

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

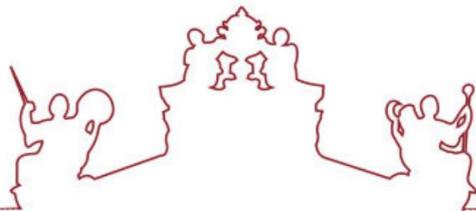
Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Inês Filipa Guerreiro Marques

Orientador(es) | Maria do Rosário Fernandes Félix
Carla Marisa Reis Varanda

Évora 2020





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

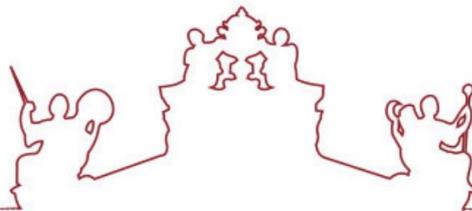
Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Inês Filipa Guerreiro Marques

Orientador(es) | Maria do Rosário Fernandes Félix
Carla Marisa Reis Varanda

Évora 2020





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Manuel Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | Maria Doroteia Murteira Rico da Costa Campos (Universidade de Évora)
(Arguente)
Maria do Rosário Fernandes Félix (Universidade de Évora) (Orientador)

Évora 2020



Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, às minhas orientadoras Professora Doutora Rosário Félix e Doutora Carla Varanda pela orientação, por terem sido incansáveis, por toda ajuda, disponibilidade e paciência ao longo de todo este trabalho. Acredito que não poderia ter tido melhores orientadoras para me levar até ao fim desta etapa.

Quero agradecer a toda a equipa do laboratório, por terem tido sempre disponibilidade para me ajudar, por toda a simpatia e boa disposição.

Quero agradecer do fundo do meu coração, às pessoas mais importantes, aos meus pais, Helena e João, e à minha irmã, Catarina, por toda a motivação e paciência e por acreditarem sempre em mim.

Aos meus colegas que me ajudaram sempre que precisei e que tiveram sempre uma palavra amiga quando as coisas não corriam tão bem. Um sincero obrigado, à Ana Miguel, ao Miguel Robalo, à Maria Beatriz, à Joana Branco, à Andreia Rocha, à Andreia Basílio, à Ângela Almeida e à Margarida Trindade.

Ao chegar ao fim deste capítulo da minha vida, sinto-me completamente realizada e orgulhosa de todo o meu caminho académico. Vou guardar com muito carinho todas as vivências aqui passadas nesta Universidade.

Um sincero obrigado a todos!

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Resumo

Das doenças com mais impacto na cultura milho, destacam-se a seca precoce, causada por *Fusarium* spp., e a murchidão tardia, causada por *Magnaportheopsis maydis*. Neste trabalho utilizaram-se 15 plantas de milho sintomáticas, 11 de Portugal e 4 de Espanha e obtiveram-se um total de 69 isolados apenas da espécie *Fusarium*. As espécies mais encontradas foram *F. verticillioides* e *F. subglutinans*. Estudou-se então a interação dos fungos *F. verticillioides* e *M. maydis*, em plantas de milho, que mostrou que *F. verticillioides* entrou na planta sem causar sintomas, tanto em plantas apenas inoculadas com este fungo como também em plantas inoculadas com ambos os fungos. Os testes RT-qPCR permitiram verificar que apenas o fungo *F. verticillioides* entrou nas raízes das plantas, tendo sido detetado em maior quantidade nas plantas inoculadas com ambos os fungos. O *M. maydis* não foi detetado, pois necessitava de mais tempo para entrar na planta.

Palavras Chave: Milho; Sintomas; Identificação; *Fusarium* sp; *M. maydis*;

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

ABSTRACT- Identification of different isolates of *Fusarium* sp. in maize plants with Fusariosis symptoms

Among the diseases with the greatest impact on maize crops, early drought, caused by *Fusarium* spp., and late wilting, caused by *Magnaportheopsis maydis*, stand out.

In this work, fifteen symptomatic maize plants were used, eleven from Portugal and four from Spain and a total of sixty-nine isolates of the *Fusarium* species were obtained.

The species with the highest incidence were *F. verticillioides* and *F. subglutinans*. It was then studied the interaction of fungi *F. verticillioides* and *M. maydis*, in corn plants, which showed that *F. verticillioides* entered the plant without causing symptoms, both in plants only inoculated with this fungus and in plants inoculated with both. fungi.

The RT-qPCR tests allowed to verify that only the fungus *F. verticillioides* entered the roots of the plants, having been detected in greater quantity in plants inoculated with both fungi. *M. maydis* was not detected, as it needed more time to enter the plant.

Key words: Corn; symptoms; identification; *Fusarium* sp; *M. maydis*.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

ABREVIATURAS

APS – *American Phytopathological Society*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tools*

°C – Grau Centígrado

cm – Centímetros

CTAB - Cetyl trimethyl ammonium bromide

DNA – Ácido Desoxirribonucleico dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra Acético

EUA – Estados Unidos da América

FAOSTAT - *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistic Division*

g – Aceleração da gravidade

g – Gramas

ha – Hectare

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

ITS - Internal Transcribed Spacer

Kc – Coeficiente Cultural

kg – Quilos

L – Litros

M - Molar

min- Minutos

ml – Mililitros

mM - Milimolar

mm – Milímetros

mm h⁻¹ – Milimetro por hora

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OTU - Unidade taxonómica operacional

p/p – Peso/Peso

pb – Par de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PVP - Polivinilpirrolidona

rDna – DNA ribossómico

s – Segundos

spp. - Espécies

V - Volt

v/v – Volume/Volume

TBE - Tris/Borate/EDTA

Ton - Toneladas

TRIS-HCL – Tris (hidroximetil) aminometano

U - Unidades

µl – Microlitro

% - Percentagem

Ct- Threshold cycle

qPCR- PCR em tempo real

Rn- Fase reprodutiva da cultura do milho

Vt- Fase vegetativa da cultura do milho

gDNA- DNA genómico

PDA- *Potato dextrose agar*

AMF- Fungos micorrizicos arbusculares

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

EMR- *extraradical mycelium*

Bases nucleotídicas

A – Adenina

C – Citosina

G – Guanina

T - Timina

Símbolos Químicos

B- Boro

HCl - Ácido clorídrico

K – Potássio

Mb – Molibdênio

Mg - Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Mn – Manganês

N - Azoto

NaCl – Cloreto de sódio

S – Enxofre

KCl – Cloreto de potássio

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
ABSTRACT- Identification of different isolates of <i>Fusarium</i> sp. in maize plants with Fusariosis symptoms	iv
ABREVIATURAS.....	v
Índice de Figuras	x
Índice de Quadros	xiii
1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1 Cultura do Milho	15
2.1.1 Área e Produção de Milho no Mundo e em Portugal.....	15
2.1.2 Características gerais do milho.....	17
2.1.3 Condições necessárias da cultura.....	18
2.2 Doenças associadas à cultura do milho	20
2.2.1 Fusariose	21
2.2.1.1 Espécies de <i>Fusarium</i> spp. associadas à doença do milho	22
2.2.1.2 Condições Favoráveis e Ciclo de Vida.....	24
2.2.1.3 Sintomas, prejuízos e distribuição geográfica	26
2.2.2 Murchidão tardia.....	29
2.2.2.1 Condições favoráveis e ciclo de vida	31
2.2.2.2 Sintomas, prejuízos e distribuição geográfica	32
2.3 Meios de Proteção	34
3. Materiais e Métodos	37
3.1 Obtenção de isolados de fungos associados à raiz e caule do milho	37
3.2 Extração de DNA genómico (gDNA)	39
3.3 Amplificação do PCR convencional	40
3.3.1 <i>Primers</i> utilizados	41
3.3.2 Condições de PCR.....	42
3.3.3 Electroforese em Gel de Agarose	43
3.3.4 Purificação dos produtos de PCR	43
3.3.5 Sequenciação de amostras de DNA e a sua análise.....	44

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

3.4 Inoculação de novas plantas de milho em laboratório com <i>M. maydis</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	44
3.5 Avaliação da virulência dos isolados de <i>Fusarium verticillioides</i> e <i>M. maydis</i> e as suas quantificações nas plantas inoculadas	48
3.6 Análise estatística	49
4. Resultados	50
4.1 Identificação de isolados de <i>Fusarium</i> spp. e <i>M. maydis</i> em plantas de milho	50
4.2 Ensaio de quantificação de <i>F. verticillioides</i> e <i>M. maydis</i> em planta	56
5. Discussão	63
6. Conclusão	69
7. Referências Bibliográficas	70
8. ANEXOS	74
Anexo I- Quadro das amostras que deram positivo e negativo com os diferentes primers utilizados no PCR, nomeadamente T1/T22 e Fa+7/Ra+6.....	74
Anexo II- Valores Ct dos vasos apenas com <i>Fusarium verticillioides</i>	76
Anexo III- Valores Ct do <i>F. verticillioides</i> na mistura com ambos os fungos.....	77

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Índice de Figuras

Figura 1 Evolução das áreas de milho a nível nacional, tanto para grão como para silagem, desde o ano de 2004 até 2018 (Anpromis, 2019).....	16
Figura 2 Fenologia do milho e estádios de desenvolvimento da cultura VE- representa emergência da planta; Vn- representa o número de folhas desenvolvidas; Rn- representa a fase reprodutiva (Ritchie et al. 1996).....	18
Figura 3 Representação de diferentes sintomas causados por carências nutritivas, causadas por doenças e utilização de produtos químicos (Fernandez, 2009).....	20
Figura 4 A- Imagem ao microscópio de macroconídios B- Imagem ao microscópio de microconídios; C- Imagem ao microscópio de clamidósporos (Silva, 2011).....	22
Figura 5 Características culturais e morfológicas do <i>Fusarium Verticillioides</i> A) cor violeta típica do fungo em PDA; B) microconídios em cadeias e aglomerados; C) microconídios formados a partir de monofialídeos (Geiser et al., 2004)	23
Figura 6 Características culturais e morfológicas do <i>F. proliferatum</i> : G) microconídios em meio de cultura PDA H) em cadeias carregadas em monofialides / polifialides e I) macroconídios 3-5 de septos (Geiser et al., 2004).....	24
Figura 7 Ciclo de vida do fungo <i>Fusarium</i> sp. na cultura do milho (Pioneer Sementes).....	25
Figura 8 Sintomas característicos do agente patogénico <i>Fusarium</i> sp. na cultura do milho, como alteração da cor da medula para esbranquiçada e podridão do caule (Scarpino et al., 2015).....	27
Figura 9 Caracterização microscópica do fungo <i>Magnaporthiopsis maydis</i> ; A- conidiosporos com conídios, 1000x em meio de PDA; B- Conidiosporos com fiálides, 1000x em meio de PDA; C- conídios, hinfas e conidiosporos, 1000x, em meio de PDA (Sabet et al. 1963).....	30
Figura 10 <i>Magnaporthiopsis maydis</i> em meio de cultura PDA A- com 6 dias (Drori et al., 2013); B – com 12 dias.....	30
Figura 11 Principais sintomas da doença da murchidão tardia. A- Apresenta necroses nas raízes; B- Caule oco e encolhido, com a medula macerada amarela; C- Feixes vasculares amarelo/acastanhados (Huber et al., 2008).....	33
Figura 12 Raízes e caule de plantas de milho, após lavagem e antes de serem previamente desinfetados.....	37
Figura 13 Processo de desinfecção e limpeza das raízes e caule das plantas de milho e sua colocação em placas de Petri com meio PDA	38
Figura 14 Apresentação esquemática do princípio da técnica PCR, Fonte: (Garibyan and Avashia, 2013).....	41
Figura 15 Representação esquemática da região do rDNA do fungo. As setas representam a posição dos <i>primers</i> T1 e T22 (LUTZONI LAB; LICHENOLOGY & PHYLOGENETICS).....	42
Figura 16 Contagem de esporos do fungo <i>Fusarium verticillioides</i> pelo microscópio ótico (Olympus BX-50,) (ampliação de 1000x).....	45

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Figura 17 Primeiro dia de ensaio experimental, onde foram aplicadas 4 sementes em cada vaso.....	46
Figura 18 Sementes germinadas em placas de Petri	46
Figura 19 Ensaio experimental após 2 semanas	47
Figura 20 Ensaio experimental após 1 mês.....	47
Figura 21 Placas de Petri; A- placas de Petri, após um dia da colocação das raízes e caule das plantas de milho, sem crescimento de fungos. B- 2 semanas, após a colocação das raízes e caule de milho com crescimento de vários fungos.....	50
Figura 22 Seleção de placas de Petri com diferentes tipos de organismos com características semelhantes e os organismos representativos para o estudo.....	50
Figura 23 Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> Fa +7 e Ra+6. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb Plus; 1-17 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.....	51
Figura 24 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> T1 e T22. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1 kb PLUS 1- 17 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo; CP- Controlo Positivo.....	51
Figura 25 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> Fa +7 e Ra+6. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb PLUS 18- 33 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo Negativo.....	52
Figura 26 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> T1 e T22. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1 kb PLUS 18-33 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo	52
Figura 27 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> Fa +7 e Ra+6. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb PLUS 34- 50 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.....	53
Figura 28 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> T1 e T22. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1 kb PLUS 34-50 amostras testadas (Anexo I); CN- controlo negativo.....	53
Figura 29 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> Fa +7 e Ra+6. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb PLUS 51- 61 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.....	54
Figura 30 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> T1 e T22. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1 kb PLUS 51- 61 amostras testadas (Anexo I); CN-controlo negativo.....	54

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Figura 31 Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos <i>primers</i> Fa +7 e Ra+6. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb PLUS 62-69 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.....	55
Figura 32 Observação de necroses nas raízes das plantas emergidas do ensaio experimental ao fim de mês de ensaio, apenas dos vasos que continham a mistura dos dois agentes patogénicos e os vasos que continham apenas <i>M. maydis</i>	56
Figura 33 Gráfico de Amplificação do <i>F. verticillioides</i> na raiz e no colmo do ensaio apenas com <i>F. verticillioides</i> . A vermelho está representado a curva de amplificação da raiz e a verde a curva de amplificação do colmo.....	57
Figura 34 Gráfico de amplificação do <i>M. maydis</i> na raiz e no colmo do ensaio apenas com plantas inoculadas com <i>M. maydis</i>	58
Figura 35 Gráfico de amplificação do <i>F. verticillioides</i> na raiz e no colmo do ensaio com os dois agentes patogénicos (<i>F. verticillioides</i> e <i>M. maydis</i>).....	59
Figura 36 Gráfico de amplificação do <i>M. maydis</i> na raiz e no colmo do ensaio com os dois agentes patogénicos (<i>F. verticillioides</i> e <i>M. maydis</i>).....	59
Figura 37 Comparação do crescimento do <i>F. verticillioides</i> na raiz e no colo ao fim de 15 dias (tempo 1) e ao fim de um mês (tempo2) nas plantas apenas infetadas com <i>F. verticillioides</i>	60
Figura 38 Comparação da quantidade de <i>F. verticillioides</i> na raiz e no colo ao fim de 15 dias (tempo 1) e ao fim de um mês (tempo2) na mistura com os dois agentes patogénicos	61

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Índice de Quadros

Quadro 1 Programa de amplificação por PCR em que foram utilizados os <i>primers</i> Fa+7 e Ra+6.....	43
Quadro 2 Programa de amplificação por PCR em que foram utilizados os <i>primers</i> T1 e T22.....	43
Quadro 3 <i>Primers</i> e sondas utilizados neste trabalho (Patanita et al. 2019).....	48
Quadro 4 Espécies do género <i>Fusarium</i> spp. isoladas provenientes tanto de amostras de Espanha como de Portugal.....	56

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura que se adapta bastante bem a diferentes condições edafo-climáticas, podendo ser encontrada em diferentes partes do mundo como nos Estados Unidos da América, República Popular da China, Índia, Brasil, França, Indonésia, África do Sul, entre outros. A cultura do milho tem vindo a crescer nos últimos anos, devido à sua importância nutricional na alimentação humana e dos animais, como também na sua utilização para biocombustível. Em Portugal, o milho é o cereal mais produzido (Anpromis, 2020).

A nível nacional esta está associada quer à produção de silagem quer à produção de grão. Esta cultura é cultivada em regadio, de forma a tirar maior partido desta. Atualmente, existem diferentes híbridos que estão adaptados a diferentes condições edafo-climáticas que têm conduzido a um aumento significativo da produtividade da cultura no nosso país.

Nos dias de hoje, existe a preocupação de utilização de práticas culturais não prejudiciais ao ambiente e ao Homem. Isto significa que há preocupação por parte dos agricultores, em utilizar práticas culturais mais sustentáveis, tentando adaptar da melhor forma as culturas, aos fatores como o clima e o solo.

Estas práticas culturais incluem, a mobilização mínima, uma fertilização equilibrada, sistemas de drenagem, rotação de culturas e uma proteção fitossanitária adequada e equilibrada.

Em relação à proteção fitossanitária, cada vez mais é importante compreender e desenvolver métodos para controlar a incidência de pragas e doenças nas culturas. Para tal, o estudo da presença de importantes doenças em culturas de elevado impacto económico e a forma como os agentes fitopatogénicos se comportam no interior das plantas é essencial para desenvolver métodos de controlo eficazes.

Dado os prejuízos que os fungos *Fusarium* sp. e *Magnaporthe oryzae* causam na cultura do milho, causando perdas acima de 50%, neste trabalho foi realizada a identificação destes agentes fitopatogénicos em plantas de milho de diferentes regiões, de Portugal e Espanha. Para tal, foi realizada:

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

1. O isolamento e identificação dos fungos pertencentes aos géneros *Fusarium* e *M. maydis* em amostras de milho, por observação microscópica e por caracterização molecular (PCR e sequenciação).
2. Análise da interação entre *Fusarium* sp. e *M. maydis* em plantas de milho, inoculadas com espécies de ambos os géneros, através da sua quantificação por qPCR.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Cultura do Milho

2.1.1 Área e Produção de Milho no Mundo e em Portugal

A produção de milho tem uma influência economicamente elevada tanto a nível mundial como nacional, pois está fortemente presente na alimentação humana e animal, é a base alimentar de comunidades rurais e de animais devido às suas elevadas qualidades nutricionais (Vismer et al., 2019). A forma como o milho é processado e consumido varia bastante de país para país, sendo o produto mais popular a farinha de milho (Ranum et al., 2014).

