

## **Metodologia para inoculação de *Fusarium verticillioides* em milho, via solo, em casa de vegetação**

Fabício Eustáquio Lanza<sup>1</sup>, Rodrigo Veras da Costa<sup>2</sup>, Laércio Zambolim<sup>3</sup>, Dagma Dionísia da Silva<sup>4</sup>, Luciano Viana Cota<sup>5</sup>, Lorena de Oliveira Moura<sup>6</sup>, Marielle Martins Marcondes<sup>7</sup>, Talita Coeli D'Angelis de Aparecida Ramos<sup>8</sup>, Carla Lima Corrêa<sup>9</sup> e Alessandro Nicoli<sup>10</sup>.

<sup>1,10</sup>Doutorando Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. [fabicio.lanza@ufv.br](mailto:fabicio.lanza@ufv.br) <sup>2,4,5</sup>Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. <sup>3</sup>Professor Titular Universidade Federal de Viçosa, MG. <sup>6</sup>Acadêmica Universidade Federal de São João Del Rei/Campus Sete Lagoas, MG. <sup>7</sup>Mestranda Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR. <sup>8</sup>Acadêmica da Fundação Educacional Monsenhor Messias, Sete Lagoas, MG. <sup>9</sup>Doutoranda Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Autor para correspondência: [fabicio.lanza@ufv.br](mailto:fabicio.lanza@ufv.br)

**RESUMO** - *F. verticillioides* é um dos principais patógenos em milho e está associado com doença em todos os estágios de desenvolvimento da planta. Poucas metodologias têm sido propostas para inoculação de *F. verticillioides* em plântulas de milho em casa de vegetação. Metodologias de inoculação são necessárias, muitas vezes, com objetivo de se obter resultados rápidos, para inferências sobre a resistência de genótipos ou agressividade de isolados, bem como a eficiência do tratamento de sementes. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma nova metodologia de inoculação de *F. verticillioides* via solo, assim como estabelecer a melhor dose a ser utilizada. Foram adicionadas diferentes doses de canjiquinha de milho e *F. verticillioides*, variando de 0 a 200g por vaso de 5 litros, e comparadas com as mesmas doses de canjiquinha estéril e aplicação direta de uma suspensão de 10<sup>6</sup> conídios/ml do mesmo fungo. Os resultados obtidos indicaram a necessidade de um substrato para veiculação, via solo, de *F. verticillioides* e que, a canjiquinha de milho mais *F. verticillioides*, nas doses de 150 e 200 gramas/por vasos de cinco litros apresentaram os melhores resultados.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., morte de plântula, canjiquinha de milho, dose.

### **Introdução**

O Milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior importância para o Brasil, e se destaca pelo papel que cumpre na cadeia alimentar e também por seu valor agrônomo, tanto em área plantada quanto em produção. Apesar de ser o terceiro maior produtor mundial, exportando anualmente 20% de sua produção, o Brasil apresenta uma das produtividades mais baixas entre os exportadores mundiais (CONAB, 2010). Entre os fatores responsáveis por esta baixa produtividade se destacam as doenças, que vem merecendo a atenção dos produtores e pesquisadores, devido ao seu expressivo aumento e pelos danos que causam à cultura.

*F. verticillioides* é um dos principais patógeno do milho e está associado com doenças em todos os estágios de desenvolvimento da planta, causando severos danos em raízes, colmos e grãos. Esse fungo não é somente o patógeno mais comum em milho, é também o fungo mais encontrado, colonizando plantas e grãos assintomáticos (KEDERA *et al.*

1992; MUNKVOLD *et al.* 1997).

Poucas metodologias têm sido propostas para inoculação de *F. verticillioides* em plântulas de milho em casa de vegetação. Metodologias como estas são necessárias, muitas vezes, com objetivo de se obter resultados rápidos, para inferir sobre a resistência de genótipos ou agressividade de isolados, bem como eficiência do tratamento de sementes (GLENN *et al.*, 2008; YATES *et al.*, 2003).

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma nova metodologia de inoculação de *F. verticillioides* via solo, assim como, estabelecer a melhor dose de inóculo a ser utilizada.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do núcleo de Fitopatologia da Embrapa milho e sorgo, localizado em Sete Lagoas, Minas Gerais. O isolado de *F. verticillioides* foi obtido de uma amostra de grãos de milho cultivados na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo.

