delineamento inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância, e quando significativos, procedeu-se o ajuste de modelos de regressão, utilizando o software Sisvar[®] (FERREIRA, 2011)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho fisiológico das sementes inoculadas e quantificação do inóculo

As análises de variância para todas as espécies, em relação aos testes de germinação, condutividade elétrica e teste de sanidade das sementes inoculadas, revelaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$).

De acordo com os tratamentos controles, não houve interferência do restritor hídrico manitol no desempenho fisiológico das sementes.

Para o patossistema *S. maydis* - sementes de milho, foi verificado um decréscimo acentuado na germinação e um aumento na condutividade elétrica das sementes na medida em que se aumentaram os potenciais de inóculo. Observou-se que o percentual de germinação reduziu de 94% na semente sem

fungo, potencial P0, para 74,5% em P24, 62% em P48 e no maior potencial (P96), esse percentual foi de apenas 11%, totalizando uma redução de 83% (Figura 1).

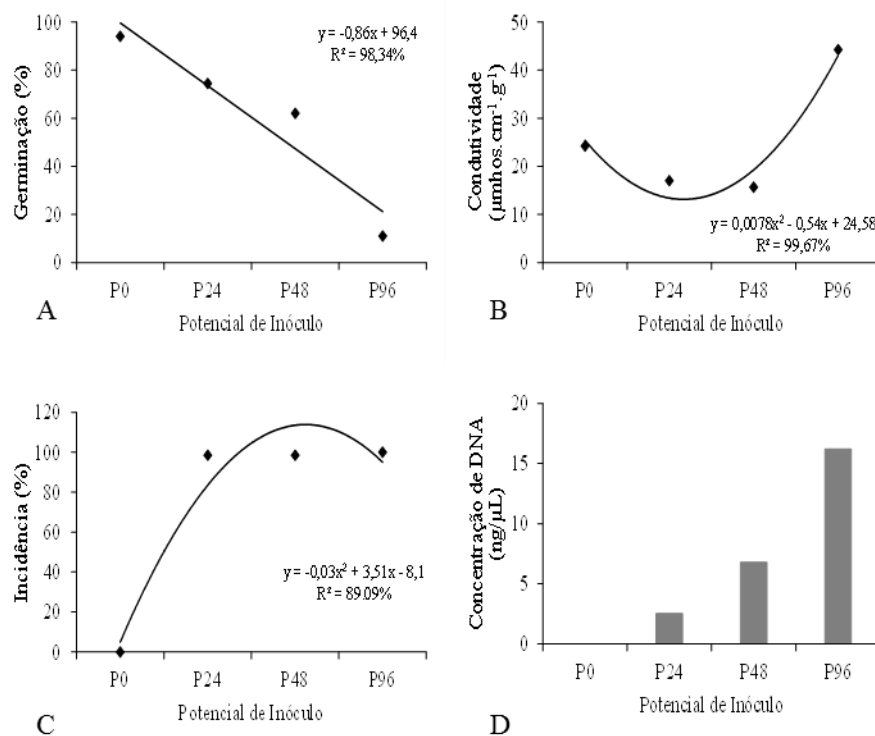


Figura 1. Desempenho de sementes de milho inoculadas com o isolado de *Stenocarpella maydis*, CML698, em diferentes potenciais de inóculo, P0 (0h), P24 (24h), P48 (48h) e P96 (96h). (A) Valores percentuais de germinação. (B) Valores médios de condutividade elétrica. (C) Percentual de incidência. (D) Concentração de DNA do fungo em sementes

Nota-se que os valores da condutividade elétrica das sementes inoculadas com *S. maydis* mantiveram-se em valores próximos a 16 µmhos.cm⁻¹

$^1.g^{-1}$, durante os primeiros períodos de inoculação, aumentando para 44,21 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.g^{-1}$ no potencial P96.

Pelo teste de sanidade, incubação em substrato de papel (*blotter test*), verificou-se que *S. maydis* foi detectado em todos os potenciais de inóculo, em altíssimas percentagens (Figura 1). É importante lembrar que esses resultados se referem a percentuais de incidência do fungo, não havendo indicação de potencial de inóculo nas sementes inoculadas. Em comparação com valores de germinação, nota-se que, embora o patógeno tenha se associado a todas as sementes inoculadas, mesmo no menor valor de potencial de inóculo, os efeitos foram, no entanto, menos acentuados do que nos potenciais de inóculo mais elevados. Esses resultados revelam que apenas os percentuais de incidência observados nos métodos biológicos não são suficientes para indicar o real grau de interação entre o patógeno e as sementes hospedeiras.