Existem diferentes tipos de milho que são cultivados em diferentes partes do mundo, com uma diferença importante, a cor, que está relacionada com as suas características. Estes podem apresentar, diferentes cores, variando de branco para amarelo, como de vermelho para preto. No EUA, as pessoas consomem maioritariamente milho amarelo, no entanto em África, na América central e sul, a preferência é de milho branco (Ranum et al., 2014).

Os maiores produtores de milho são os Estados Unidos, a China e o Brasil, produzindo aproximadamente em conjunto um total de 563 717 milhões de toneladas por ano, o que torna o milho um dos cereais mais importantes (Czembor et al., 2015) a nível mundial. O milho pode ser transformado numa variedade de produtos industriais e alimentares, incluindo amido, adoçantes, óleo, bebidas, cola, álcool industrial e biocombustível. O seu papel tem vindo a crescer bastante na indústria e nos recursos energéticos, sendo que este último representa cerca de 40% da produção de milho nos EUA. A produção de etanol como combustível resultou no aumento do preço do milho como também da área cultivada (Ranum et al., 2014).

O relatório *World Agricultural Supply and Demand Estimates* (Wasde), mostrou que a produção de grãos grandes (nomeadamente milho, sorgo, cevada, aveia e centeio) prevê uma produção global para o ano de 2019/2020 de 1401,7 milhões de toneladas. Quanto aos EUA prevê-se uma produção de 360,82 milhões de toneladas, continuando este país à frente no que respeita a produção de milho.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Quanto ao território português, o milho é considerado a cultura arvense mais importante, segundo a Associação Nacional de Produtores de Milho e Sorgo (Anpromis), e é destacadamente, a que mais explorações agrícolas envolve desde 2006, ocupando atualmente no nosso país uma área de 118 220 hectares. A cultura do milho, está associada quer à produção de silagem quer à produção de grão. Apresenta uma enorme potencialidade produtiva na agricultura portuguesa de regadio, pois a cultura tira maior proveito nestas condições de produção (Anpromis, 2019). Segundo a Anpromis, cerca de 70 078 hectares foram destinados para a produção de grão e o restante 48 142 hectares para silagem (Figura 1). Através dos dados da Direção Regional de Agricultura, a maior área de produção de milho encontra-se no norte do país, ocupando uma área de 42 499 hectares, de seguida o centro do país com 26 206 hectares, Lisboa e Vale do Tejo com 22 828 hectares, Alentejo com 14 447 hectares, Açores com 12 232 hectares e por fim o Algarve apresentando uma área de 42 hectares.

O milho é assim, e de forma destacada, a cultura arvense com maior expressividade a nível nacional, representando cerca de 39% da área total de cereais semeada (Anpromis, 2019).

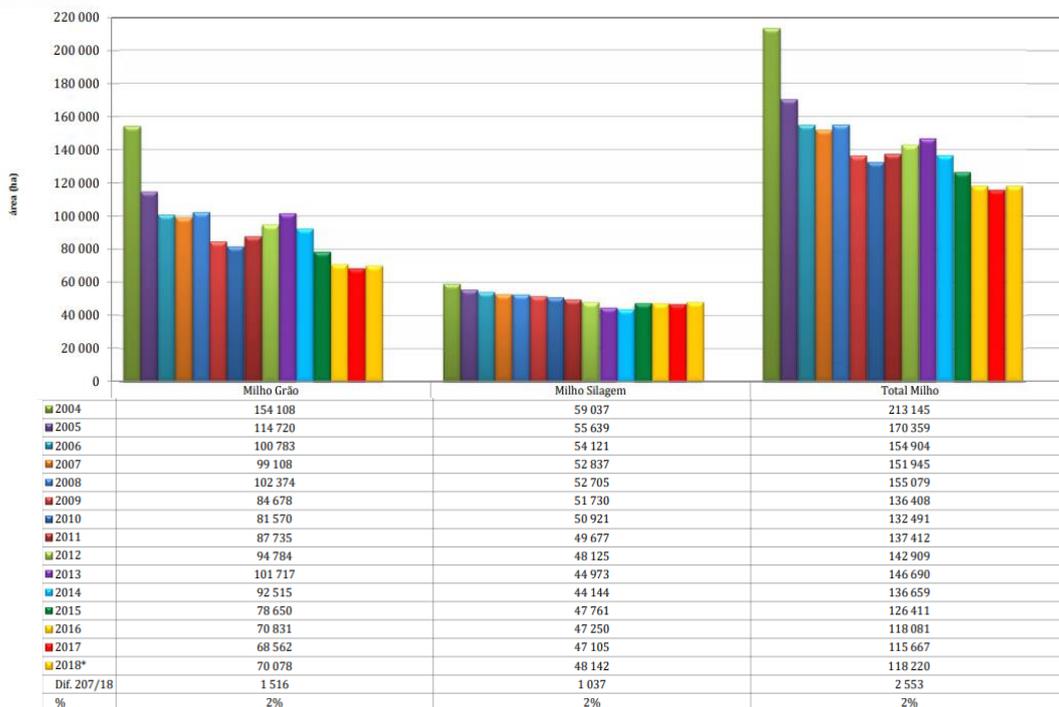


Figura 1 | Evolução das áreas de milho a nível nacional, tanto para grão como para silagem, desde o ano de 2004 até 2018 (Anpromis, 2019).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Apesar de em 2018 se verificar uma pequena subida nas áreas e produção de milho a nível nacional em relação ao ano 2017, tanto de milho para grão como milho para silagem (Figura 1), é notório que a produção nacional de milho tem vindo a decrescer ao longo dos anos.

Atualmente, apenas cerca de 40% do milho consumido em Portugal, é resultante da produção nacional, sendo o restante proveniente de importações. Relativamente ao ano de 2017, verificou-se que para o milho houve uma produção de 745 123 toneladas, sendo as importações de 2 136 296 toneladas e as exportações de 74 122 toneladas, o que significa que existiu uma reduzida produção nacional de milho quando comparada com as importações (INE, 2018).

2.1.2 Características gerais do milho

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea anual, semeada nos meses de março a maio, ou seja, é uma cultura de Primavera-Verão, nas condições climáticas de Portugal. Para escolher a cultivar, existem alguns critérios, destacando-se assim, duração do ciclo vegetativo, potencial produtivo, tolerância a adversidades climáticas como défices hídricos e geadas entre outras características (Barros & Calado, 2014).

A nível nacional, as variedades mais utilizadas são as de ciclo médio a semi tardio (FAO 500 a FAO 600), ou seja, um ciclo aproximadamente de 150 dias. Contudo, a duração do ciclo e o desenvolvimento da cultura podem variar devido a diferentes fatores como a temperatura, a quantidade de água correspondente à precipitação, a fertilidade do solo, o fotoperíodo e a radiação solar. Todos estes fatores têm influência sobre o crescimento e desenvolvimento da planta, sendo a temperatura o fator determinante (Barros & Calado, 2014).

O ciclo da cultura do milho divide-se em dois períodos, o período vegetativo (V) e o período reprodutivo (R).

No primeiro período ocorre o desenvolvimento da planta e durante o segundo ocorre o desenvolvimento da espiga de milho (Ritchie et al., 1996; DuPont Pioneer, 2017; Patanita, 2018). A planta do milho apresenta sequencialmente as seguintes fases: germinação, emergência, emissão de folhas, aparecimento da panícula, floração masculina, floração feminina, formação do grão, enchimento dos grãos e maturação (Figura 2). O início da fase vegetativa começa com a emergência da planta (VE). As divisões seguintes, V1, V2, V3, Vn... correspondem ao número de folhas desenvolvidas na planta. O VT corresponde

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

à fase de floração masculina, que é a última das subdivisões da fase vegetativa (Abendroth et al., 2011). O desenvolvimento das plantas, pode variar conforme o tipo de híbrido, o ano agrícola, a data de sementeira e localização (Abendroth et al., 2011). A fase vegetativa prolonga-se quando as condições nutritivas, temperatura e humidade não são as ideais. O Rn, representa a fase reprodutiva, sendo que n varia de 1 que coincide com a polinização/fecundação até 6 que corresponde à maturação fisiológica (Figura 2).

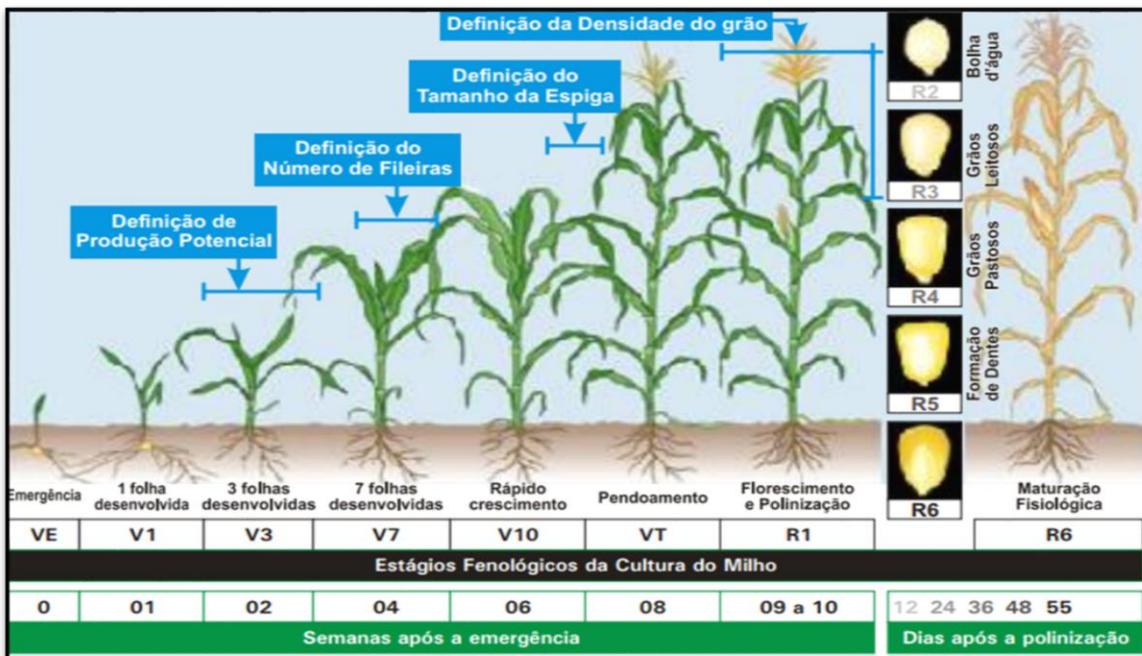


Figura 2 | Fenologia do milho e estádios de desenvolvimento da cultura VE- representa emergência da planta; Vn- representa o número de folhas desenvolvidas; Rn- representa a fase reprodutiva (Ritchie et al. 1996).

2.1.3 Condições necessárias da cultura

O milho é uma planta que se adapta bastante bem a diferentes condições climáticas, uma vez que tanto se pode encontrar em climas tropicais, subtropicais como em climas temperados. Requer um período de crescimento longo, e um clima quente, pois não é possível realizar a sua sementeira em locais onde a temperatura média seja inferior a 19°C, ou onde a média da temperatura noturna durante os meses de verão seja inferior a 13°C (López-Bellido, 1991; Barros & Calado, 2014).

A temperatura é um fator bastante importante na cultura do milho, pois para um bom crescimento do caule as temperaturas devem variar entre 25°C a 35°C. A maior produção atingida, é quando as temperaturas médias dos meses mais quentes variam entre 21°C e 27°C com períodos de 120 a 180 dias sem geadas. Apesar desta cultura ser bastante

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

resistente ao frio, o seu crescimento torna-se mais lento e limitado quando as temperaturas são muito baixas (Bellido, 1991; Barros & Calado, 2014).

De forma a ultrapassar a irregularidade pluviométrica em Portugal, o milho é produzido em regadio, para tirar o maior partido das temperaturas e da insolação que o país dispõe, permitindo à planta uma expressão produtiva elevada. Para a cultura do milho sobreviver sem qualquer tipo de rega, durante o período vegetativo o limite mínimo de precipitação é 150 mm (Barros & Calado, 2014).

Quanto ao solo, deve ser bem drenado e arejado, apresentar uma boa estrutura, permitindo uma boa circulação da água e do ar, alta capacidade utilizável e grande disponibilidade de nutrientes (López-Bellido, 1991). Esta cultura prefere solos de textura mediana, de franco a franco-limoso no horizonte (A) e tolera pH entre 5 e 8, no entanto solos de pH a tender para 5 podem apresentar teores de alumínio e ferro que são bastante tóxicos para as plantas (Barros & Calado, 2014).

Tal como em todas as outras culturas, os nutrientes absorvidos em maior quantidade na cultura do milho são, o azoto (N), o fósforo (P_2O_5) e o potássio (K_2O). Por vezes, as carências nutritivas são confundidas com sintomas causados por agentes patogénicos, por exemplo, quando existe deficiência de azoto, a planta apresenta cloroses generalizada a qual é iniciada nas folhas mais velhas, progredindo para as mais novas. À medida que o tecido amarelo vai secando, ao fim de algum tempo aparece um aspeto de queimado (Figura 3), o que se pode confundir com sintomas de algumas doenças do milho (Malavolta et al., 1975).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

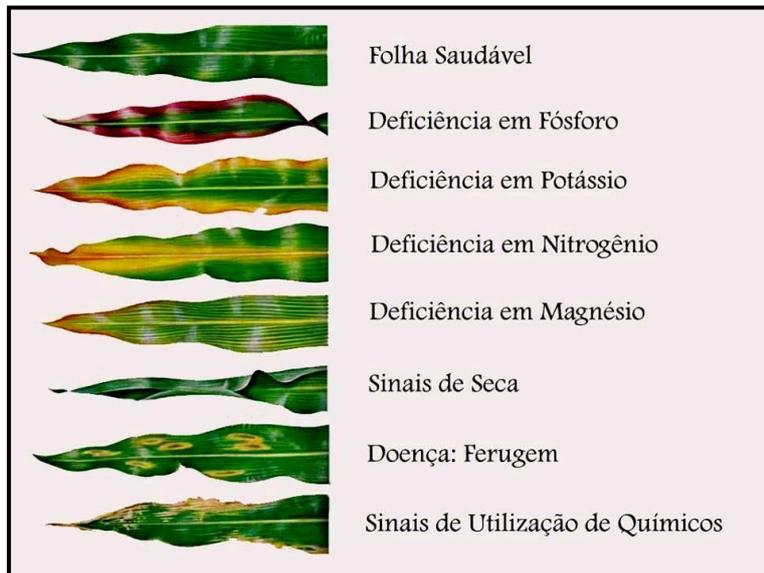


Figura 3 | Representação de diferentes sintomas causados por carências nutritivas, causadas por doenças e utilização de produtos químicos (Fernandez, 2009).

2.2 Doenças associadas à cultura do milho

O milho é afetado por várias doenças causadas por diferentes agentes que podem ter um impacto muito significativo na sua produção, entre os quais se encontram as provocadas por fungos. As doenças causadas por fungos podem afetar diversas partes da planta de milho, tais como: folhas, colmos, raízes, órgãos reprodutivos (panícula e espiga) e sementes. As principais doenças que afetam o milho são a cercosporiose (causada por *Cercospora zae-maydis*), a mancha branca (causada por *Phaeosphaeria* sp.), a ferrugem (causada por *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora* e *Physopella zae*), a helmintosporiose (causada por *Exserhillum turcicum*), mancha de diplodia (causada por *Stenocarpella macrospora*), antracnose (causada por *Colletotrichum graminicola*), *F. moniliforme* (Teliomorfo *G. moniliformis*), e a murchidão tardia, causada pelo *Magnaporthiopsis maydis* (The Cimmyt Maize Program, 2004; Barros & Calado, 2014;).

Nos últimos tempos tem-se vindo a verificar a forte presença de *Fusarium* spp. e um aumento muito significativo de *M. maydis* no milho (Molinero-Ruiz et al., 2010). Nos pontos seguintes vão-se descrever com maior pormenor estas doenças.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

2.2.1 Fusariose

A fusariose no milho é uma doença bastante comum pelo mundo, é causada por fungos do género *Fusarium* sp. E apresenta uma importância crescente, devido às quebras de produção a si associadas na cultura do milho. Este fungo é responsável pela podridão da raiz e do caule, levando a quebras de 10% a 30% da produção (Embrapa Milho e Sorgo, 2012). O fungo causador desta doença é capaz de se adaptar a qualquer tipo de condições edafo-climáticas, devido à sua diversidade morfológica, fisiológica e ecológica. Quanto às espécies de *Fusarium* sp., atualmente está comprovado a sua relação com a produção de micotoxinas que tem efeitos prejudiciais à saúde humana e dos animais, onde se incluem as fumonisinas e moniliformia (Vismer et al., 2019).

O género *Fusarium*, segundo a classificação taxonómica, constitui um estado anamórfico da ordem Hypocreales do filo Ascomycota. Dentro deste grupo encontram-se as espécies *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium subglutinans*, que representam os anamorfos das espécies *Gibberella moniliformis*, *Gibberella intermedia* e *Gibberella subglutinans*, respetivamente. Atualmente, estas três espécies pertencem ao complexo *Gibberella fujikuroi* (Pessoa et al., 2015).

Quanto à sua taxonomia este pertence:

- **Reino:** Fungi
- **Filo:** Ascomycota
- **Classe:** Sordariomycetes
- **Família:** Nectriaceae
- **Género:** *Fusarium*

O género *Fusarium* sp. apresenta uma grande diversidade no que toca à morfologia: inclui espécies que produzem macroconídios hialinos, geralmente septados, possuindo as células basal e apical diferenciadas, esta característica apresenta uma grande relevância para a diferenciação das diferentes espécies. Os macroconídios, por sua vez, podem apresentar as seguintes formas: delgado, com aspeto de agulha; com curvatura dorsal e ventral; com a curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral; com as células apical e basal; podem ser grossos, papilados, em forma de gancho, afilados, em forma de pé, em forma de pé alongado, distintamente entalhados e escassamente entalhados. Quanto aos microconídios também apresentam diferentes formas, podendo ser: ovais, reniformes ou alantoides, obovoides com a base truncada, piriformes,

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

napiformes ou globosos. Quanto aos clamidósporos, podem estar presentes ou ausentes (Hawksworth et al., 1995). O fungo pode sobreviver na forma de micélio ou conídios (Figura 4) (Agrios, 1998).