Os grãos apresentando sintomas e com crescimento fungico típico de *Fusarium* foram transferidos para placas de Petri contendo BDA onde posteriormente se procedeu a obtenção de cultura monospórica. Por meio de preparo de lâminas, o isolado de *Fusarium verticillioides* foi identificado com base em sua morfologia típica, que se resume na produção de longas cadeias de microconídios produzidas em monofiálides (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Foi utilizado o substrato de “canjiquinha” de milho (milho triturado) para crescimento do isolado bem como para o processo de inoculação. Para isso, a canjiquinha foi armazenada em Erlemeyers de 1 litro, preenchendo o volume de 800 ml e a umidade padronizada para 20%. Os Erlemeyers contendo a canjiquinha foram autoclavados duas vezes a 120°C por 30 minutos.

O isolado foi repicado para os Erlemeyers contendo a canjiquinha autoclavada. Para isso foi utilizado um furador cilíndrico 1 cm de diâmetro, que foi utilizado para cortar o meio contendo o fungo. Dez discos foram colocados em cada um dos Erlemeyers, em seguida incubados durante 20 dias a 25°C em BOD.

Para realização do experimento foram utilizados dois híbridos de milho da Embrapa milho e sorgo, o BRS1010 e o BRS1040, semeados em vasos de 5 litros contendo terra vermelha de barranco (horizonte C). O inóculo foi adicionado aos vasos no momento do plantio, compondo as dosagens dos experimentos, que foram: Testemunha sem adição de inóculo; 25, 50, 75, 100, 150 e 200 gramas de canjiquinha. Foram utilizados dois controles,

um adicionando as mesmas proporções de canjiquinha previamente esterilizada, e outro adicionando as mesmas quantidades em mililitros de uma suspensão de  $10^6$  conídios/ml. Foram utilizadas 4 repetições e cada repetição foi representada por um vaso. A canjiquinha foi incorporada nos primeiros 5 cm do solo. Finalizando o processo, os híbridos de milho foram semeados na proporção de 4 sementes por vaso, mantidas em casa de vegetação a 28°C e irrigadas diariamente. As plantas foram conduzidas até atingirem 30 dias de idade.

As avaliações ocorreram aos 30 dias após plantio. Foi contado o número de plantas vivas, formando assim a primeira variável (estande). Posteriormente as plantas foram cortadas na altura do colo, pesadas e acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60°C. Após 48 horas, as plantas foram retiradas e pesadas novamente, formando duas outras variáveis, peso da matéria fresca e peso da matéria seca, respectivamente.

Aos dados foram aplicados teste estatísticos de normalidade, homogeneidade e aditividade do modelo, e foram realizadas a transformação dos dados. Também foi aplicada uma análise de regressão linear ou quadrática a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico SISVAR.

### **Resultados e Discussão**

A infestação do solo com canjiquinha mais *F. verticillioides* reduziu o número de plantas vivas aos 30 dias após plantio (DAP). O número de plantas vivas foi menor quando o solo foi tratado com doses maiores que 100 gramas por vaso. A aplicação de canjiquinha estéril ou inóculo líquido, não reduziu o número de plantas sobreviventes (Figura 1).

Com relação ao peso fresco e seco da parte aérea das plantas aos 30 DAP no solo tratado com canjiquinha mais *F. verticillioides*, constatou-se que houve aumento do peso fresco e seco inicial até a dose de 100 gramas de canjiquinha por vaso, onde só foi possível notar diminuição na matéria fresca e seca em doses maiores que 150 gramas por vaso (Figura 3 A e B). Nas doses mais baixas, houve efeito positivo no acúmulo de matéria fresca e seca, o que provavelmente ocorreu devido ao efeito nutricional (matéria orgânica) da canjiquinha de milho para as plantas (Figura 3 C e D). Observou-se acúmulo linear de matéria fresca e seca com aumento das doses de canjiquinha, explicando assim o efeito de promoção de crescimento inicial observado no tratamento com canjiquinha mais *F. verticillioides*. Portanto, o inóculo fúngico só foi significativo na diminuição do peso da matéria fresca e seca em dosagens superiores a 150 gramas por vaso. Não houve diferença significativa entre as dosagens aplicadas no tratamento utilizando a suspensão de conídios, mostrando a ineficiência de tal

quanto à veiculação do patógeno, indicando a necessidade do uso de um substrato como a canjiquinha de milho para veiculação, via solo, de *F. verticillioides* (Figuras 3 E e F).