Os resultados do teste de vigor, baseados em condutividade elétrica, indicam que não houve para esse patossistema uma proporcionalidade crescente entre os menores valores dessa variável nos potenciais P24 e P48. No entanto, no maior valor de potencial de inóculo, P96, os danos causados pela presença do patógeno nas membranas protetoras das sementes foram drásticos, o que foi comprovado pelo menor percentual de germinação.

De acordo com os dados obtidos na PCR em tempo real, foi observado que os *primers* utilizados amplificaram apenas o DNA de *S. maydis*, verificando-se linearidade na curva padrão de cada nível de diluição do DNA. A eficiência relativa da curva foi de 0,79 a qual foi determinada pela equação de regressão linear com coeficiente de correlação (R^2) de 0,99 (Figura 2).

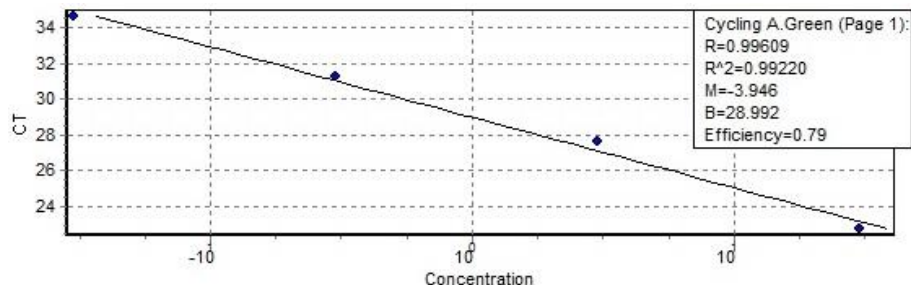


Figura 2. Curva padrão da PCR em tempo real da concentração de DNA presente na diluição seriada do patógeno *Stenocarpella maydis* variando de 30 ng/μL a 0,03ng/μL.

A partir da curva padrão e dos valores de Ct obtidos na reação, foi possível quantificar o DNA presente nas sementes inoculadas. Não foi encontrado nenhum DNA em P0. Nas sementes inoculadas por 24h, foram encontrados 2,53 ng/μL de DNA, enquanto que no potencial P48, essa quantidade foi de 6,78 ng/μL, aumentando para 16,2 ng/μL no maior potencial (P96) (Figura 1).

Pelos resultados referentes ao patossistema: *S. macrospora*- sementes de milho, observa-se que a ação do fungo nas sementes de milho, provocou uma redução gradual e linear nos percentuais de germinação, inversamente proporcional aos valores de potencial de inóculo do fungo presente inicialmente nas sementes avaliadas.

Ao contrário do que ocorreu com *S. maydis* neste trabalho, a redução dos percentuais de germinação das sementes de milho, provocados por *S. macrospora* foi menos acentuada entre os potenciais de inóculo utilizados. A redução entre o menor e o maior nível de potencial de inóculo foi 35%. Quando sem fungo (P0), as sementes apresentaram 94% de germinação, reduzindo para

79% em P24, e com o aumento do potencial de inóculo, esse valor reduziu para 59% em P96(Figura 3).

Percebe-se que os valores da condutividade elétrica das sementes inoculadas foram pouco diferenciados, o que revela que *S. macrospora* parece causar danos menos acentuados às sementes de milho do que *S. maydis* e que o maior potencial de inóculo nas sementes não é capaz de causar danos proporcionais ao desempenho das sementes, conforme se nota pelos resultados do teste de germinação (Figura 3). Por esse teste de vigor, observou-se que houve uma pouca variação na condutividade das sementes. Em P0, a condutividade foi de 24,2 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, e com o aumento do potencial de inóculo, esse valor reduziu para 17 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ em P24, 14,96 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ em P48 e 15,69 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ em P96.