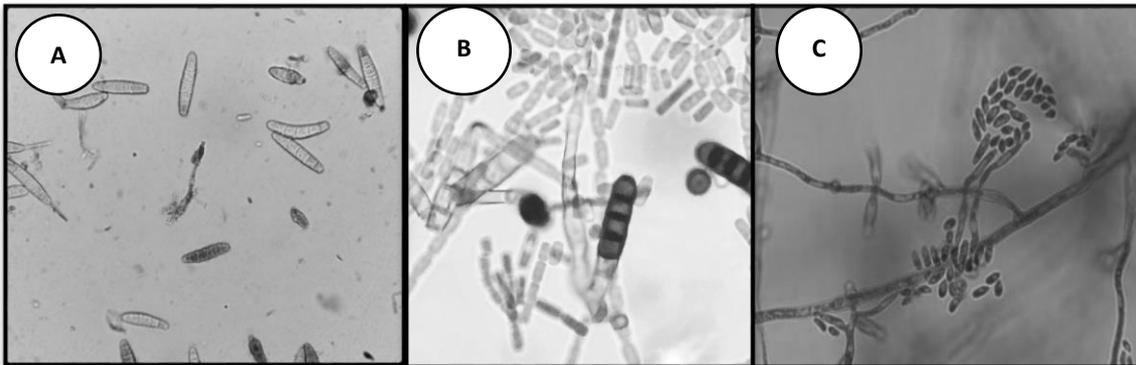


Figura 4 | A- Imagem ao microscópio de macroconídios B- Imagem ao microscópio de microconídios; C- Imagem ao microscópio de clamidósporos (Silva, 2011).

Em laboratório existem algumas condições ambientais que permitem o crescimento mais uniforme e equilibrado da doença, em meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*) sólido, as colónias atingem um diâmetro de 90 mm em apenas uma semana entre 23°C a 25°C. Como existem diferentes espécies deste género *Fusarium* sp., a coloração pode variar de cor de rosa, a branco como amarelo.

2.2.1.1 Espécies de *Fusarium* spp. associadas à doença do milho

Existem múltiplas espécies do género *Fusarium* que podem causar a doença da fusariose no milho. As espécies mais importantes são *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (Vismer et al., 2019), no entanto existem outras espécies que são capazes de colonizar as plantas de milho, mas com menos relevância, tais como, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporium* (Leslie et al., 2005).

O *Fusarium verticillioides* sinónimo, *Fusarium moniliforme* Sheldon; teleomorfo, *Gibberella moniliformis* [sinónimo, *Gibberella fujikuro*], foi primeiramente associado a uma doença presente nos animais. É um agente patogénico primário da cultura do milho com ampla distribuição mundial, sendo favorecido em climas temperados (Scarpino et al., 2015). Este fungo é capaz de provocar perdas económicas significativas para produtores, processadores de grãos e criadores de animais (Lanza et al., 2012).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

O *F. verticillioides*, na sua forma sexuada é um fungo que não é considerado muito prolífico sexualmente, ou seja, não produz muitas estruturas de frutificação (peritecas), por essa razão é considerado heterotático, isto significa que apresenta dois tipos de produção de estruturas de frutificação.

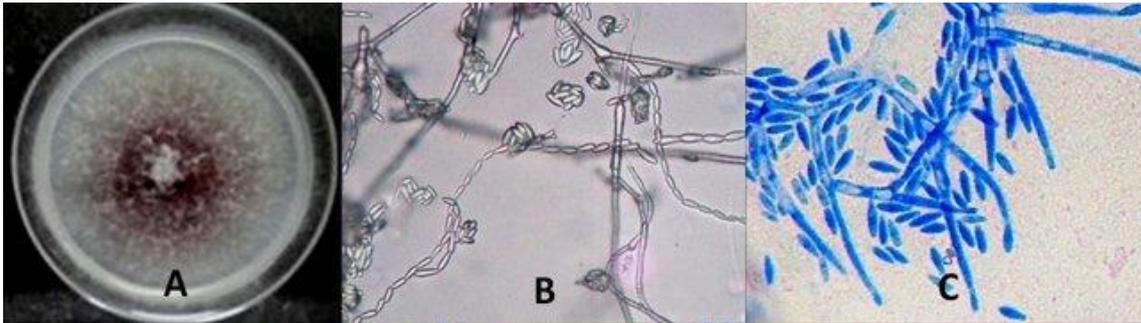


Figura 5 | Características culturais e morfológicas do *Fusarium Verticillioides* A) cor violeta típica do fungo; B) microconídios em cadeias e aglomerados; C) microconídios formados a partir de monofialídeos (Geiser et al., 2004).

O *Fusarium verticillioides*, está amplamente distribuído por toda a parte do mundo, e é responsável por causar graves problemas e prejuízos na cultura do milho, como a podridão do colmo e da raiz, que por sua vez origina a morte da planta devido à falta de água e nutrientes na mesma. Como se trata de um agente patogénico polífago e cosmopolita, conseguimos encontrá-lo tanto em regiões temperadas como em climas tropicais e subtropicais. Dentro das diferentes espécies do grupo *G. fujikuroi*, o *F. verticillioides* é o fungo mais comum associado aos grãos de milho e aos seus subprodutos nos países europeus, como França, Espanha e Itália. Este fungo pode ser observado também noutras culturas, tais como, bananas, beterraba, cana-de-açúcar, aveia, algodão e em várias forrageiras (Pessoa et al., 2015).

Em relação ao *Fusarium proliferatum*, este apresenta o estado sexual da *Gibberella intermedia*. O *F. proliferatum* também não produz clamidósporos como o *F. verticillioides*, assim como as espécies do complexo *G. fujikuroi* (Pessoa et al., 2015).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

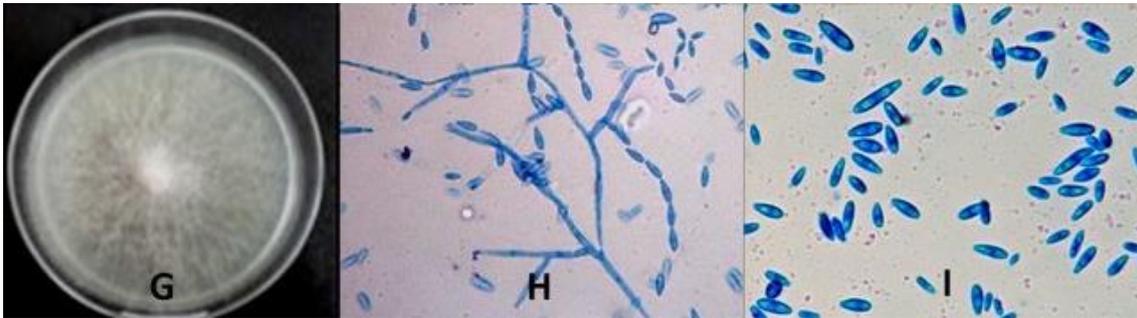


Figura 6 | Características culturais e morfológicas do *F. proliferatum*: G) microconídios H) em cadeias carregadas em monofialides / polifialides e I) macroconídios 3-5 de septos (Geiser et al., 2004).

Este agente patogénico, após entrar na planta, inicialmente a planta não apresenta qualquer tipo de sintoma, no entanto com a evolução da infeção por parte do fungo, começa-se a observar claramente os sintomas da doença (Sikhakolli et al., 2012)

Deve-se ter em consideração este fungo, pelo facto de este ter um grande impacto na produção de milho, mas também noutras culturas, como o sorgo, espargo, banana, citrinos, orquídeas e na cultura do arroz (Pessoa et al., 2015).

2.2.1.2 Condições Favoráveis e Ciclo de Vida

O facto de existir uma grande diversidade de espécies de *Fusarium* sp., faz com que este se adapte bastante bem a diferentes climas.

A incidência do *Fusarium* sp. é desfavorecida quando existe um excesso de precipitação, pois acaba por diminuir a sua dispersão pelo ar. Num ano com menor precipitação, a incidência de ferimentos causados por insetos é maior, o que favorece a penetração de fungos na planta.

Para além da água, a fertilidade do solo é um fator bastante importante no que diz respeito ao desenvolvimento da doença na planta. Existe menor incidência da doença quando a aplicação da quantidade de azoto e potássio são maiores (Denti et al., 2003). O equilíbrio entre estes dois nutrientes determina a quantidade de aminoácidos e açúcares solúveis acumuladas no colmo de milho, os quais são fonte de nutrientes para os fungos. Por outro lado, uma deficiência pode causar o atraso no processo de cicatrização das lesões da planta, favorecendo a entrada dos fungos (Yamada, 1995). Solos com elevado teor de areia, baixo pH favorecem a doença (Walker et al., 2016).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

O fungo *F. verticillioides* está adaptado a uma ampla faixa de temperatura, no entanto as temperaturas ideais variam entre 25°C a 32°C (Munkvold et al,1997b).

O ciclo de infecção e desenvolvimento da fusariose consiste num sistema complexo, associado com todas as fases do desenvolvimento da cultura do milho. A infecção do fungo na planta ocorre no sistema radicular. O fungo atinge as raízes, os entrenós inferiores, podendo afetar também os entrenós superiores, o tubo germinativo do esporo ou do micélio penetra diretamente nos pelos radiculares ou através de feridas existentes. O fungo à medida que se vai desenvolvendo no interior da planta, produz microconídios que são transportados da raiz até atingir a parte superior da planta e vão aparecendo os primeiros sintomas. Os conídios já na parte superior da planta, com ajuda do vento e da água são disseminados para outras plantas infetando-as (Figura 7)(Figueira et al., 2003; Munkvold, 2003).

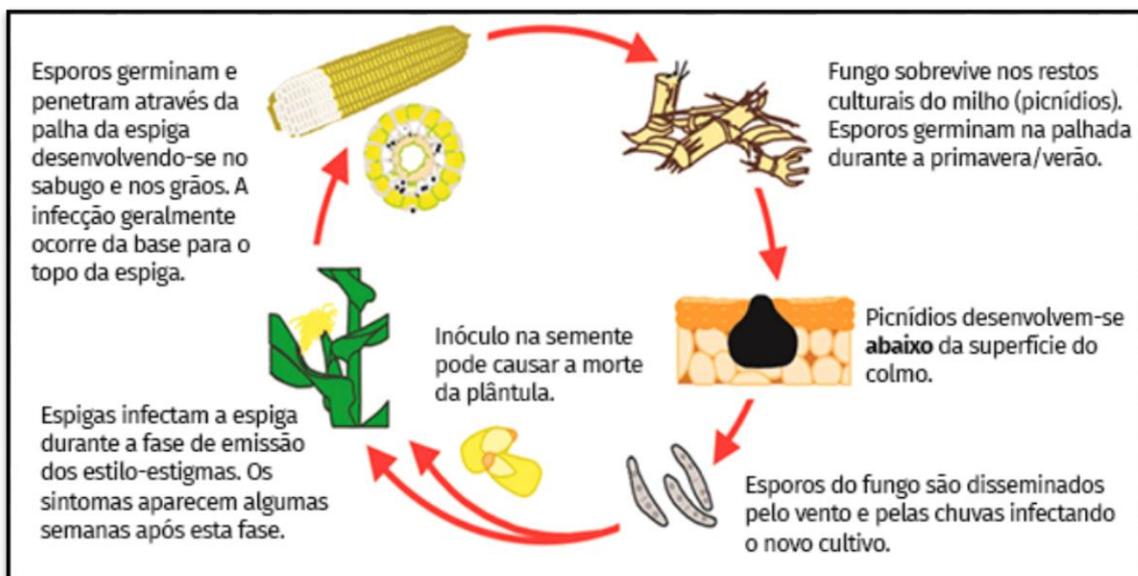


Figura 7 | Ciclo de vida do fungo *Fusarium* sp. na cultura do milho (Pioneer Sementes).

Os macroconídios conseguem sobreviver durante bastante tempo no solo, podendo infetar a cultura em diferentes estações do ano. Como foi anteriormente referido, o fungo pode ser disseminado através do vento, da rega, ou da precipitação, infetando as plantas na sua fase de crescimento. Quanto aos microconídios estes conseguem sobreviver mais do que um ciclo de vida, no seu estado de repouso, conseguem permanecer no solo cerca de 900 dias, no entanto a sua sobrevivência está altamente relacionada com a temperatura e humidade relativa. As principais espécies de *Fusarium* que infetam o milho não produzem clamidósporos como estruturas de resistência, no entanto estes fungos podem permanecer no solo na sua forma sexuada em forma de

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

peritecas, enterradas até cerca de 30 cm de profundidade durante 12 meses (Scarpino et al., 2015). Esta espécie pode infectar a planta de duas formas, através das sedas das espigas, sob a forma de conídios, ou através da semente sob a forma de conídios ou micélio. Por norma, as infeções através das espigas não são tão severas, pois só uma pequena percentagem se torna sintomática. No entanto, no que toca à infeção das sementes, o fungo vai-se desenvolvendo no interior da planta, passando pela raiz até aos grãos (Oren et al., 2003).

2.2.1.3 Sintomas, prejuízos e distribuição geográfica

O *Fusarium* sp. é um dos agentes patogénicos com maior relevância na fitopatologia vegetal mundial, geralmente os sintomas a si associados incluem o aparecimento de necroses nas raízes das culturas pois são fungos habitantes do solo, a queda prematura das folhas, redução do crescimento e finalmente a podridão e morte das plantas (Booth, 1971; Nelson et al., 1983,). A podridão é o sintoma mais comum, podendo observar-se estes sintomas também em plantas jovens (Tinoco et al., 2010). Existe uma alteração da cor da medula, que pode variar de esbranquiçada a acastanhada, (Figura 8) (Barros & Calado, 2014). A doença quando está no estado muito avançado, pode provocar a quebra do colmo. As diferentes espécies do género *Fusarium* estão relacionadas com os sintomas de pré e pós-emergência, redução da germinação das sementes e *damping-off*, respetivamente (Walker et al., 2016).

Como já foi referido o *F. verticillioides* é uma espécie que pode ser encontrada em resíduos dos campos de milho, onde os sintomas da doença podem variar muito, tanto pode ser assintomático como pode levar à súbita podridão das raízes das plantas. Existem casos que as plantas estão infetadas mas não apresentam sintomas, no mesmo campo onde plantas apresentam graves sintomas da doença (Oren et al., 2003).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose



Figura 8 | Sintomas característicos do agente patogênico *Fusarium* sp. na cultura do milho, como alteração da cor da medula para esbranquiçada e podridão do caule (Scarpino et al., 2015).

Esse fungo é um habitante do solo capaz de sobreviver nos restos de cultura na forma de micélio e apresenta várias espécies vegetais como hospedeiras o que torna a medida de rotação de cultura pouco eficiente. Devido aos sintomas a si associados, torna-se importante ter meios para controlar esta doença. As perdas na produção estão intimamente ligadas com a interrupção precoce da translocação de fotoassimilados do colmo para o enchimento de grãos, devido à destruição dos tecidos internos do colmo e pela quebra e acama de plantas antes da colheita (Nazareno, 1989).

Além dos prejuízos anteriormente referidos, descobriu-se que a ocorrência de espécies de *Fusarium* sp. no milho, leva à produção de micotoxinas que têm efeitos nocivos à saúde humana e dos animais (Marasas et al., 2012; Cendoya et al., 2017). As espécies de *Fusarium* produzem inúmeras micotoxinas, incluindo fumonisinas e moniliformia que tem graves efeitos tanto na saúde humana como na saúde dos animais que consomem farinhas contaminadas com este fungo (Vismer et al., 2019). As fumonisinas têm sido amplamente estudadas desde a sua descoberta em 1988 (Gelderblom et al., 1988). Nos humanos, estas toxinas são consideradas possivelmente cancerígenas (Group 2B carcinogen) pelo IARC (Ostry et al., 2017), e estão associados a mutações existentes no cérebro de recém-nascidos (Gelineau-van Waes et al., 2009). A produção destas toxinas depende de alguns fatores, nomeadamente genéticos (Proctor et al., 2004) e ambientais (Marín et al., 2004).

No que diz respeito ao *F. verticillioides* e ao *F. proliferatum* estes conseguem produzir mais ou menos toxinas conforme as condições a que estão dispostos, nomeadamente (Leslie et al., 1992; Nelson; et ai., 1992), luz, substrato, pH, potencial hídrico, temperatura entre outros (Vismer et al., 2019).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Dessa maneira, a presença do fungo nas sementes reveste-se com uma importância extra, não somente devido aos danos económicos que suporta, mas também pelo perigo do consumo das sementes infetadas e seus derivados (Lanza et al., 2012).

O *Fusarium* sp. como já foi anteriormente referido, expressa uma grande importância na agricultura por ser um agente patogénico que afeta diversas culturas. Nos EUA, este fungo foi responsável por provocar graves quebras de produção. Na Nigéria, a doença provocou quebras acima dos 50 % e no Brasil chegou aos 70 % de produção (Tinoco et al., 2010).

O *Fusarium* sp. apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente em todos os ambientes, podendo encontrar-se em regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio nas regiões temperadas, encontrando também espécies que apresentam íntima associação com os seus hospedeiros (Alecopoulos et al., 1996). Este agente patogénico encontra-se na América Central, Índia, Jamaica, Japão, Hong Kong, Sul da China, Taiwan, Turquia, Zimbábue, Nigéria, Israel, Egito, Líbia, Alemanha, Nepal, Nova Zelândia, Austrália, Itália, Brasil, Estados Unidos, Filipinas, Indonésia e Canadá.