Trabalhos recentes, realizados por GLENN *et al.* (2008) e YATES *et al.* (2003), também mostraram sintomas de redução de crescimento, ou de estande, após o processo de inoculação de plântulas ou sementes de milho com *F. verticillioides* por meio de aspersão de uma suspensão de conídios ou por uma previa embebição das sementes. Com base nestes trabalhos foi possível inferir que há diferentes metodologias de inoculação deste fungo, e cada uma deve ser usada de acordo com o objetivo do trabalho a ser realizado. Contudo, o presente estudo apresenta uma nova forma de veiculação de *F. verticillioides* via solo, causando os mesmo sintomas anteriormente descritos, e se mostrou versátil no que diz respeito ao processo de inoculação. Segundo GLENN *et al.* (2008) e YATES *et al.* (2003), quando se utiliza a inoculação de uma suspensão de esporos aplicada diretamente na folha, observa-se sintoma de redução de crescimento, e quando se utiliza a embebição previa da semente em suspensão de conídios, se observa mais claramente a morte de plântulas. A combinação dos dois sintomas pode ser observada empregando o método de inoculação desenvolvido em nosso estudo. Além disso, o método de inoculação mostrou-se potencialmente mais eficiente quando comparado com estudos anteriores (Figura 2).

### **Conclusão**

Os resultados obtidos com a nova metodologia desenvolvida para inoculação de *Fusarium verticillioides* indicaram claramente existir a necessidade de se utilizar um substrato para veiculação do fungo, via solo. E que, o uso da canjiquinha de milho nas doses de 150 e 200 gramas/por vasos de cinco litros, apresentaram os melhores resultados para inoculação eficiente da espécie de *Fusarium*.

### **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq, à Embrapa Milho e Sorgo e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio intelectual e financeiro.

### **Literatura Citada**

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Estimativa de produção de grãos no Brasil** – Levantamento Agosto de 2008. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 9 de Maio de 2010.

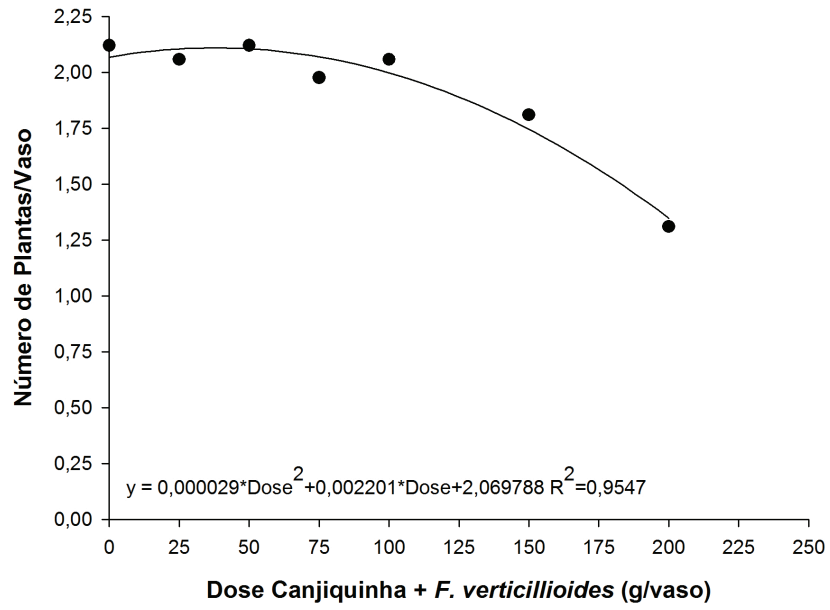
GLENN, A.E.; ZITOMER, N.C.; ZIMERI, A.M.; WILLIAMS, L.D.; RILLEY, R.T. & PROCTOR, R.H. Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. **MPMI**, v.21, N.1, p. 87-97, 2008.

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.