Importante ressaltar que a partir do *blotter test*, a incidência de *S. macrospora* nas sementes inoculadas não foi total, 100%, em todos os potenciais de inóculo, ao contrário do que ocorreu com *S. maydis*. Neste trabalho, os percentuais de incidência do fungo nas sementes foram crescentes e lineares em relação ao aumento dos potenciais de inóculo (Figura 3). Em P24, a incidência do patógeno nas sementes foi de 61,5%, aumentando em P48 para 72,5% e, por fim, para 91% em P96.

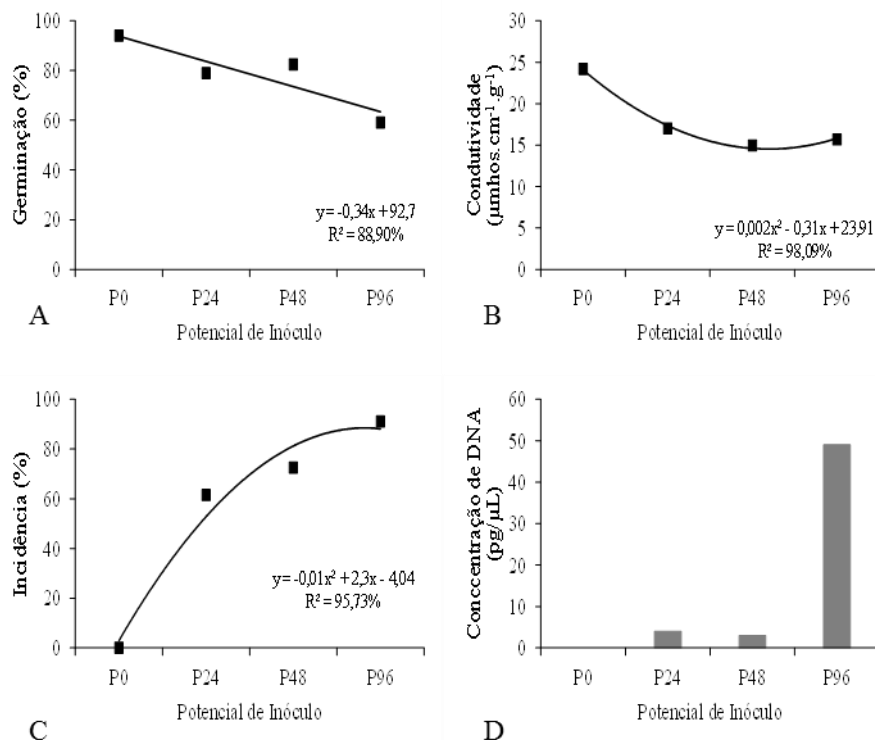


Figura 3. Desempenho de sementes de milho inoculadas com o isolado de *Stenocarpella macrospora*, CMLAPS10, em diferentes potenciais de inóculo, P0 (0h), P24 (24h), P48 (48h) e P96 (96h). (A) Valores percentuais de germinação. (B) Valores médios de condutividade elétrica. (C) Percentual de incidência. (D) Concentração de DNA do fungo em sementes.

A partir dos dados obtidos nas reações de qPCR, foi possível observar que os *primers* utilizados para quantificar e detectar a presença de *S. macrospora* nas sementes inoculadas foram eficientes, verificando-se linearidade na curva padrão de cada nível de diluição do DNA. A eficiência relativa da curva foi de 0,94, determinada pela equação de regressão linear com coeficiente de correlação (R^2) de 0,94 (Figura 4).

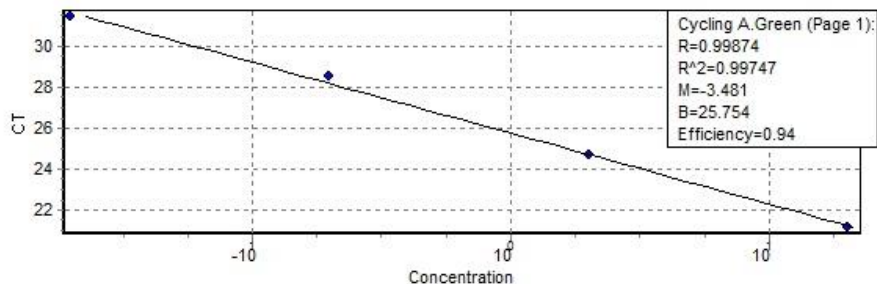


Figura 4. Curva padrão da PCR em tempo real da concentração de DNA presente na diluição seriada do patógeno *Stenocarpella macrospora* variando de 20 ng/ μ L a 0,02ng/ μ L.