Em diferentes regiões geográficas, o clima influencia o número de espécies de *Fusarium*, a gama de hospedeiros e a sua virulência (Summerll, 2006).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

2.2.2 Murchidão tardia

O agente causal da doença denominada por murchidão tardia no milho, ou doença vascular do milho (*Zea mays* L.) é causada pelo fungo é o *Magnaporthiopsis maydis*, sinónimo *Harpophora maydis*, *Acremonium maydis* e *Cephalosporium maydis* (Degani et al., 2019).

O fungo *Magnaporthiopsis maydis* apresenta a seguinte classificação taxonómica (Samra et al., 1963; Gams, 2000):

- **Reino:** Fungi
- **Filo:** Ascomycota
- **Sub-Filo:** Pezizomycotina
- **Classe:** Sordariomycetes
- **Sub-Classe:** Sordariomycetidae
- **Família:** Magnaporthaceae
- **Género:** *Harpophora*
- **Espécie:** *Magnaporthiopsis maydis*

Relativamente à morfologia do *M. maydis*, este foi descrito tendo em conta a sua produção, por apresentar uma única fiálide, estrutura hialina em forma de cabeça, constituída por conídios não septados (Samra et al., 1963). Este fungo está relacionado morfologicamente e molecularmente com o complexo de espécies *Gaeumannomyces* e *Magnaporthie* (Gams, 2000). Mais tarde, o mesmo autor acabou por transferir para outro género, nomeadamente *Harpophora*, uma vez que este fungo era bastante semelhante aos anamorfos dos géneros *Gaeumannomyces* e de *Magnapothie* em termos de morfologia das células conidiogénicas e rapidez de crescimento das colónias (Samra et al., 1963).

As hifas apresentam uma largura de 2 a 4,5 µm, são hialinas, septadas, com ramificações e decumbentes. Em relação aos conidióforos estes também são hialinos, septados e ramificados e cada um origina quatro a sete conídios unicelulares, hialinos, com forma oval a cilíndrica (Figura 9).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Os conídios apresentam um comprimento de 8,5 a 25 μm e 5 a 7 μm de largura. Os conídios germinam rapidamente, geralmente através de tubos germinativos bipolares, mas, por vezes, podem-se formar um ou três tubos germinativos (Drori et al., 2013).

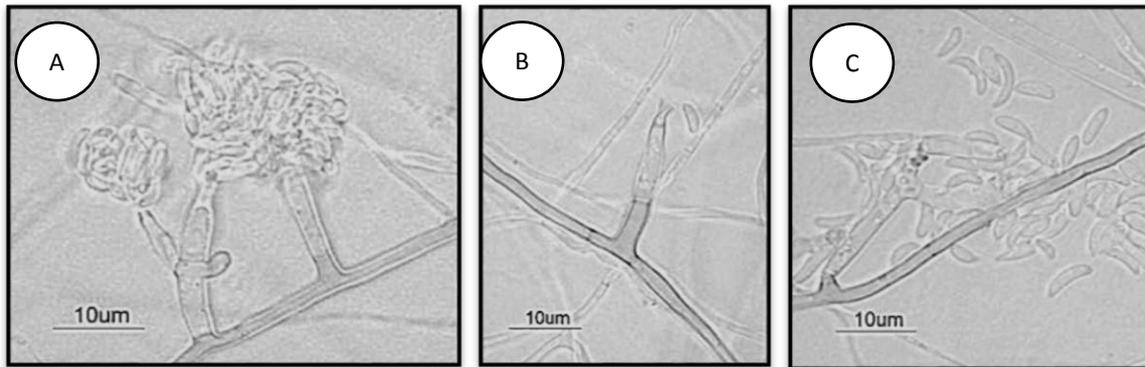


Figura 9 | Caracterização microscópica do fungo *Magnaporthiopsis maydis*; A- conidiosporos com conídios, 1000x em meio de PDA; B- Conidiosporos com fiálides, 1000x em meio de PDA; C- conídios, hifas e conidiosporos, 1000x, em meio de PDA (Sabet et al. 1963).

Em laboratório existem algumas condições ambientais que permitem um crescimento mais uniforme e equilibrado da doença, em meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*) sólido, as colónias atingem um diâmetro de 90 mm em apenas 8 dias a 28 $^{\circ}$ C, sob condições de luminosidade contínua com luz branca fluorescente. As colónias crescem mais rápido no escuro. Em cultura de PDA as colónias passam de uma cor esbranquiçada para um cinza escuro, tornando-se rapidamente para preto (Figura 10) (Samra et al., 1963). Normalmente este fungo sobrevive durante 10 meses sob a forma de micélio em condições de laboratório.

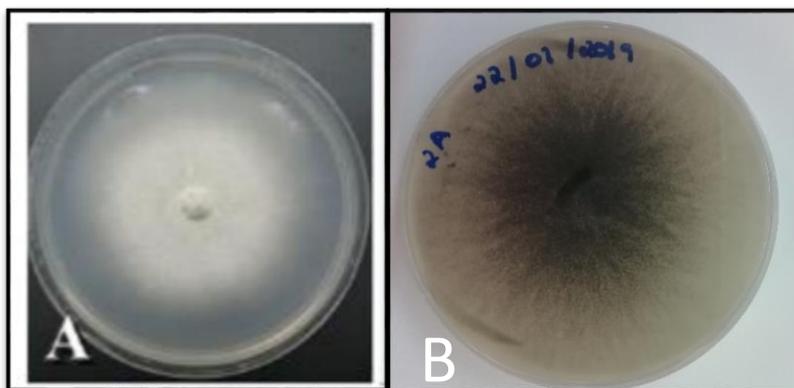


Figura 10 | *Magnaporthiopsis maydis* em meio de cultura A- com 6 dias (Drori et al., 2013); B – com 12 dias.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

O *Magnaportheopsis maydis* é um agente patogénico que se encontra no solo (Michail et al., 1999), este reproduz-se assexuadamente mediante conídios (Saleh and Leslie, 2004). O seu crescimento pode ser inibido na presença de outros organismos existentes no solo (Sabet et al., 1970a), devido à sua baixa capacidade competitiva. A infeção por este fungo resulta num número reduzido de feixes vasculares nas plantas e na oclusão de vasos do xilema pelo crescimento do seu micélio. O aumento da resistência total ao fluxo de água no sistema vascular da planta é o principal efeito do lúmen reduzido do sistema vascular (Samra et al., 1963; Abd El-Rahim et al., 1998; OrtizBustos et al., 2016; Patanita, 2018; Campos et al. (2019)).

2.2.2.1 Condições favoráveis e ciclo de vida

O crescimento superficial inicial do fungo nas raízes provoca o impedimento do crescimento das células, ficando com uma cor castanha, tornando as paredes cada vez mais espessas. Na Índia, relatou-se que a doença alcançou o seu potencial máximo a uma temperatura de 24° C, ou quando a temperatura variou naturalmente entre 20° e 32° C, sendo que aos 36° C o inóculo da doença diminuiu (Samra et al., 1963). Estes parâmetros correspondem a observações anteriores que a temperatura ideal para o fungo crescer em PDA, é de 30° C, tendo também observado que o crescimento é nulo quando as temperaturas rondam os 8° C ou 38° C (Samra et al., 1963). O fungo *M. maydis* não apresenta grande capacidade para permanecer no solo durante muito tempo, mas se o clima for relativamente frio, este consegue sobreviver durante mais tempo nas sementes (Samra et al., 1963). As sementes infetadas podem produzir plantas com sintomas da doença, infetar o solo e resultar num desenvolvimento subsequente da murchidão tardia em sementes saudáveis cultivadas posteriormente nesse solo (Degaci & Cernica, 2014; Patanita, 2018).

Comprovou-se que em solos arenosos a severidade da doença é maior, devido à excessiva humidade existente. Isto significa, que em primaveras mais chuvosas é de esperar maior incidência da doença na cultura (Barros & Calado, 2014).

Esta doença pode ser observada em locais totalmente dispersos, sugerindo que a transmissão da doença é a partir da semente. Outras formas de propagação deste agente patogénico é através de movimento de solo infetado, resíduos de colheita ou inóculo gerado em sementes, sendo a propagação dentro de um campo frequentemente associada a operações mecânicas (Degani et al., 2013).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

2.2.2.2 Sintomas, prejuízos e distribuição geográfica

Este fungo, penetra nas raízes quando estas ainda estão em formação. Normalmente os sintomas aparecem em finais de julho ou agosto, dependendo da data de sementeira.

A seca tardia é caracterizada pela murchidão das plantas de milho, geralmente com o aparecimento dos sintomas 70 dias após a sementeira. Os primeiros sintomas da murchidão tardia, aparecem perto da fase de floração, aproximadamente 50 a 70 dias após a sementeira, perto da floração masculina. O fungo pode afetar negativamente a emergência das plantas e causar necroses nas raízes destas. No entanto, com o desenvolvimento da doença as folhas tornam-se amareladas pela falta de água, existe uma alteração da cor dos feixes vasculares (amarelo-acastanhado) e em seguida uma cor avermelhada nos entrenós inferiores (Sabet et al., 1966). O caule torna-se oco e encolhido, com a medula macerada amarela a acastanhada com feixes vasculares com uma tonalidade preta. A espiga dobra-se para baixo, acabando o ciclo um mês mais cedo do que suposto. A fase do enchimento do grão, torna-se bastante difícil, originando por sua vez uma quebra significativa na produtividade da planta. Normalmente a esta doença estão também associados outros agentes patogénicos, nomeadamente o *F. verticillioides* pelo que a agressividade dos sintomas, é maior.

O principal efeito desta doença é o facto de existir uma resistência total ao fluxo de água no sistema vascular da planta (Abd El-Rahim et al., 1998), acabando mesmo a planta por morrer (Bustos et al., 2015).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose



Figura 11 | Principais sintomas da doença da murchidão tardia. A- Apresenta necroses nas raízes; B- Caule oco e encolhido, com a medula macerada amarela; C- Feixes vasculares amarelo/acastanhados (Huber et al., 2008).

Existem algumas variedades de milho que apresentam alguma tolerância a este agente patogênico, no entanto a sua eficácia está dependente da virulência do fungo, como também o ambiente em que se encontra, pois a agressividade do fungo ou o desenvolvimento deste pode variar (Garcia-Carneros et al., 2012). Foram realizados ensaios onde se verificou que a percentagem de tecidos necróticos acima do solo foram registados 14 semanas após a inoculação. A ocorrência inicial dos sintomas estava dependente do isolado de *M. maydis* e da variedade de milho. No entanto, a gravidade dos sintomas dependia apenas do isolado do fungo. Ao analisar os sintomas e a sua progressão nas plantas de milho, os resultados revelaram que existe uma diversidade na agressividade entre os isolados de *M. maydis* (Garcia-Carneros et al., 2012).

O fungo *Magnaporthiopsis maydis* foi identificado na Península Ibérica em 2008 (Garcia-Carneros et al., 2012). Durante os últimos anos, a incidência e o impacto da doença aumentou drasticamente tanto em Espanha como em Portugal (Garcia-Carneros et al., 2012). No entanto, esta doença já era conhecida no Egito, pois foi responsável por grandes perdas de produção. Nos campos do Egito, cerca de 80% das plantas foram

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

infetadas com o fungo e manifestaram a doença o que proporcionou uma perda de rendimento acima dos 40% (Zeller et al., 2000).

Atualmente, esta doença apresenta bastante relevância e preocupação tanto nos campos de Espanha como em Portugal, podendo originar perdas de produção em variedades sensíveis, na ordem dos 70% do potencial produtivo, consoante o estado de desenvolvimento das plantas onde se manifestam os sintomas (Pioneer Hi-Bred Sementes de Portugal, 2014). No caso de campos infetados, incidências até 60% em variedades suscetíveis podem causar 50% de perdas de rendimento em grão.

O milho é a cultura mais afetada por este fungo, contudo existem outros hospedeiros, como é o caso do tremoço (*Lupinus terminis*), cuja infeção foi relatada no Egito, onde pode causar um significativo *damping-off* (Sahab et al., 1985). No algodão (*Gossypium* spp.), embora surjam lesões localizadas em hipocótilos de plantas jovens, essas lesões desaparecem à medida que as plantas envelhecem, nunca tendo sido possível isolar o fungo a partir delas (Degani & Cernica, 2014; Patanita, 2018).

2.3 Meios de Proteção

O controlo das doenças e pragas na agricultura tem se intensificado, sendo realizado maioritariamente através da aplicação de produtos químicos, com elevados custos e riscos ambientais (desequilíbrio ecológico) e toxicológicos (elevada concentração nos alimentos). O uso de extratos vegetais e óleos essenciais, tem sido fonte de inúmeras pesquisas que validam a sua eficácia (Hernandez et al., 1998; Owolade et al., 2000; Souza et al., 2002; Morais, 2004). Neste caso, os meios de proteção tanto para combater o *Fusarium* spp. como o *M. maydis* são bastante semelhantes, por estes serem ambos fungos do solo. Tendo em conta, todas as características e fatores referidos anteriormente em relação ao *Fusarium* spp. e ao *M. maydis* respetivamente, o método mais eficaz é a utilização de variedades tolerantes (Zeller et al., 2002; García-Carneros et al., 2012; Drori et al., 2013). No entanto o uso destas, não garante a ausência destas doenças em zonas de alto risco, portanto é necessário ter em conta algumas práticas culturais que podem ajudar a reduzir o aparecimento da doença.

Como não existe qualquer tipo de produto químico para controlar estes agentes patogénicos, outra solução é semear mais cedo, milhos de ciclos mais longos e arranjar variedades mais resistentes a estes fungos.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Como as doenças causam uma seca rápida e súbita, é necessário que haja um diagnóstico precoce das plantas, podendo ajudar a restringir a disseminação das doenças.

Práticas culturais como a rotação de culturas, poderão ajudar a quebrar o ciclo da doença, no entanto, neste caso, esta prática cultural não é eficaz, devido ao período que os fungos permanecem no solo (Fernandes & Rasquilha, 2004) e a quantidade de hospedeiros que estes fungos apresentam. Outra prática cultural, de forma a evitar a disseminação, é a limpeza de todas as máquinas e alfaias imediatamente após a sua utilização em campos infetados (Pioneer Hi-Bred Sementes de Portugal, 2014).

Cada vez mais, valoriza-se os meios de luta biológicos, uma vez que existem um conjunto de organismos benéficos que se tem revelado muito promissores no combate à Fusariose como o uso de microrganismos endofíticos, nomeadamente bactérias existentes no solo. Uma bactéria endofítica, *Enterobacter cloacae*, foi isolada e demonstrou infetar naturalmente a planta jovem, de forma a deter o crescimento não só do *F. verticillioides* como também outros agentes patogénicos e não patogénicos (Cavaglieri et al., 2005).

Atualmente, existem formas de controlar o *F. verticillioides* especificamente, com a utilização de fungos micorrizicos arbusculares (AMF). Estudos revelaram que as espécies *Glomus* são capazes de controlar o fungo, sendo uma alternativa a produtos químicos, no entanto apresenta algumas limitações no que toca à concentração existente do patogénico na planta (Olowe et al., 2018).

A utilização de fungos micorrizicos arbusculares não só são capazes de controlar a presença de *F. verticillioides* como também do fungo *M. maydis*. De acordo com (Patanita et al., 2020), a utilização destes fungos micorrizicos arbusculares (AMF- *Arbuscular mycorrhizal fungi*) são capazes de controlar o fungo *M. maydis*. A presença de um ERM (*extraradical mycelium*) bem desenvolvido, é uma estratégia com benefícios para a cultura, tanto para o seu crescimento como para a sua proteção contra o stress biótico e proteção contra o fungo *M. maydis*. Como verificado no estudo, uma das limitações da utilização de AMF na agricultura é o tempo ser curto para que o nível de colonização seja suficiente para garantir a bioproteção da cultura. No entanto, se a simbiose estiver bem estabelecida desde o início do ciclo vegetativo, que é alcançado utilizando um tipo de propágulo que promove uma colonização mais cedo e mais rápida, nomeadamente a utilização do ERM, é possível superar esse desafio.

Hoje em dia é utilizado extrato de alho (*Allium sativum* L.) e capim-santo (*Cymbopogon citratos* Stapf.) de forma a controlar o desenvolvimento do *Fusarium proliferatum* (Sankar

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

and Babu, 2012). Em estudos anteriormente realizados, avaliaram o efeito de extratos vegetais e/ou óleos essenciais de alho e campim-santo, sobre o crescimento do fungo *F. proliferatum* no milho. Os resultados destes estudos revelaram que esses produtos podem inibir ou até suprimir o desenvolvimento deste fungo (Hernandez et al., 1998; Owolade et al., 2000), todas as concentrações avaliadas reduziram o crescimento do *F. proliferatum*, sendo a maior eficiência observada nas concentrações maiores. Foram observados decréscimos percentuais na germinação dos esporos de *F. proliferatum* em função do aumento das concentrações dos extratos e do tempo de imersão dos esporos nessas soluções.

O aparecimento dos híbridos *Bt maize* nos anos 90 foi revolucionador. Este híbrido pelo facto de apresentar genes provenientes de uma bactéria *Bacillus thuringiensis*, tem capacidade de controlar de forma eficaz os sintomas associados à doença da fusariose no milho, como também controlar pragas da ordem dos lepidópteros sem o uso de inseticidas. O exemplo dos híbridos *Bt maize*, podem ser uma ferramenta importante no desenvolvimento e controlo da fusariose. Estes prometem fornecer um controlo mais completo ao ataque de fungos às espigas do milho e aos nemátodes existentes no solo, que por sua vez aumenta o seu efeito contra a entrada de fungos na planta. O controlo destes nemátodes, tem um potencial de reduzir a podridão dos caules, mantendo as raízes saudáveis e reduzindo os danos físicos das raízes (Munkvold and Hellmich, 2000).