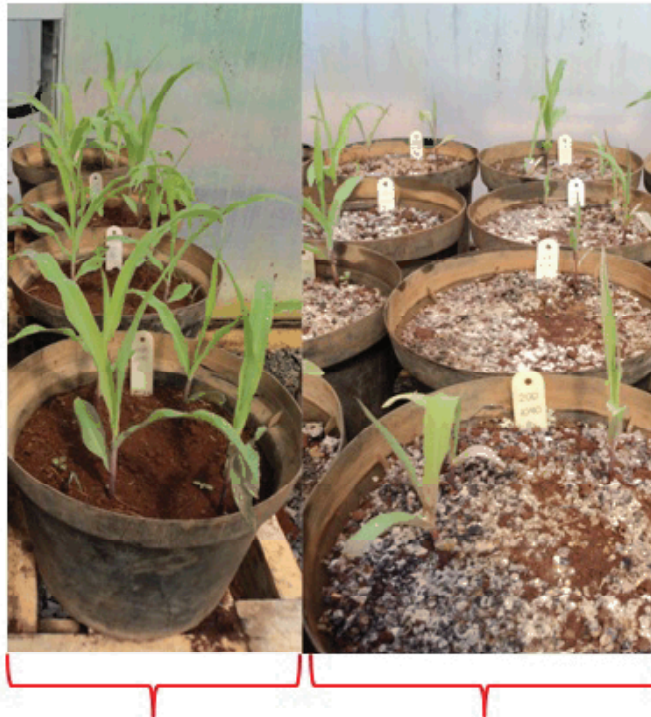
LESLIE, J.F. & SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, USA, 2006.

MUNKVOLD, G. P., MCGEE, D. C., AND CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology** 87:209-217, 1997.

YATES, I. E., ARNOLD J. W., HINTON D. M., BASINGER W., AND WALCOTT, R. R. *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control. **Canadian Journal of Botany** V. 81, p. 422-428, 2003.



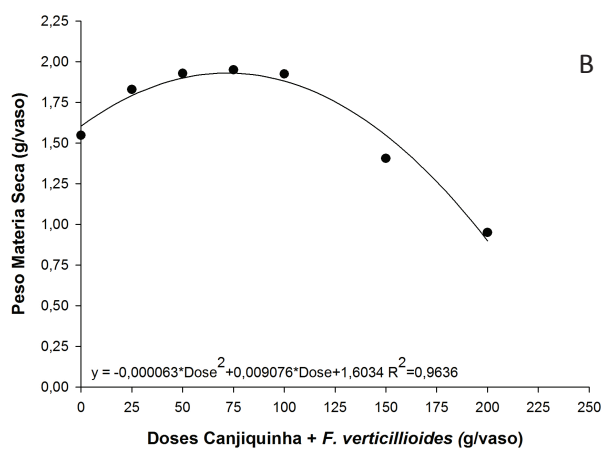
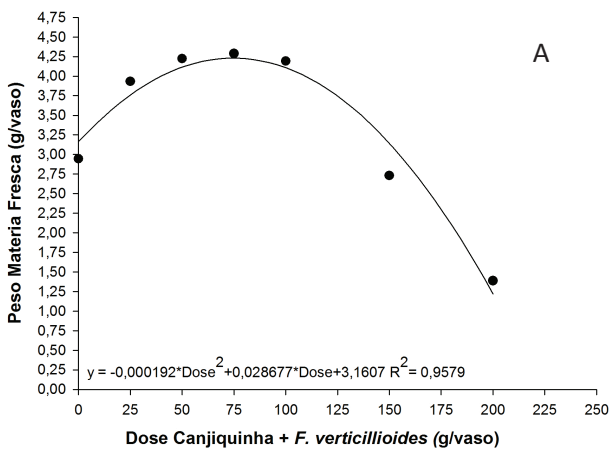
**Figura 1** – Efeito de doses de canjiquinha de milho + *F. verticillioides* no número de plantas vivas por vaso. Os dados foram transformados para  $\sqrt{(x + 0,5)}$ .