As quantidades de DNA encontradas nos potenciais P24 e P48 diferiram pouco entre si. Em P24, foram detectadas 4 pg/ μ L de DNA nas sementes inoculadas, não havendo grande diferença de P48, onde foram detectados 3 pg/ μ L. No maior potencial (P96), a quantidade encontrada foi de 49 pg/ μ L (Figura 3).

Em comparação com *S. maydis*, nota-se que a concentração de DNA de *S. macrospora* foi inferior, comprovando a relação entre potencial de inóculo e as variáveis utilizadas para avaliar o desempenho das sementes.

Para o patossistema *C. gossypii* var *cephalosporioides* em algodão, a porcentagem de germinação reduziu com o aumento do potencial de inóculo, assim como nos patossistemas já mencionados. Na semente não inoculada (P0), o percentual de germinação foi de 98%, havendo uma redução para 64,5% nas inoculadas por 24h (P24). No maior potencial (P96), a germinação foi de apenas 30%, totalizando uma redução de 68%. (Figura 5).

Pode-se observar um aumento na condutividade, na medida em que se aumentou o potencial de inóculo. Em P0, o valor inicial da leitura da

condutividade foi de $101,66 \mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Em P24, leitura de condutividade da solução foi de $66 \mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, aumentando para $72,14 \mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ em P48 e atingindo um valor de $102,79 \mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ em P96 (Figura 5).

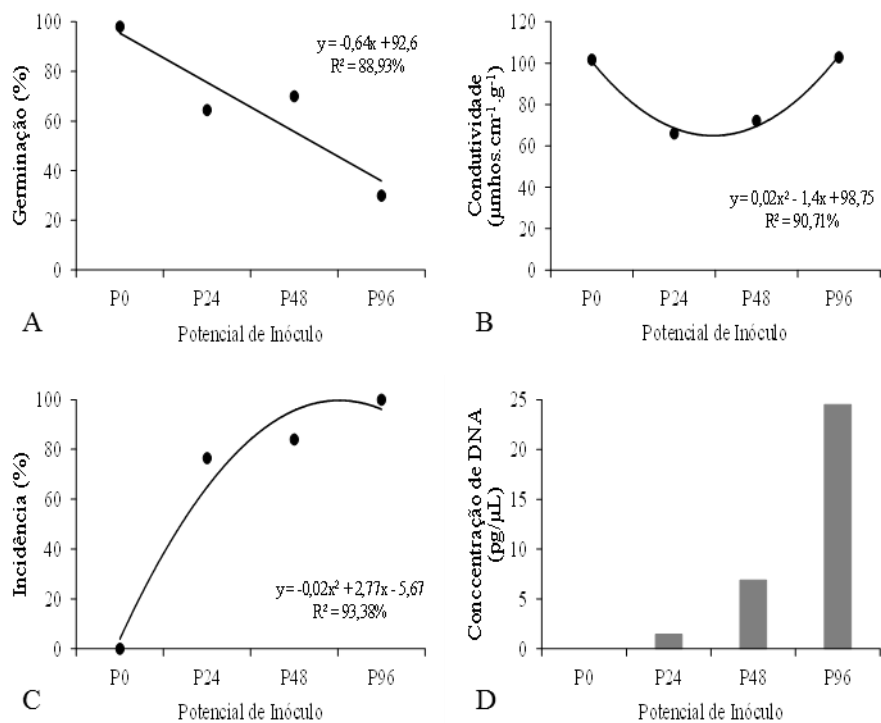


Figura 5. Desempenho de sementes de algodão inoculadas com o isolado de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, CMLAPS262, em diferentes potenciais de inóculo, P0 (0h), P24 (24h), P48 (48h) e P96 (96h). (A) Valores percentuais de germinação. (B) Valores médios de condutividade elétrica. (C) Percentual de incidência. (D) Concentração de DNA do fungo em semente.