Quanto ao *M. maydis*, foram descobertos seis isolados de actinomicetas (*Streptomyces graminofaciens*, *S. gibsonii*, *S. lydicus*, *S. nogalater*, *S. rochei*, *S. annulatus*) e 5 isolados de leveduras (*Candida maltosa*, *C. glabrata*, *C. slooffii*, *Rodotorula rubra*, *Trichosporon cutaneum*) da rizosfera do milho que foram antagonistas do *M. maydis in vitro*, e quando aplicado nas sementes, reduziram significativamente a incidência da doença no milho murchidão tardia do milho semeado (El-Mehalawy et al., 2004). O fungo *Trichurus spiralis Hasselbr*, também foi encontrado como um inibidor do *M. maydis* (Abdel-Hamid et al., 1981). As suspensões da bactéria antagonista *Bacillus subtilis* reduziram a infeção quando adicionadas a vasos com solo infetado, no momento da sementeira ou após a mesma (Chalkley, 2017).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção de isolados de fungos associados à raiz e caule do milho

Foram usadas 15 amostras de plantas de milho provenientes de quatro diferentes zonas de Espanha e onze zonas diferentes em Portugal. A recolha das plantas foi baseada na sua sintomatologia, ou seja, plantas com sintomas que sugeriam a presença dos fungos fitopatogénicos, nomeadamente o *Fusarium* sp. e o *M. maydis* (2.2.1 e 2.2.2).

As amostras foram transportadas para o laboratório, observadas e tanto as raízes como o caule foram sujeitos a uma pré-lavagem com água, de forma a retirar o excesso de terra existente (Figura 12).



Figura 12 | Raízes e caule de plantas de milho, após lavagem e antes de serem previamente desinfetados.

De seguida, realizou-se as devidas desinfecções como descrito por Varanda et al. (2011), com algumas modificações. A preparação de plantas desinfetadas, consistiu na imersão sucessiva em diversas soluções durante um minuto. A desinfecção das plantas iniciou-se com álcool a 96% (v/v), de seguida hipoclorito de sódio a 3% (v/v), e por fim etanol a 70% (v/v). Após este ciclo de desinfecções, o material vegetal foi submergido em água pura de forma a retirar o excesso de desinfetante, sendo que este processo foi repetido duas vezes durante um minuto (Figura 13A). As raízes e os caules foram de seguida secos em papel absorvente, cortados em pequenos pedaços (figura 13 B e Figura 13 C) e colocados em placas de Petri com 90 mm de diâmetro (Figura 13 D). Estas placas de Petri contêm um meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Merck, Germany), de forma a proporcionar o crescimento e desenvolvimento dos fungos presentes tanto nas raízes como nos caules.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Os procedimentos laboratoriais necessários ao isolamento dos fungos foram sempre realizados numa bancada, previamente descontaminada e efetuados junto da área de influência da chama, proveniente de bicos de *Bunsen*, com o objetivo de cumprir as condições de assepsia e diminuição do risco de contaminação por outros microrganismos (Figura 13A).

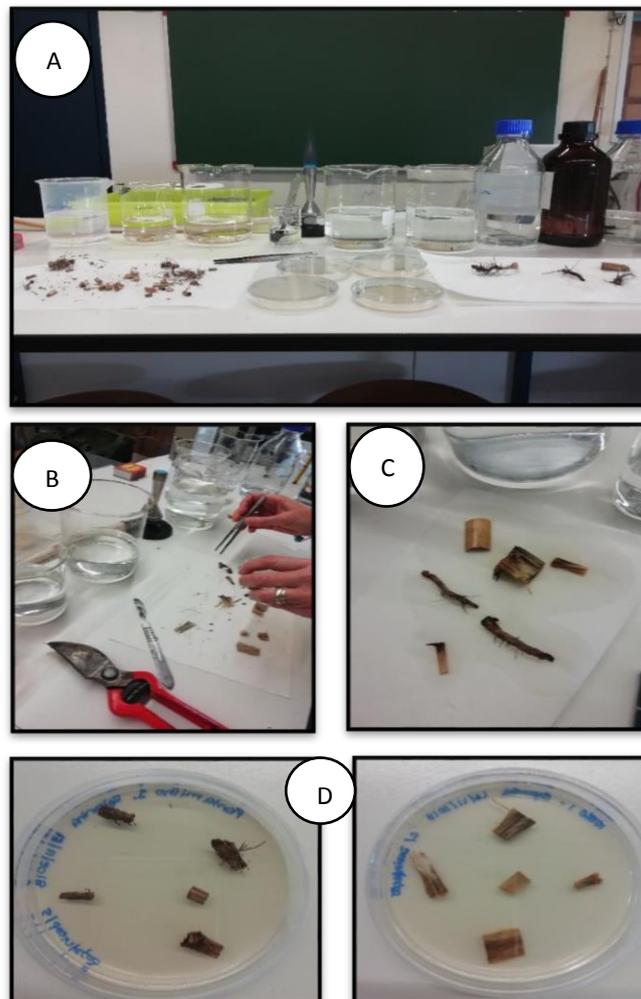


Figura 13 | Processo de desinfecção e limpeza das raízes e caule das plantas de milho e sua colocação em placas de Petri com meio PDA. A- Material utilizado para efetuar as devidas desinfecções; B- cortar em pequenos pedaços o material vegetal para as devidas desinfecções; C- retirar o excesso em papel absorvente; D- colocar as amostras em placas de Petri com meio de cultura.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Para o crescimento dos fungos, foi necessário proporcionar condições ótimas, de forma a que o seu crescimento fosse contínuo. As placas de Petri foram assim, colocadas a uma temperatura entre os 23° C e 28°C durante uma a duas semanas, até ao aparecimento de estruturas de frutificação. Após este período, as colónias com diferentes crescimentos miceliais foram transferidas para novas placas de Petri de 60 mm de diâmetro, contendo meio de cultura PDA. A partir destas placas, foram feitas repicagens sucessivas com objetivo de obter culturas puras.

Primeiramente foi realizada uma seleção através da morfologia dos esporos, diferenciando os que supostamente pertenciam ao género *Fusarium* sp. e ao *M. maydis*. Esta seleção foi feita através do recurso à taxa de crescimento, cor e textura do micélio, a cor do lado reverso e natureza da margem de crescimento. Para isso, foi realizada a observação visual e o microscópio ótico (Olympus BX-50) na ampliação de 1000x.

3.2 Extração de DNA genómico (gDNA)

A partir das placas de Petri (60 mm de diâmetro) que contém os fungos em cultura pura, procedeu-se à extração do DNA total, através do protocolo CTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), descrito por Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações. Este processo, iniciou-se da seguinte forma, primeiro retirou-se com muito cuidado o micélio existente na placa de forma a não perfurar o meio de cultura, colocou-se em almofarizes e foram macerados na presença de azoto líquido até formar um pó que foi seguida transferido para microtubos de 2 mL devidamente esterilizados. A cada microtubo, foram adicionados, 600 µL de tampão de extração CTAB 2% (20 mM EDTA, 0,1 M Tris HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2 % CTAB, 4 % de PVP, 0,1% de β-mercaptoetanol, e 0,5 % de Proteinase K) (Thermo Scientific).

Posteriormente à adição da solução tampão, os microtubos foram colocados na incubadora a 55°C durante 90 minutos. Durante esse período, de 15 em 15 minutos agitava-se por inversão. Após a incubação, adicionou-se a cada tubo 600 µl de clorofórmio- álcool isoamílico (24:1), agitando-se posteriormente entre 5 a 10 minutos, de forma a homogeneizar a solução. De seguida, as amostras foram colocadas na centrífuga (Centrifuga 5415R, Eppendorf), durante 10 minutos a 12000 rpm. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo devidamente identificado, adicionando-se 2,5 volumes de etanol absoluto frio. De seguida, as amostras foram novamente colocadas na centrífuga, durante 20 minutos com uma rotação de 13000 rpm. Descartou-se novamente o sobrenadante com cuidado, ficando apenas o *pellet* no tubo, adicionou-se 500 µl de etanol 70% de forma a lavar, retirando todos resíduos

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

existentes de sais aderentes ao DNA. Os tubos foram centrifugados novamente durante 15 minutos a 13000 rpm e descartou-se o sobrenadante. De seguida, o *pellet* foi colocado na centrífuga *speed vacum* (CentriVap micro IR, Labconco), de forma a que as amostras ficassem secas. Por fim, após o *pellet* estar seco, este foi ressuspensão em 30 µl de água ultra-pura, quantificado através de um espectrofotómetro nano (Quawell Q9000CM) e o DNA foi conservado a uma temperatura de -20°C até à sua posterior utilização.

3.3 Amplificação do PCR convencional

Para a identificação dos fungos, utilizou-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*-Reação em cadeia pela polimerase), esta técnica baseia-se na replicação de DNA. Esta técnica permite a amplificação de um fragmento de DNA específico a partir de uma cadeia de DNA. Através desta técnica são realizadas diversas cópias de uma pequena sequência de DNA. Cada reação de PCR requer a presença de DNA, *primers*, nucleótidos e DNA polimerase. A DNA polimerase é a enzima chave que liga os nucleótidos para formar o produto PCR. Os nucleótidos incluem as quatro bases - adenina, timina, citosina e guanina (A, T, C, G). Estes atuam como “blocos de construção” que são usados pela DNA polimerase para criar o produto de PCR resultante. Os *primers* na reação especificam o produto exato do DNA a ser amplificado. Os *primers* são pequenos fragmentos de DNA com uma sequência complementar definida ao DNA alvo que deve ser detetado e amplificado. Estes servem como um ponto de extensão para a DNA polimerase se desenvolver (Garibyan and Avashia, 2013).

Os componentes acima mencionados são misturados e de seguida colocados num termociclador que permite realizar ciclos repetidos de amplificação de DNA, que ocorrem em 3 etapas básicas consoante a temperatura. Essas etapas básicas consistem: na desnaturação do DNA, hibridação e síntese de DNA através da DNA polimerase. A reação é primeiro aquecida acima do ponto de fusão das duas cadeias complementares de DNA do DNA alvo, o que permite que as cadeias se separem, este processo é chamado desnaturação. De seguida, a temperatura é reduzida para permitir que os *primers* específicos se liguem aos segmentos de DNA alvo, um processo conhecido como hibridação. A hibridação entre os *primers* e o DNA alvo ocorre apenas se forem complementares em sequência. A temperatura é aumentada novamente, momento em que a DNA polimerase é capaz de estender os *primers* adicionando nucleótidos à cadeia de DNA em desenvolvimento (Figura 14).

A cada repetição dessas três etapas, o número de moléculas de DNA copiadas, duplica (Garibyan and Avashia, 2013).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

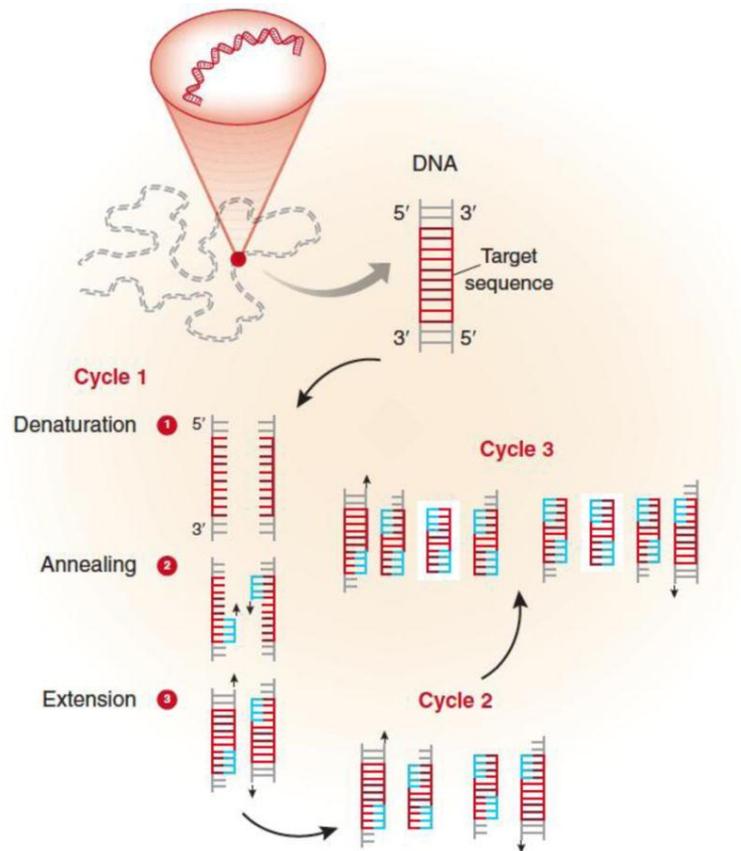


Figura 14|Apresentação esquemática do princípio da técnica PCR (Garibyan and Avashia, 2013).

3.3.1 Primers utilizados

No processo de PCR utilizou-se diferentes tipos de *primers*, para amplificar diferentes regiões do genoma dos fungos. Primeiramente utilizou-se *primers* que amplificavam o gene β - tubulina. Utilizou-se o *primer forward* T1 (5' AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT 3') e o *primer reverse* T22 (5' TCT GGA TGT TGG GGA TCC 3') (Figura 15) (Karlsson et al., 2015). A aplicação destes *primers* em PCR permite obter fragmentos de tamanhos de cerca de 1500 pb. Sendo esta região β -tubulina, uma região específica de forma a identificar a diversidade filogenética do género *Fusarium* (Schroers et al., 2009).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

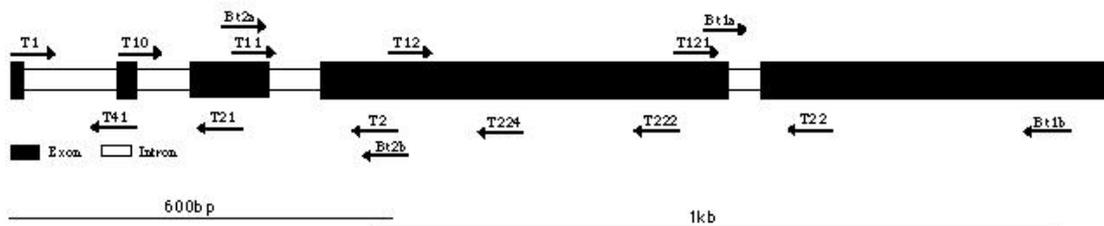


Figura 15| Representação esquemática da localização dos *primers* T1/T22 utilizados para amplificação da região β - tubulina

Foi ainda usado um par de *primers* que permitiu a amplificação parcial do gene *elongation factor*. Esta região foi amplificada utilizando os *primer forward* Fa+7 (5' AAC GTC ATC GGC CAC GTC GAC TCT 3') e *primer reverse* Ra+6 (5' ACA TAC CAA TGA CGG TGA CAT AGT AGC G3') (Karlsson et al., 2016). A aplicação destes *primers* em PCR permite obter fragmentos de tamanhos de cerca de 500 pb.

3.3.2 Condições de PCR

Para as reações de amplificação para todos os pares de *primers* realizaram-se nas seguintes condições:

- 10 mM Tris-HCL (pH 8,6);
- 50 mM KCL;
- 1,5 Mm MgCl₂;
- 0,2 mM dNTPs (Thermo);
- 1mM de cada *primer*;
- 2,5 U de *Dream-Taq* DNA polimerase (Thermo)
- 50-60 ng de DNA de fungo

As reações de amplificação foram realizadas num termociclador *MyCycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad). Os programas de amplificação foram ajustados às condições exigidas pelo tamanho do fragmento e pelos *primers* utilizados (Quadros 1 e 2).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Quadro 1 | Programa de amplificação por PCR em que foram utilizados os *primers elongation factor*.

Etapas	Temperatura(°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	3 min	1
Desnaturação	95	1 min	30
Hibridação	67	1 min	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	10 min	1

Quadro 2 | Programa de amplificação por PCR em que foram utilizados os *primers* β - tubulina.

Etapas	Temperatura(°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	2min	1
Desnaturação	95	40 seg	35
Hibridação	58	55 seg	
Extensão	72	2 min	
Extensão final	72	10 min	1

3.3.3 Electroforese em Gel de Agarose

A etapa seguinte, foi realizada de forma a visualizar os produtos amplificados por PCR, para isso foi realizado a electroforese em gel de agarose a 1 %. Para preparar o gel de agarose foi necessário 1g de agarose, 100 mL de TBE (Tris-Borate-EDTA), de seguida foi aquecido e agitado de maneira a que ficasse homogeneizado. De seguida foi adicionado, 1,5 μ l do corante *GreenSafe* (NZYTech). Cada amostra a aplicar foi preparada usando 10 μ l da amostra, aos quais se adicionou tampão Orange G 1X. Em cada gel foi ainda aplicado num dos poços 6 μ l do marcador *GeneRulerTM 1 kb Plus DNA Ladder*. Fez-se correr o gel a uma voltagem de 80 V durante 1h20 minutos.

3.3.4 Purificação dos produtos de PCR

Feita a análise do gel de agarose, apenas as amostras que continham o produto amplificado esperado foram submetidas à purificação, utilizando o kit para purificação de DNA de reações enzimáticas (NZYTech), de acordo com o protocolo do fabricante.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

3.3.5 Sequenciação de amostras de DNA e a sua análise

O produto de PCR purificado foi enviado para sequenciação para a empresa Macrogen Inc., Madrid. Os resultados da sequenciação foram analisados com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.3.* (Hall, 1999) e a procura de sequências homólogas foi realizada com recurso à base de dados *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Todas as sequências de fungos consideradas apresentaram um grau de semelhança de, pelo menos, 95% relativamente às melhores sucedidas na base de dados do NCBI.

3.4 Inoculação de novas plantas de milho em laboratório com *M. maydis* e *Fusarium* sp.

No ensaio experimental foi utilizado o híbrido P0933 com ciclo FAO-500. Foi o híbrido escolhido por apresentar as seguintes características: porte médio com inserção média baixa da maçaroca, boa consistência de caule, textura do grão vítrea, peso bastante bom no toca à indústria alimentar, grande adaptabilidade a diferentes compassos de entre linha sem quebrar o seu potencial produtivo, para além destas características, excelente tolerância ao vírus do nanismo rugoso (MRDV) e boa tolerância ao *Magnaportheopsis maydis* (Pioneer Hi-Bred Sementes de Portugal, 2015).