**Testemunha sem Inoculação**

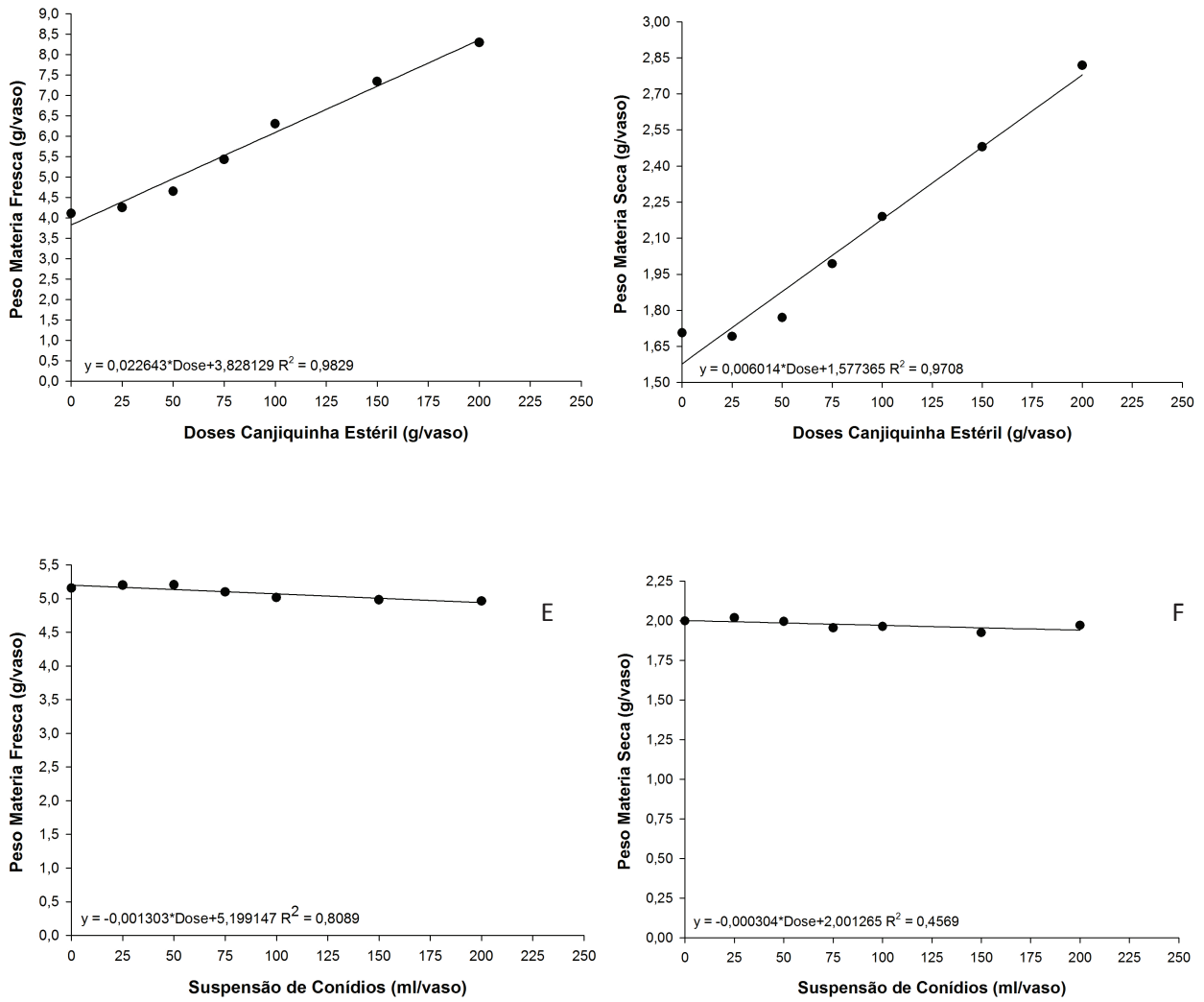
**Aplicação de 200g de canjiquinha + *F. verticillioides***

– Desenvolvimento e morte de plântulas entre a testemunha sem aplicação de canjiquinha+*F. verticillioides* e aplicação de 200g de canjiquinha+*F. verticillioides*.



**C**

**D**



**Figura 3** – Gráficos de regressão das respectivas doses aos 30 DAP: A,B) Peso matéria fresca e peso matéria seca das plantas em canjiquinha de milho + *F. verticillioides*; C,D) Peso matéria fresca e peso matéria seca das plantas em canjiquinha de milho estéril; e E,F) Peso matéria fresca e peso matéria seca das plantas em suspensão de conídios aplicada diretamente no solo. Os dados foram transformados para  $\sqrt{(x + 0,5)}$ .