Foi possível verificar, pelos testes de sanidade, o aumento progressivo da porcentagem de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* presente nas sementes

inoculadas em função do aumento do potencial de inóculo. Observa-se que a incidência do patógeno nas sementes em P24 foi de 76,5%, aumentando em P48 para 84%, depois para 100% em seu maior potencial de inóculo (P96).

Pelos resultados obtidos com as reações de qPCR utilizadas na detecção e quantificação de *C. gossypii* var *cephalosporioides* nas sementes inoculadas de algodão, observou-se que os *primers* amplificaram apenas o DNA do fungo em questão, verificando-se linearidade na curva padrão de cada nível de diluição do DNA. A eficiência relativa da curva foi de 1,15, determinada pela equação de regressão linear com coeficiente de correlação (R^2) de 0,99 (Figura 6). Foi possível quantificar a presença do patógeno nas sementes. No potencial P24, detectou-se 1,44pg/ μ L de DNA, que aumentou para 6,89pg/ μ L em P48 e 24,5 pg/ μ L em P96 (Figura 5).

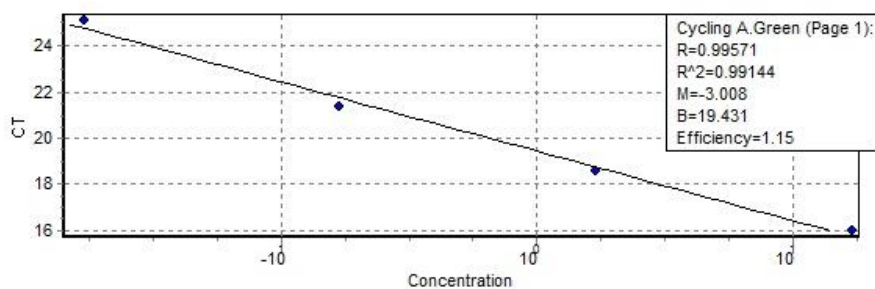


Figura 6. Curva padrão da PCR em tempo real da concentração de DNA presente na diluição seriada do patógeno *Colletotrichum gossypii* var *cephalosporioides* variando de 17ng/ μ L a 0,017ng/ μ L.

No patossistema *C. cassicola* em sementes de soja, a porcentagem de germinação, assim como em todos os patossistemas já analisados, foi reduzida com o aumento do potencial de inóculo. Em P0, a porcentagem inicial de germinação foi de 85%, que reduziu para 77,5%, no primeiro potencial de

inóculo (P36). Quando inoculadas no potencial P108, as sementes tiveram 58% de germinação, e com o aumento do potencial para 144h (P144), esse valor reduziu para 51% (Figura 7).