Preparou-se um ensaio experimental, de forma a testar a interação entre dois importantes fungos do milho *Fusarium verticillioides* e *M. maydis*. A espécie do *Fusarium* escolhida foi o *F. verticillioides*. Não tendo sido detetado nenhum isolado de *M. maydis* neste trabalho, foi utilizado um isolado cedido pelo Departamento da Proteção de Cultivos, Instituto de Agricultura Sustentável, Córdoba, Espanha (GenBank Accesion ID KP16518) (Ortiz-Bustos et. al 2016).

Os fungos foram inicialmente colocados a crescer em placas de Petri, durante 3 semanas de forma a obter um crescimento uniforme.

Repicou-se 20 placas de Petri com *M. maydis* e incubou-se a 28°C durante 3 semanas, enquanto o *F. verticillioides* repicou-se 24 placas e manteve-se a temperatura ambiente, 23°C-25°C. Após esse período, foi preparada um meio ideal para o crescimento do *M. maydis*, este foi executado da seguinte forma: primeiro, retirou-se o fungo das placas de Petri, para um copo diluído em água pura, de seguida com ajuda de uma câmara de contagem *Neubauer* e de um microscópio ótico (Olympus BX-50,) contou-se a quantidade de esporos existentes, para se obter uma concentração final de 10^{-6} conídios mL⁻¹;

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

segundo, o inóculo consistiu numa mistura, areia e farinha de milho, 9:1, vol: vol, à qual foram adicionadas as suspensões de forma a obter a uma concentração final de 15×10^3 conídios g^{-1} . Cobriu-se com papel de alumínio e manteve-se em repouso durante 3 semanas a 22-24°C. Depois da incubação, estes vasos foram misturados com vermiculite esterilizada (1:1) (autoclavada a 120°C por 30 minutos), o que consistiu no substrato usado nos vasos do ensaio com *M. maydis*.

Para o *Fusarium* sp. procedeu-se da mesma forma, para se obter uma concentração final de 10^{-6} conídios mL^{-1} (Figura 16). O substrato usado nos vasos para o ensaio com *F. verticillioides* consistiu numa mistura de areia e vermiculite, (2:1), ao qual foram adicionadas as suspensões de fungo de forma a obter uma concentração final de 25×10^3 conídios g^{-1} .

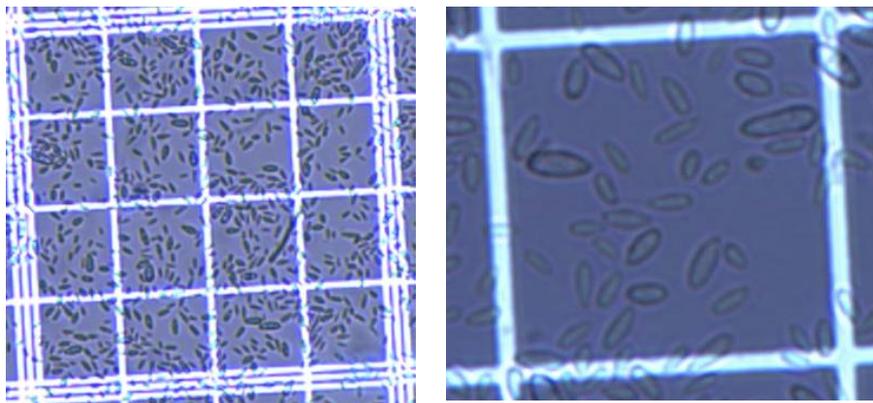


Figura 16 | Contagem de esporos do fungo *Fusarium verticillioides* pelo microscópio ótico (Olympus BX-50,) (ampliação de 1000x).

O ensaio experimental, consistiu em,

- 10 placas de Petri revestidas com algodão humedecido com água pura (controlo negativo) (Figura 18).
- 10 vasos com areia e vermiculite (2:1) sem fungos (controlo negativo);
- 10 vasos com areia e vermiculite (2:1) inoculados com *F. verticillioides*;
- 10 vasos com a mistura de *M. maydis*;
- 10 vasos com a mistura de *M. maydis* e inoculados com *F. verticillioides*;

Em cada um dos vasos/ placas foram colocadas 4 sementes de milho previamente limpas com água da torneira e posteriormente com água destilada (Figura 17 e 18).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose



Figura 17 | Primeiro dia de ensaio experimental, onde foram aplicadas 4 sementes em cada vaso.

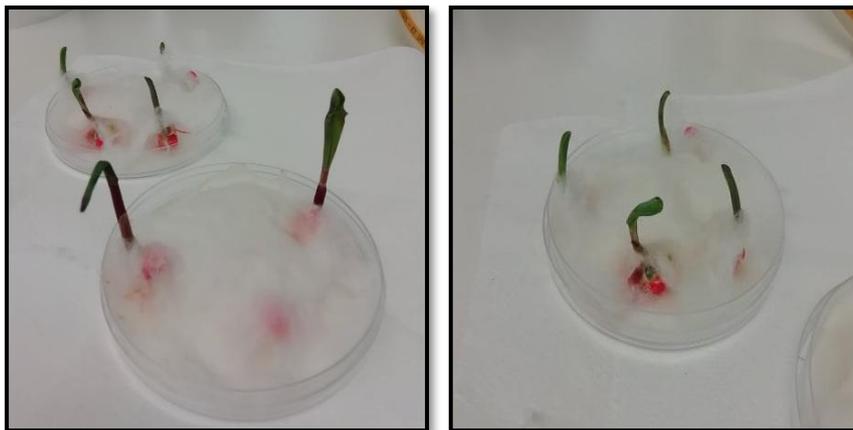


Figura 18 | Sementes germinadas em placas de Petri.

Após um período de 2 semanas, com as plantas com cerca de 30 cm de crescimento (Figura 19), retirou-se 4 plantas de milho do controlo negativo, separando as raízes do colo, e procedeu-se a uma pré-lavagem com água e de seguida realizou-se o método de desinfeção anteriormente referido no ponto 3.1. Após secar as plantas e com ajuda de um almofariz e azoto líquido, tanto as raízes como o colo foram reduzidos a pó. Posteriormente, as amostras foram retiradas do almofariz para o interior de um microtubo devidamente identificado. Este procedimento foi repetido para os vasos com *F. verticillioides*, com *M. maydis* e com ambos os fungos patogénicos. Guardou-se os microtubos devidamente identificados no congelador a -20°C . Este procedimento foi feito ao dia 15 após inoculação e dia 30 (Figura 20). Todas as plantas foram observadas durante o período do ensaio para registo de sintomas.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

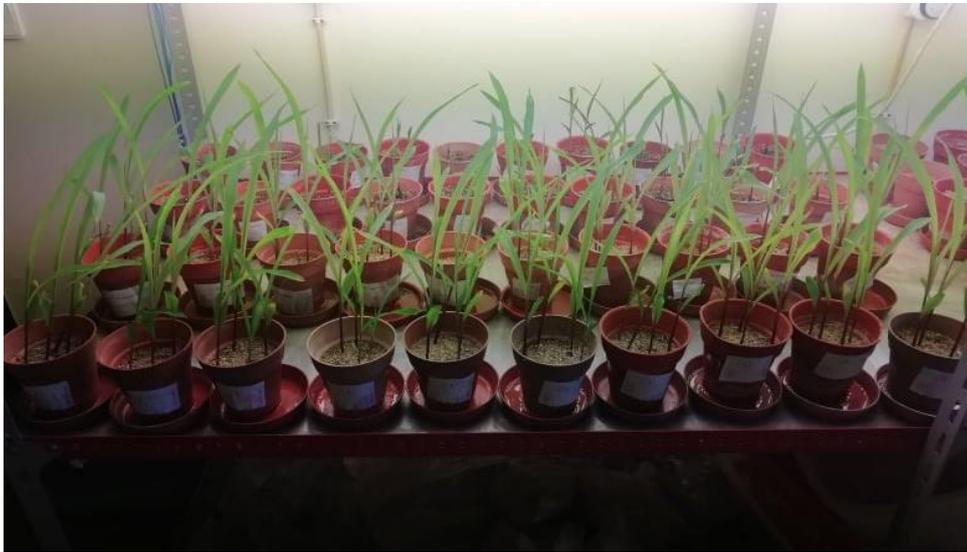


Figura 19|Ensaio experimental após 2 semanas.



Figura 20|Ensaio experimental após 1 mês.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

3.5 Avaliação da virulência dos isolados de *Fusarium verticillioides* e *M. maydis* e as suas quantificações nas plantas inoculadas

A extração do DNA genómico foi efetuada como descrito no ponto 3.2. De seguida, realizou-se a quantificação de DNA de cada amostra, através de um espectrofotómetro nano (Quawell, 9000CM), e diluíram-se de forma a que as amostras apresentassem a mesma concentração, para o processo seguinte Real-Time PCR. Para a realização do Real-Time PCR, organizou-se as amostras de uma forma simples e funcional, para não haver contaminações e enganar. O qPCR foi realizado no fim do período do ensaio, ou seja, ao fim de 30 dias, usando amostras de raiz e do colo de cada uma das amostras. Este processo foi realizado usando um equipamento de PCR em tempo real (*Applied Biosystems, modelo 7500*) usando, para cada amostra, 100 ng de gDNA, 2x NZY qPCR master mix (Nzytech), 400 nM de cada *primer* e 100 Nm de sonda (Nzytech) perfazendo um volume de 20 µl. Foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95°C num período de 10 minutos, de seguida, 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante um minuto.

No Quadro seguinte, estão referidos os *primers forward e reverse* utilizados tanto para o *Fusarium verticillioides* como para o *M. maydis* (Campos et al., 2019).

Quadro 3 | *Primers* e sondas utilizados neste trabalho (Campos et al., 2019).

Espécies	'Accession number'	Primers (5'→3')	Sondas (5'→3')	pb
<i>F. oxysporium</i> e <i>F. verticillioides</i>	MH094661 e MH094662	Fw: AAAACCCTCGTTACTGGTAATCGT Rv: CCGAGGTCAACATTGAGAAGTTG	CGGCCACGCCGTT	69
<i>M. maydis</i>	KP164518	Fw: TGCCTGTCCGAGCGTCAT Rv: GGGTGCCCCAACACCAA	TCACCACTCAAGCCCAG	54

O limite de fluorescência foi definido manualmente acima do *background level*. Para quantificar a presença dos fungos utilizou-se valores de *threshold cycle* (Ct), de forma a medir a quantidade de gDNA dos fungos na reação qPCR (Kesmen et al, 2012). O valor de Ct corresponde à interceção entre a curva de amplificação e o limite de fluorescência ou *threshold line*, quanto maior for este valor, maior o número de ciclos necessários para se detetar a presença do fungo, ou seja, menor a quantidade de fungo presente na amostra.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

3.6 Análise estatística

Na estatística, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), esta foi realizada em relação às diferenças entre os valores de Ct encontrados nas raízes e colos nos dois ensaios, somente *Fusarium*, e *Fusarium* mais *M. maydis*. A análise estatística foi executada com recurso ao *Software IBM SPSS v.20*. O teste *Turkey HSD* foi o utilizado para as comparações múltiplas, e os conjuntos de dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

4. Resultados

4.1 Identificação de isolados de *Fusarium* spp. e *M. maydis* em plantas de milho

Das 15 plantas analisadas, 11 de Portugal e 4 de Espanha, 69 isolados foram identificados morfologicamente como pertencendo a espécies do género *Fusarium* (45 provenientes de Portugal e 24 de Espanha) (Figura 21 e 22). Não tendo sido detetado nenhum isolado pertencente ao *M. maydis*. Estes isolados foram de seguida identificados molecularmente a nível de espécie.

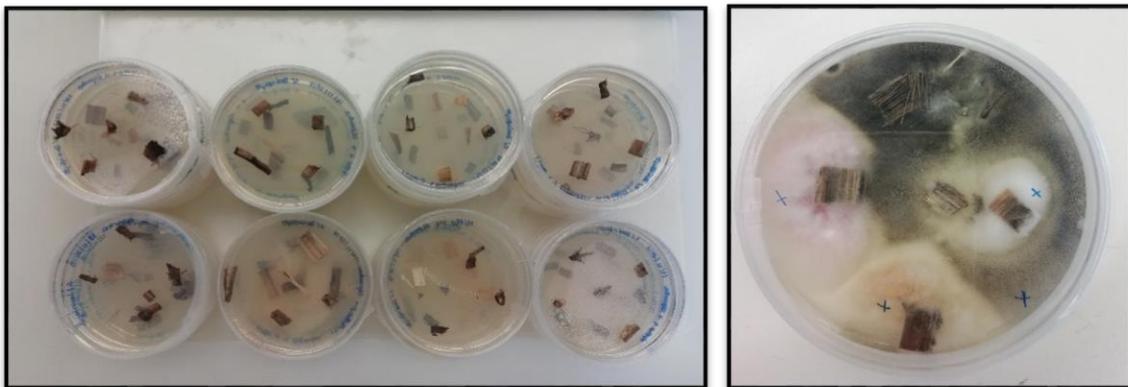


Figura 21 | Placas de Petri; A- placas de Petri, após um dia da colocação das raízes e caule das plantas de milho, sem crescimento de fungos. B- 2 semanas, após a colocação das raízes e caule de milho com crescimento de vários fungos.

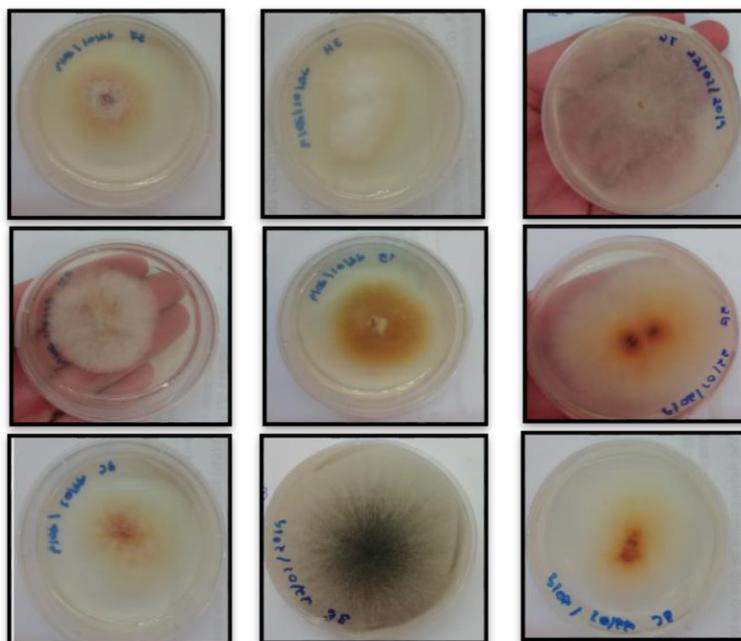


Figura 22 | Seleção de placas de Petri com diferentes tipos de organismos com características semelhantes e os organismos representativos para o estudo.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

De seguida, foi realizada extração de DNA de todos os isolados, estes foram sujeitos a PCR para amplificação da região *elongation factor*, utilizando os *primers* Fa+7 e Ra+6, tendo-se obtido produtos de amplificação com um tamanho aproximadamente de 500 pb em 42 isolados (Figura 23, 25,27, 29,31). Todos os isolados foram também sujeitos a PCR para amplificação da região β - tubulina utilizando *primers* T1 e T22, tendo-se obtido produtos de amplificação com um tamanho de aproximadamente 1500 pb em 28 isolados (Figura 24, 26, 28, 30).

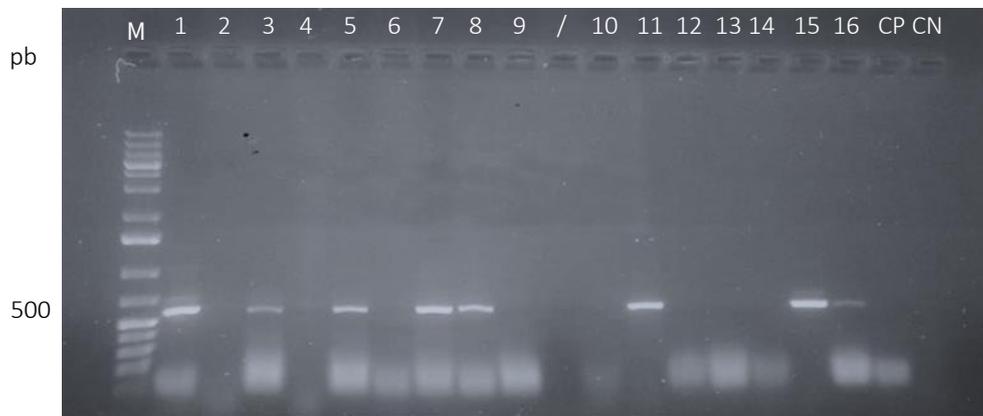


Figura 23 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers elongation factor*. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb Plus; 1-17 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.



Figura 24 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers* β - Tubulina. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1 kb PLUS 1- 17 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo; CP- Controlo Positivo;

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose



Figura 25 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers elongation factor*. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb PLUS 18- 33 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo Negativo.