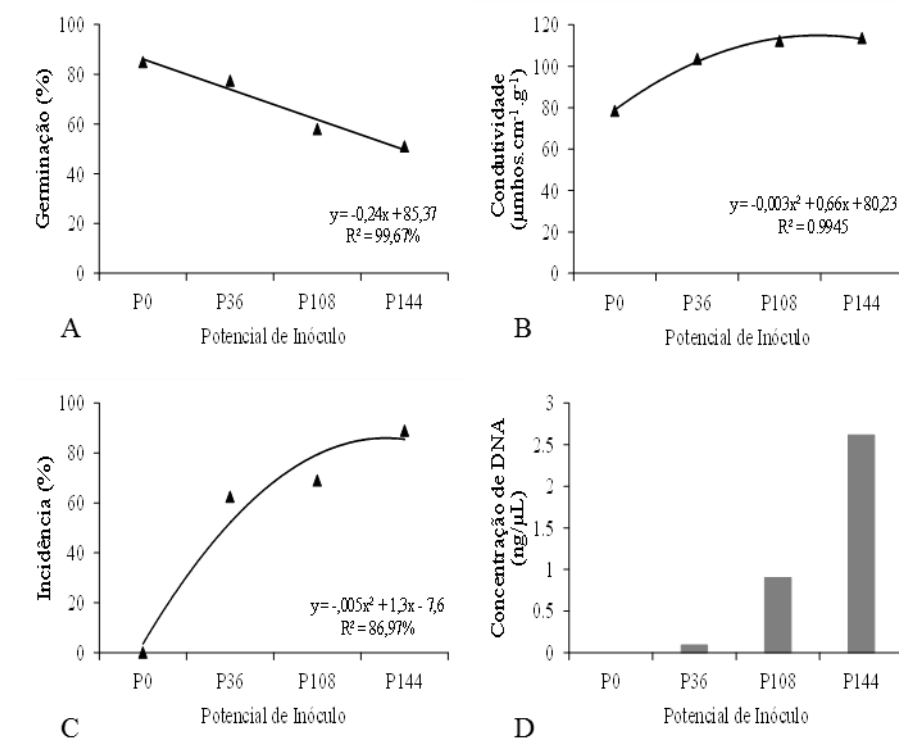


Figura 7. Desempenho de sementes de algodão inoculadas com o isolado de *Corynespora cassiicola*, CMLAPS312, em diferentes potenciais de inóculo, P0 (0h), P36 (36h), P108 (108h) e P144 (144h). (A) Valores percentuais de germinação. (B) Valores médios de condutividade elétrica. (C) Percentual de incidência. (D) Concentração de DNA do fungo em semente.

Observou-se um aumento nos valores da condutividade elétrica das sementes inoculadas, na medida em que se aumentou o potencial de inóculo. Em

P0, a leitura da condutividade foi de 78,43 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$. Em P36, esse valor foi de 103,6 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, e em P108 e P144 os valores foram maiores e próximos, sendo as leituras referentes a 112,2 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e 113,63 $\mu\text{mhos.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$, respectivamente (Figura 7).

Pelos resultados obtidos pelo *blotter test*, verificou-se o aumento da porcentagem de *C. cassiicola* presente nas sementes inoculadas, à medida que o potencial de inóculo aumentava. A incidência do patógeno nas sementes em P36 foi de 62,5%, aumentando para 69% em P108 e para 89% no maior potencial (P144) (Figura 7).

De acordo com os dados obtidos na qPCR, foi observado que os *primers* utilizados conseguiram detectar e quantificar a presença de *C. cassiicola* nas sementes inoculadas, verificando-se linearidade na curva padrão de cada nível de diluição do DNA. A eficiência relativa da curva foi de 1,93 a qual foi determinada pela equação de regressão linear com coeficiente de correlação (R^2) de 0,98 (Figura 8). A partir da curva padrão e dos valores de Ct obtidos na reação, foi possível quantificar o DNA presente nas sementes inoculadas. Não foi encontrado nenhum DNA em P0. Nas sementes inoculadas por 36h (P36), detectou-se 0,09 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA. Nos potenciais seguintes, os valores encontrados foram 0,9 $\text{ng}/\mu\text{L}$ em P108 e 2,62 $\text{ng}/\mu\text{L}$ em P144 (Figura 7).

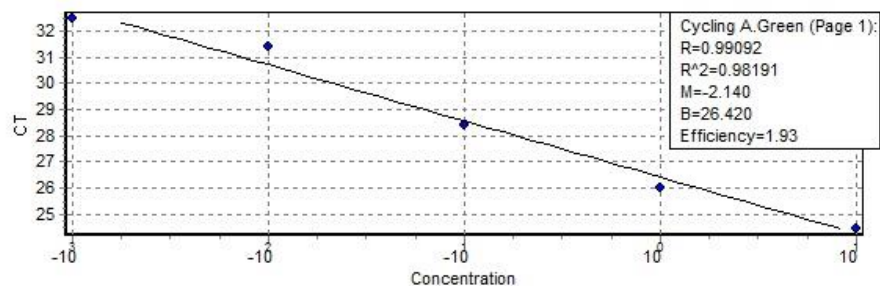


Figura 8. Curva padrão da PCR em tempo real da concentração de DNA presente na diluição seriada do patógeno *Corynespora cassiicola* variando de 10 ng/μL a 0,001 ng/μL.

Com os resultados deste trabalho, foi possível verificar que a presença dos patógenos *S. maydis* e *S. macrospora* em sementes de milho, *C. gossypii* var *cephalosporioides* em algodão e *C. cassiicola* em soja, artificialmente inoculados nas sementes constitui um fator negativo dos mais drásticos no desempenho das mesmas, causando reduções significativas do poder germinativo e do vigor. (ARAÚJO; SUASSUANA, 2003; FREITAS, 2006; SIQUEIRA et al., 2014).