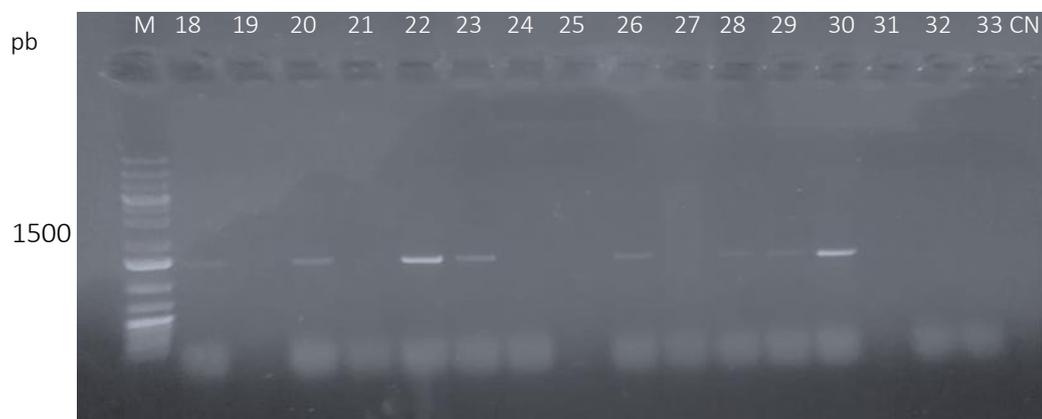


Figura 26 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers* β - Tubulina. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1 kb PLUS 18-33 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

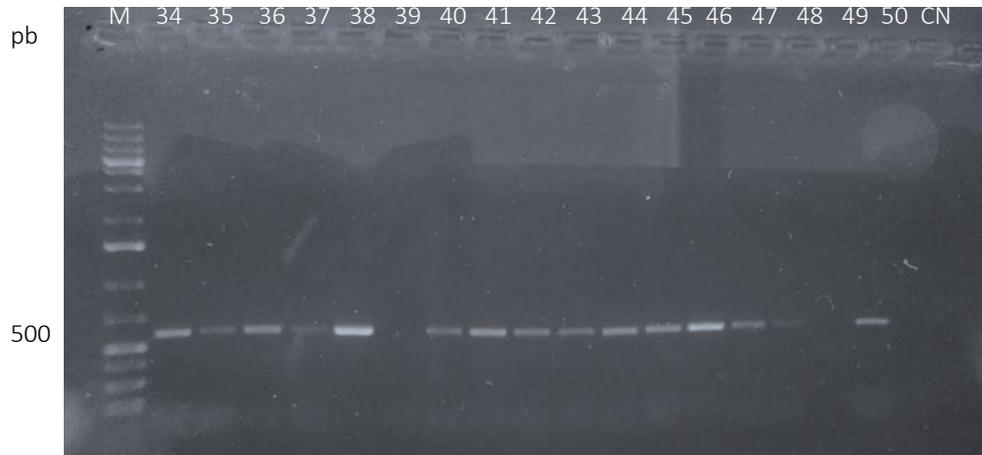


Figura 27 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers* elongation factor. Legenda: M- Marcador GeneRuler™ 1. kb PLUS 34- 50 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.



Figura 28 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers* β - tubulina. Legenda: M- Marcador GeneRuler™ 1 kb PLUS 34-50 amostras testadas (Anexo I); CN- controlo negativo.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose



Figura 29 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers* elongation factor. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb PLUS 51- 61 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.

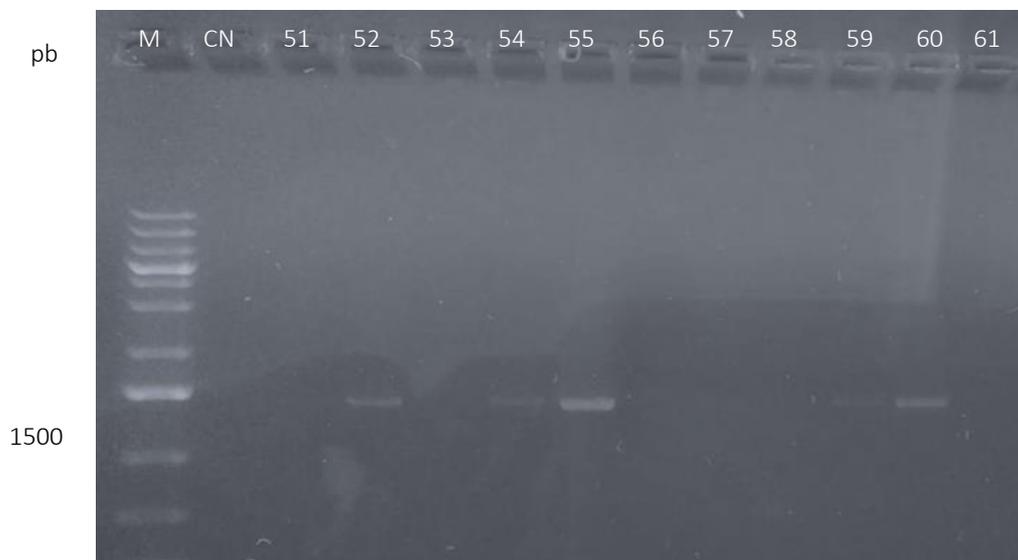


Figura 30 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers* β - tubulina. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1 kb PLUS 51- 61 amostras testadas (Anexo I); CN-controlo negativo.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

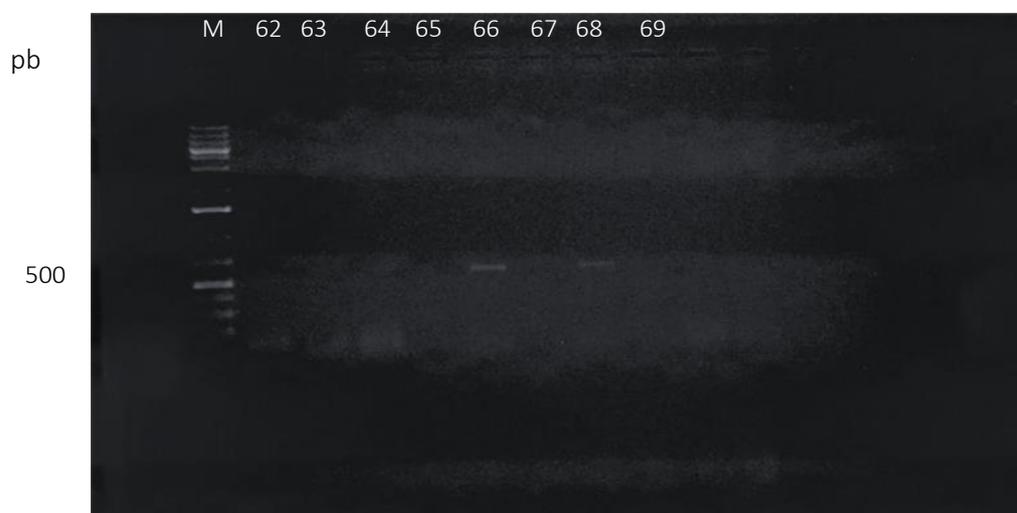


Figura 31 | Análise eletroforética em gel de agarose 1% de alguns dos produtos de DNA amplificados, com utilização dos *primers* elongation factor. Legenda: M- Marcador GeneRulerTM 1. kb PLUS 62-69 amostras testadas (Anexo I); CN- Controlo negativo.

Verificou-se que 42 isolados amplificaram com a utilização dos *primers* Fa+7 e Ra+6, no entanto desses 42 isolados, 15 não amplificaram com a utilização dos *primers* T1 e T22. Por outro lado, 28 isolados mostraram produtos amplificados do tamanho esperado com a utilização dos *primers* T1 e T22 e destes, apenas 1 isolado não mostrou amplificação com a utilização dos *primers* Fa+7 e Ra+6. Num total, foram sequenciados 28 produtos de amplificação de T1 e T22 e 42 produtos de amplificação de Fa+7 e Ra+6, provenientes de 69 isolados obtidos a partir das 15 amostras. Através do quadro do Anexo I, verificamos que nem todas amostras foram possíveis de identificar, (representadas por *) por o gráfico de sequenciação apresentar picos sobrepostos. Através da utilização do BLAST no NCBI, procurou-se as sequências homólogas, realizando uma análise das regiões *elongation factor* e β - tubulina.

Apesar de ter sido obtido produto de amplificação com o uso dos *primers* Fa+7 e Ra+6 em 42 isolados, apenas foram sequenciados com sucesso, 31 desses isolados. O mesmo aconteceu com o uso dos *primers* T1 e T22, que permitiu obtenção do fragmento esperado em 28 isolados, mas destes, a sequenciação apenas permitiu a identificação de 25 isolados.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

O quadro do Anexo I apresenta as espécies obtidas para cada uma das amostras, usando cada um dos *primers* usados neste trabalho.

Através do Quadro em Anexo I, conseguiu-se verificar que a espécie *Fusarium* que apresentou uma maior incidência foi *Fusarium verticillioides*, (sinónimo de *Fusarium moniliforme* Sheldon; teleomorfo, *Gibberella moniliformis* [sinónimo, *Gibberella fujikuroi* mating population A]). Percebemos que cerca de 30% do total de isolados identificados são a espécie *F. verticillioides*.

Quadro 4| Espécies do género *Fusarium* spp. isoladas provenientes tanto das amostras de Espanha como de Portugal.

Nome do fungo	Espanha- nº de isolados	Portugal- nº de isolados	total
<i>F. Subglutinans</i>	0	12	12
<i>F. mangiferae</i>	0	1	1
<i>F. equiseti</i>	1	4	5
<i>F. proliferatum</i>	3	1	4
<i>F. verticillioides</i>	4	2	6
<i>F. oxysporium</i>	0	6	6
<i>F. brachygibbosum</i>	1	0	1

4.2 Ensaio de quantificação de *F. verticillioides* e *M. maydis* em planta

O ensaio de quantificação de *F. verticillioides* e *M. maydis* em planta, permitiu verificar que não existiu qualquer tipo de sintoma, nomeadamente necroses, na parte aérea da planta, em nenhum dos vasos do ensaio, nem ao fim de 15 dias nem ao fim de um mês.

Em relação à parte radicular, ao fim de 15 dias não se verificou qualquer sintoma, no entanto ao fim de 30 dias, os vasos do ensaio com *M. maydis* e do ensaio *Fusarium* com *Magnaportheopsis* apresentaram sintomas de necroses (Figura 32).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose



Figura 32 | Observação de necroses nas raízes das plantas emergidas do ensaio experimental ao fim de mês de ensaio, apenas dos vasos que continham a mistura dos dois agentes patogênicos e os vasos que continham apenas *M. maydis*.

O gráfico com amplificação e a curva padrão geradas após qPCR às amostras de raiz e colo testadas para *F. verticillioides*, no ensaio com plantas apenas inoculadas com *F. verticillioides* (Figura 33) permitiu observar que os valores de Ct das amostras da raiz variaram entre 28 e 39 (a vermelho), enquanto os valores Ct das amostras do colo variaram entre 35 e 39 (a verde) (Anexo II). Os valores de 34 foram tomados como indicativos de quantidade de DNA reduzidas, sendo os valores de Ct igual ou superior a 35, definindo não deteção (Campos et. al,2018). O valor de *Threshold* considerado foi 0,02.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

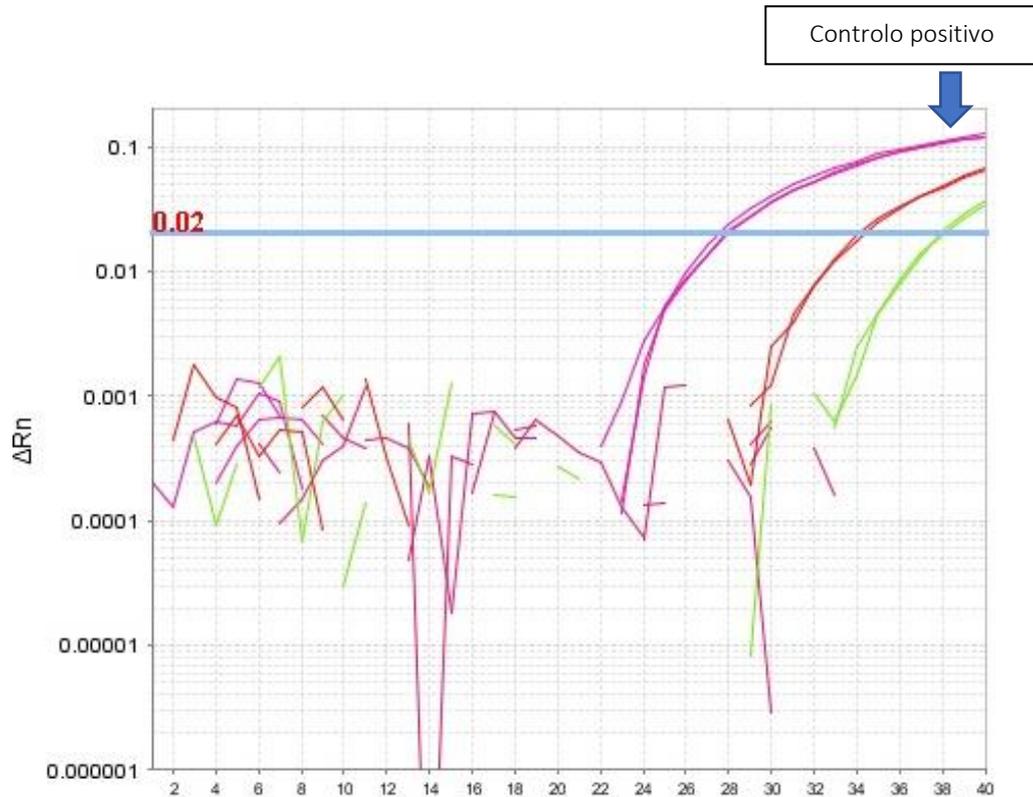


Figura 33 | Gráfico de Amplificação do *F. verticillioides* na raiz e no colmo do ensaio apenas com *F. verticillioides*. A vermelho está representado a curva de amplificação da raiz e a verde a curva de amplificação do colmo.

O gráfico de amplificação e a curva padrão geradas após qPCR às amostras de raiz e colmo testadas para *M. maydis*, no ensaio com plantas apenas inoculadas com *M. maydis* (Figura 34) permitiu observar que não houve detecção deste fungo. O valor de *Threshold* considerado foi 0,03.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

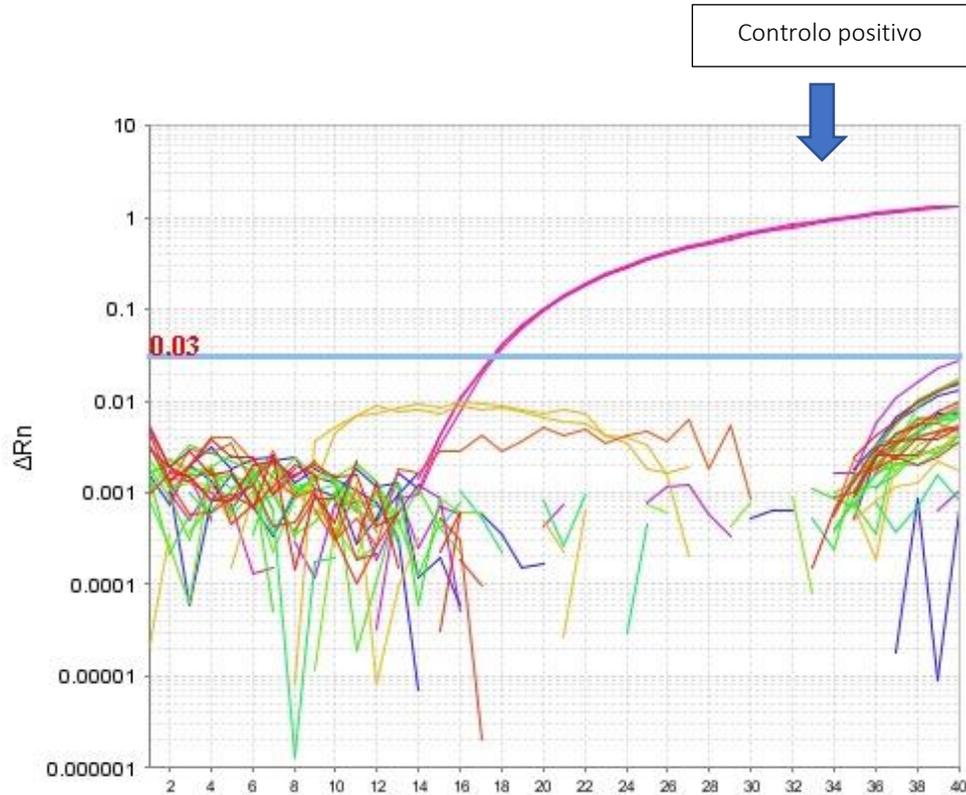


Figura 34 | Gráfico de Amplificação do *M. maydis* na raiz e no colmo do ensaio apenas com plantas inoculadas com *M. maydis*.

O gráfico de amplificação e a curva padrão geradas após qPCR às amostras de raiz e colo testadas para *F. verticillioides* (Figura 35), no ensaio com plantas inoculadas com os dois agentes patogénicos, permitiu observar que os valores de Ct da raiz variaram entre 25 e 36, enquanto os valores Ct no colmo variaram entre 26 e 36 (Anexo III). Como já foi referido anteriormente o valor de *Threshold* considerado foi 0,02.

O gráfico de amplificação e a curva padrão geradas após qPCR às amostras de raiz e colo testadas para *M. maydis* (Figura 36), no ensaio com plantas inoculadas com os dois agentes patogénicos, permitiu observar que não houve amplificação. O valor de *Threshold* considerado foi 0,03.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

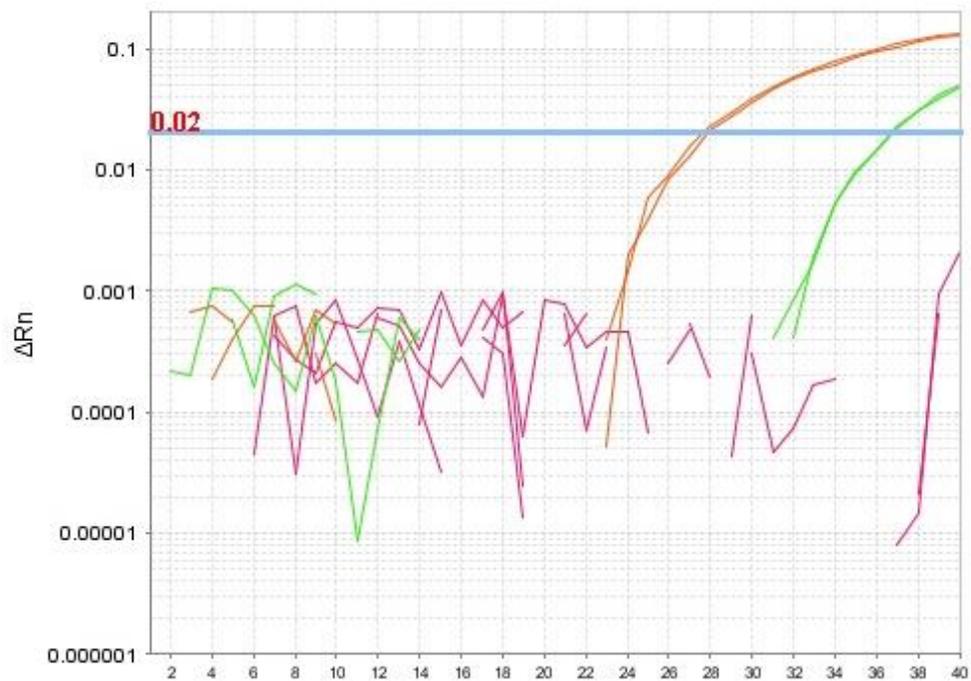


Figura 35 | Gráfico de amplificação do *F. verticillioides* na raiz e no colmo do ensaio com os dois agentes patogênicos (*F. verticillioides* e *M. maydis*).