Em todos os patossistemas estudados, observou-se uma queda acentuada na porcentagem de germinação das sementes, sendo que os maiores percentuais ocorreram no menor potencial de inóculo e os menores no maior potencial, em decorrência da morte ou, em alguns casos, má formação das sementes. Esses resultados reforçam o que foi relatado em outros patossistemas como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum truncatum*, em soja (BOTELHO et al., 2013; MACHADO et al., 2001a) e em sementes de feijão, na presença de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (COSTA et al., 2003).

Os resultados referentes à condutividade elétrica mostram que o aumento do período de exposição das sementes ao patógeno, leva à redução do

vigor das sementes, em potenciais de inóculo mais elevados, tendo em vista que, nessa condição, ocorre maior degradação do sistema de membranas das células, provocando a lixiviação de solutos, o que, conseqüentemente, aumenta a deterioração das sementes (BOTELHO, 2011; KRZYZANOWKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999; SIQUEIRA et al., 2014). Os menores valores de condutividade, correspondentes a menor liberação de exsudatos e indicam alto vigor das sementes, mostrando maior organização dos sistemas de membranas das células. Por outro lado, os maiores valores, indicam maior degradação do sistema de membranas, em razão do maior tempo de exposição das sementes ao patógeno.

A alta ocorrência dos fungos nas sementes inoculadas comprovou a eficiência do método de inoculação e que houve um comportamento semelhante entre os fungos. Verificou-se, o aumento da porcentagem de incidência dos fungos proporcional ao aumento do tempo de contato das sementes com os patógenos, o que responde à queda do percentual de germinação e do aumento da condutividade elétrica.

Na comparação dos resultados dos testes fisiológicos e sanitários aplicados neste trabalho e as concentrações de DNA dos fungos inoculados nos diferentes potenciais de inóculo, fica claro que há uma proporcionalidade entre os valores dos testes e as quantidades de DNA extraídos e avaliados pela técnica de qPCR. Fica evidente também, com este trabalho, a comprovada eficiência dos *primers* na detecção de quantidades mínimas de patógenos nas sementes.

5 CONCLUSÕES

A presença dos patógenos: *S. maydis*, *S. macrospora* em sementes de milho, *C. gossypii* var *cephalosporioides* em sementes de algodão e *C. cassicola* em sementes de soja pela inoculação artificial, causa reduções

graduais e variadas qualidades fisiológicas das sementes na proporção inversa dos potenciais de inóculo desses organismos.

A atuação do fungo *S. macrospora* em sementes de milho é menor que *S. maydis*. O fungo *C. cassicola* em associação com sementes de soja é pouco agressivo, independente do potencial de inóculo utilizado.

Foi evidenciada uma proporcionalidade entre o DNA fúngico extraído das sementes, os potenciais de inóculo de cada patógeno, os efeitos representados por percentuais de germinação e o vigor das sementes.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, J. Combate a ramulose tardia do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 121-123, jun. 1961.
- ABRAHÃO, J.; COSTA, A. S. Instruções para o reconhecimento da ramulose do algodoeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 59-60, mar. 1949.
- ALMEIDA, M. F. de. **Detecção e transmissão de Colletotrichum gossypii var. cephalosporioides pelas sementes de algodoeiro e uso de RFP para o estudo de interação patógeno-hospedeiro**. 2012. 104 p. Tese (Doutorado em Patologia de Sementes) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- ARAÚJO, A. E. de; SUASSUANA, N. D. **Guia de identificação e controle das principais doenças do algodoeiro no Estado de Goiás**. Campina Grande: Fundação Goiás, 2003. 40 p. (Documentos, 113).
- BARROCAS, E. N. et al. Desempenho de sementes de algodão submetidas à deficiência hídrica e presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 421-428, mar./abr. 2014.
- BARROS, E. et al. A DNA-based method to quantify *Stenocarpella maydis* in maize. **Maydica**, South Africa, v. 53, n. 1, p. 125-129, July 2008.

BOTELHO, L. S. **Detecção, transmissão e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja**. 2011. 157 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BOTELHO, L. S. et al. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 153-160, ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA, 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília: MAPA, 2009b. 200 p.

CARVALHO, L. P. et al. Influência da ramulose nas características de fibra e produção do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 9, n. 23, p. 593-598, out. 1984.

CARVALHO, M. L. M.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Controle de qualidade na produção de semente. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 52-58, maio/jun. 2006.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, Lages, v. 31, n. 5, p. 427-439, set./out. 2006.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2006. 14 p. (Circular técnica, 83).

CHIAVEGATO, E. J. Importância potencial de doenças do algodoeiro nas regiões produtoras do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3., 2001, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 215-218.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas: volume 2**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 33-48.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: _____. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 2005. p. 41-52.

COSTA, A. S.; FRAGA JÚNIOR, C. G. **Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro**. Campinas: Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo, 1937. 15 p. (Boletim Técnico, 29).

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

DENTI, E. A.; REIS, E. M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do planalto médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 585-590, ago. 2003.

DIXON, L. J. et al. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. **Phytopathology**, Gainesville, v. 99, n. 9, p. 1015-1027, Apr. 2009.

DURESSA, D. et al. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Verticillium dahliae* in spinach seed. **Phytopathology**, Salinas, v. 102, n. 4, p. 243-251, Dec. 2012.

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

FREITAS, M. **Variabilidade, danos e detecção de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em sementes de milho**. 2006. 182 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

GAO, X. et al. Detection and quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots with real-time quantitative polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Urbana, v. 88, n. 12, p. 1372-1380, Aug. 2004.

GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica**, Londrina, n. 94, p. 01-06, set. 2012.

GODOY, C. V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha-alvo, *Corynespora cassiicola*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Circular Técnica**, Londrina, n. 10, p. 01-06, out. 2013.

KRZYŻANOWKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

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

MACHADO, J. C. et al. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technic. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS-SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. **Proceedings...** Angers: ISTA, 2001b. p. 62.

MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 62-67, jan. 2004.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL, 1988. 107 p.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS, 2000. 138 p.

MACHADO, J. C.; POZZA, E. A. Razões e procedimentos para o estabelecimento de padrões de tolerância a patógenos em sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: qualidade fito sanitária**. Viçosa: Editora da UFV, 2005. p. 375-398.

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

MEYER, M.; CAMPOS, H. D. Guerra ao mofo. **Revista Cultivar**, Pelotas, n. 120, p. 16-18, 2009.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A. Computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Sept. 1995.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**: volume 2. London: Macmillan, 1979. 839 p.

OLIVEIRA, S. M. A.; RODRIGUES, S. **Avanços tecnológicos na patologia pós colheita**. Recife: Editora da UFRPE, 2012. 572 p.

PIZZINATO, M. A.; CIA, E.; FUZATTO, M. G. Relação severidade de ramulose do algodoeiro em condições de campo e a presença de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes produzidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 50-54, mar. 1994.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 1996. 80 p.

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

ROMERO, M. P., WISE, K. A. **Development of molecular assays for detection of *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* in corn**. Plant Disease. 99: 761-769. Jun. 2015.

SALVATIERRA, D. K. **Ocorrência da Ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* Costa) sob semeadura convencional e direta relacionada ao microclima, crescimento e desenvolvimento da cultura do algodoeiro**. 2008. 109 p. Dissertação (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEM, J. O. M. (Ed.). **Patologia de sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 236 p.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1992. 105 p.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. **Compendium of soybean disease**. 3. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1989. 106 p.

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

SOUSA, M. V. et al. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. **Plant Pathology**, Lavras, v. 64, n. 1, p. 478–488, jul. 2015.

TANAKA, M. A. S. **Patogenicidade e transmissão por sementes do agente causal da ramulose do algodoeiro**. 1990. 111 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1990.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 122, p. 40-6, 1985.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M. Comparação de métodos de inoculação de sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, n. 3/4, p. 218-226, jun. 1991.

TOLEDO, M. Z. et al. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 2, p. 124-133, abr./jun. 2009.

VIDOR, C. et al. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil**. São Pedro: Embrapa, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/doenca.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

WEI, C. T. Notes on *Corynespora*. **Mycological Papers**, Utrecht, v. 30, n. 34, p. 01-10, 1950.

YORINORI, J. T. et al. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M de. **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 337-397.

ZANCAN, W. L. A. et al. Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions." **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 3, p. 775-784, maio/jun. 2015.