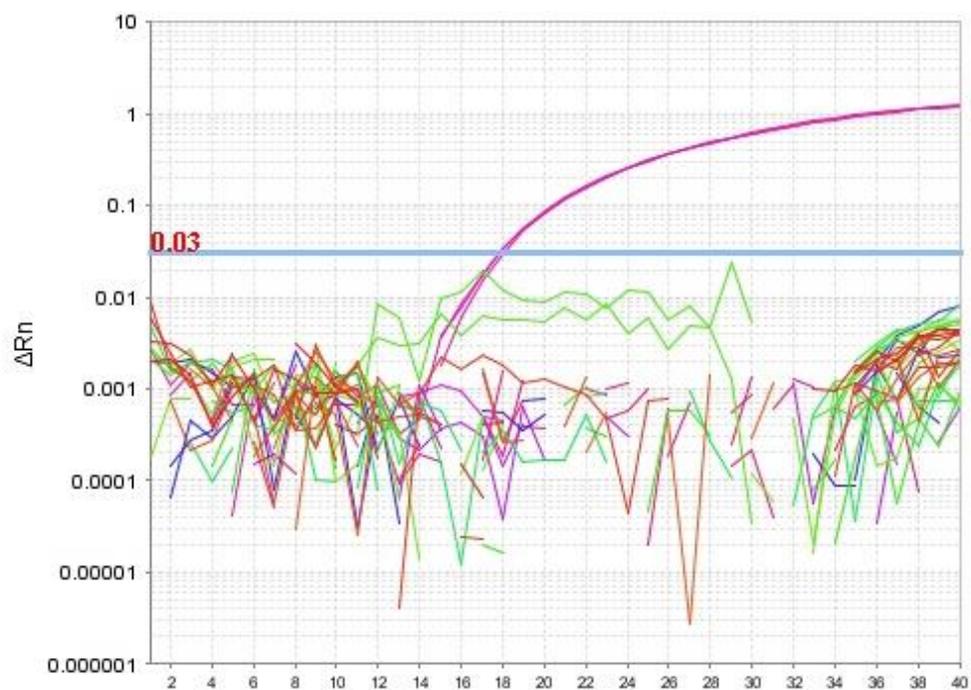


Figura 36 | Gráfico de amplificação do *M. maydis* na raiz e no colmo do ensaio com os dois agentes patogênicos (*F. verticillioides* e *M. maydis*).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

A análise dos Ct obtidos (Anexo II) nas amostras do ensaio em que se usou apenas *F. verticillioides* (Figura 37), permite observar que ao fim de 15 dias (tempo 1), existe de *F. verticillioides* na raiz (Ct<35), mas não no colo (Ct>35), acontecendo exatamente o mesmo ao fim de um mês (tempo 2). O mesmo não acontece no ensaio em que se usaram ambos os agentes patogénicos, em que, no tempo 1 foi detetado *F. verticillioides* na raiz e no colo (Ct<35), no entanto no tempo 2, só foi detetado o fungo na raiz e não no colo (Ct>35) (Figura 38) (Anexo III).

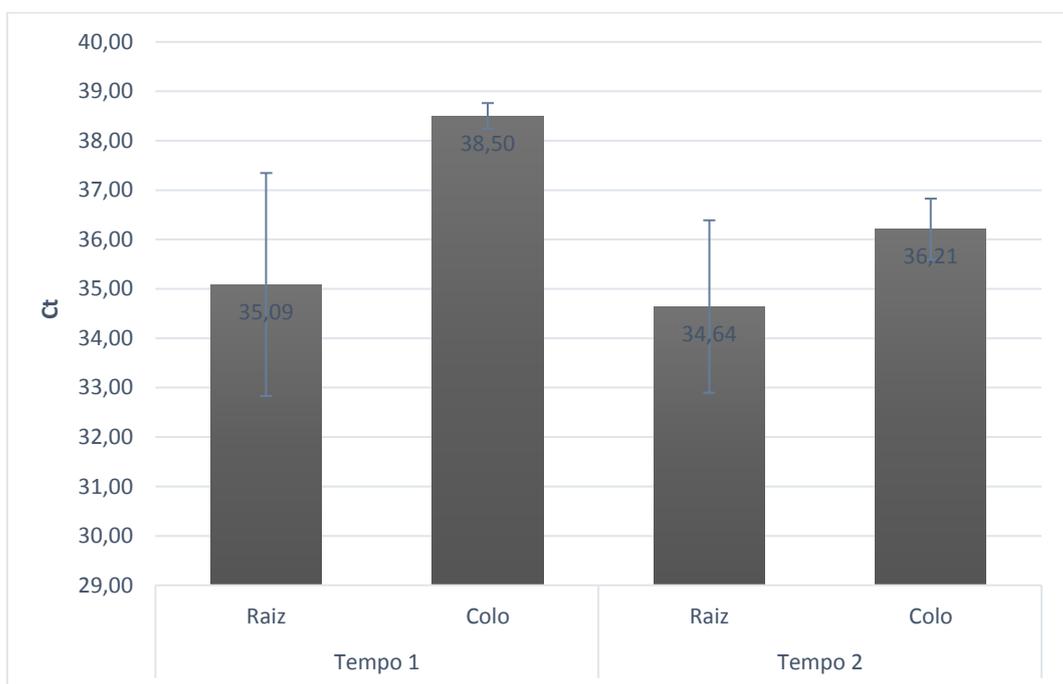


Figura 37 | Comparação do crescimento do *F. verticillioides* na raiz e no colo ao fim de 15 dias (tempo 1) e ao fim de um mês (tempo 2) nas plantas apenas infetadas com *F. verticillioides*.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

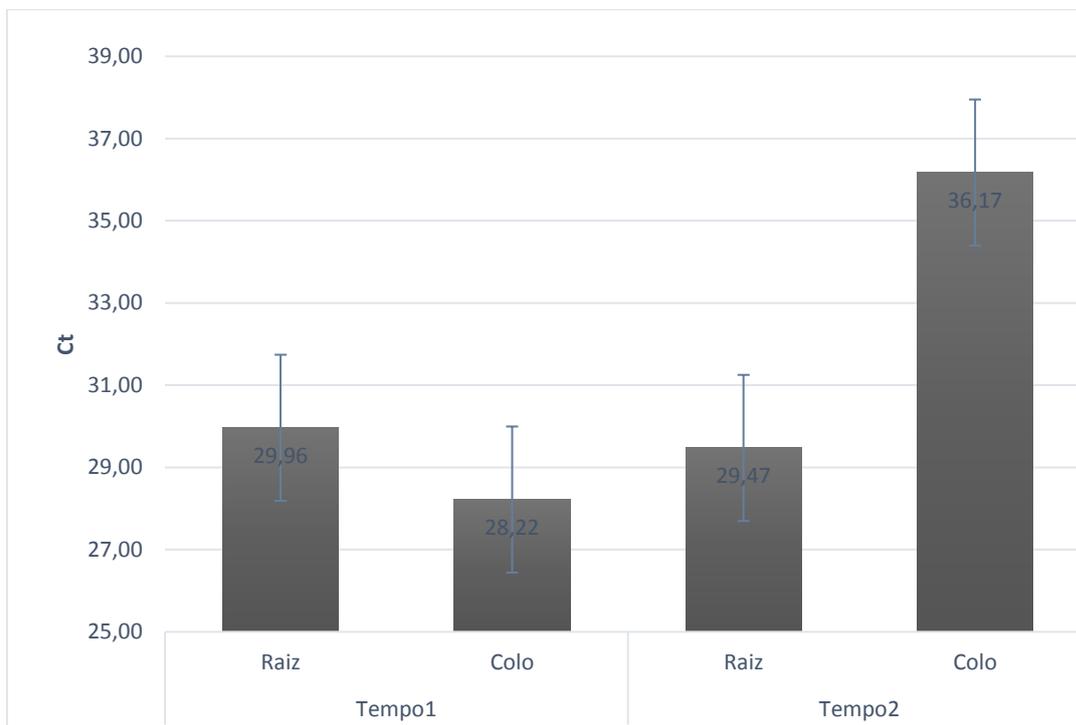


Figura 38 | Comparação da quantidade de *F. verticillioides* na raiz e no colo ao fim de 15 dias (tempo 1) e ao fim de um mês (tempo2) na mistura com os dois agentes patogênicos.

No ensaio somente com *Fusarium*, a média dos valores de Ct nas raízes foi 35.09 ± 2.26 no tempo 1 e a média dos valores de Ct nas raízes foi 34.64 ± 1.75 no tempo 2. Estes valores não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$). A média dos valores de Ct no colo foi de 38.50 ± 0.26 no tempo 1 e a média dos valores de Ct no colo foi de 36.21 ± 0.62 no tempo 2. Estes valores apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$).

No ensaio somente com os fungos *Fusarium* e *M. maydis*, a média dos valores de Ct nas raízes foi 29.96 ± 0.43 no tempo 1 e a média dos valores de Ct nas raízes foi 29.47 ± 1.80 no tempo 2. Estes valores não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$). A média dos valores de Ct no colo foi de 28.21 ± 2.43 no tempo 1 e a média dos valores de Ct no colo foi de 36.17 ± 2.52 no tempo 2. Estes valores apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$).

Quando foram comparados os 2 ensaios (somente *Fusarium* versus *Fusarium* e *M. maydis*) verificou-se que existiram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os valores de Ct nas raízes e colos em cada tempo, com exceção do colo no tempo 2 entre os dois ensaios, o qual não apresentou diferenças significativas ($p > 0.05$) entre os dois ensaios.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

5. Discussão

Ao analisar as diferentes placas de Petri, contendo os fungos isolados a partir das plantas usadas neste estudo, foi possível diferenciar diferentes tipos de fungos. A identificação de isolados do género *Fusarium* foi possível através da cor e da textura em placa, assim como através da morfologia dos esporos. No entanto, a identificação do género *Fusarium* a nível da espécie, utilizando técnicas clássicas, como métodos morfológicos, é difícil (Freeman et al., 1999). Foi necessário realizar a identificação molecular, pois o género *Fusarium* apresenta um vasto leque de espécies, sendo bastante difícil diferenciá-las. De acordo com (Hsuan, 2011), a taxonomia do género *Fusarium* é um dos mais complexos, principalmente porque são usadas várias classificações, incluindo categorias do subgénero e subespécie, como também devido aos seus estágios sexuais, teleomorfo como anamorfo.

Na identificação molecular, utilizou-se dois diferentes pares de *primers*, nomeadamente Fa+7/Ra+6 da região *elongation factor* e T1/T22 da região β - tubulina. A escolha destes *primers*, foi devido à sua especificidade na identificação de espécies do *Fusarium*. A complementação com os *primers* Fa+7 e Ra+6 da região *elongation factor*, permitiu identificar espécies que não eram possíveis de identificar apenas com os *primers* da β -tubulina. Através do Quadro do Anexo I, verificámos que foi bastante útil a utilização destes dois pares de *primers*, de forma a identificar diferentes espécies de *Fusarium*. Estudos anteriores, (Karlsson et al., 2016), mostraram que os *primers* Fa+7/Ra+6 melhoraram a representação de 393 espécies do género *Fusarium* filogeneticamente diversas através do processo PCR e sequenciação por sua vez. Verificou-se também a especificidade destes *primers* e que a contaminação com outras sequências que não eram *Fusarium* é baixa. Em relação aos *primers* utilizados da região β - tubulina, estes tem sido amplamente utilizados em análises filogenéticas de fungos porque contém regiões variáveis e altamente conservadas, o que resultou numa maior estabilidade e confiabilidade na diferenciação de espécies de *Fusarium* em comparação com o gene ITS (Freeman et al., 1999).

Nos resultados obtidos verificou-se a existência de mais amostras amplificadas com a utilização dos *primers* da região *elongation-factor* do que os *primers* da região β -tubulina, sugerindo maior especificidade dos primeiros na identificação de espécies do género *Fusarium*. No total, 42 isolados amplificaram com a utilização dos *primers* Fa+7/Ra+6 e apenas 28 amplificaram com os *primers* T1/T22. Diversas hipóteses surgiram, para justificar a razão pelo facto de ter obtido melhores resultados com os *primers* da região *elongation factor* que os da β -tubulina, pode ter sido, pela falta de otimização do PCR, ou

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

da variabilidade existente nas sequências de *Fusarium* que dificultou a hibridação dos primers.

Por fim com a identificação molecular de todas as amostras, verificámos que a espécie que se apresentava maior incidência nas amostras de Portugal era o *Fusarium subglutinans* enquanto nas amostras de Espanha o *Fusarium verticillioides*, este último corroborando o estudo realizado em Espanha por Pessoa et al. (2015). São ambas espécies que pertencem ao complexo *Gibberella fujikuroi*. As espécies pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi*, são considerados os fungos mais importantes no milho, pois produzem toxinas (ARIÑO et al., 2007), sendo tanto uma preocupação em Espanha como em Portugal. São responsáveis pela podridão do milho, como também pela produção de micotoxinas (Reid et al., 2002). Enquanto o *F. verticillioides* produz fumonisinas o *F. subglutinans* produz a toxina moniliformina (Reid et al., 2002). Num ensaio experimental, onde inocularam ambos os fungos em plantas de milho, observou-se que as plantas inoculadas com *F. subglutinans* recuperaram, não se verificando o mesmo com as plantas inoculadas apenas com *F. verticillioides* (Nelson, 1992).

A qualidade da colheita é muitas vezes reduzida pela doença fusariose, relativas à perda de qualidade do grão, causada por um complexo de espécies de *Fusarium* (De Boevre et al., 2014). Não só por esta razão como pelas razões anteriormente referidas, a espécie de *Fusarium* escolhida para o ensaio experimental foi o *F. verticillioides*.

Com o presente estudo identificámos diferentes espécies de *Fusarium*, nomeadamente, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium equiseti*. Verificámos que em Portugal existiu uma maior variabilidade de espécies nas amostras, enquanto que em Espanha apenas se verificou a existência de *F. equiseti*, *F. proliferatum* e *F. verticillioides*. A diferença da prevalência das espécies em Portugal e Espanha pode estar relacionada com as condições edafo-climáticas de cada uma das regiões. O ambiente apresenta um grande impacto na incidência de diferentes espécies de *Fusarium* (Vigier et al., 1997). Por exemplo o *F. graminearium* é associado a climas mais chuvosos enquanto que o *F. verticillioides* está associado a climas mais secos (Sutton 1982, Miller et al. 1995). Diversos estudos confirmam que as diferenças de temperatura e humidade são fatores importantes para a diversidade de espécies de *Fusarium* (MARÍN et al., 2012).

Não só condições do clima, como também, as práticas culturais, nomeadamente, fertilidade do solo, utilização de herbicidas e inseticidas, rega, densidade de plantas e a suscetibilidade dos híbridos são os principais fatores para maior incidência do fungo na planta, bem como, a sua diversidade filogenética (MARÍN et al., 2012).

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Na Alemanha, realizou-se um ensaio para identificar e perceber a predominância de que espécies de *Fusarium* existia nos campos de milho (Goertz et al., 2010). Foram isoladas e identificadas 13 espécies de *Fusarium* como agentes patogênicos da doença fusariose no milho em 2006 e 2007. Em 2006, a espécie predominante foi o *F. verticillioides*, onde 80% das amostras estavam infetadas com esta espécie. O *F. graminearum*, o *F. proliferatum* e o *F. equiseti* foram associados à fusariose com frequências acima dos 50%. O *F. subglutinans* foi isolado em apenas 11% das amostras de milho em 2006. Em 2007, o *F. graminearum* foi o que apresentou maior presença nas amostras de milho. A incidência do *F. verticillioides*, do *F. proliferatum* como do *F. equiseti*, foi abaixo dos 10%, enquanto o *F. subglutinans* 40% das amostras. Observaram que existiu uma grande variabilidade de ano para ano, na incidência do *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. equiseti* como também do *F. subglutinans* e *F. graminearum*, o que é bem explicado das diferenças significativas da temperatura e precipitação durante o período de crescimento. O período de crescimento do ano 2006 foi caracterizado por baixa precipitação e altas temperaturas, enquanto no ano 2007, baixas temperaturas e precipitação bastante abundante durante o desenvolvimento da planta. Concluíram então que as diferenças de temperaturas e precipitação afetam a incidência das espécies de *Fusarium* na cultura do milho.

Já em Espanha, não se verificaram que as diferenças ambientais que existiam de ano para ano afetassem a presença do *F. verticillioides*, que foi sempre a espécie prevalente no milho, em todos os locais analisados, sendo seguida por *F. subglutinans* (Aguín et al., 2014).

Este trabalho mostrou a presença de *F. verticillioides* em 50% das amostras testadas, confirmando a prevalência de *F. verticillioides* em Espanha, no entanto não foram identificados isolados de *F. subglutinans*. Em Portugal, a predominância foi de *F. subglutinans*, tendo sido detetado em mais de 45% das amostras, tendo *F. verticillioides* sido detetado em 12% das amostras.

Outras espécies foram identificadas com menos predominância, no entanto com alguma preocupação por pertencerem ao complexo que provoca maiores quebras de produção e de rendimento.

O clima parece ser um fator muito importante, de forma a influenciar a incidência de diferentes espécies de *Fusarium* no milho. No caso, do presente estudo, tanto Espanha como Portugal são caracterizados por apresentarem um clima mediterrânico.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Para melhor compreender a diversidade das espécies de *Fusarium* em Portugal e em Espanha, este estudo deverá ser repetido noutros anos para verificar as diferenças em termos de variedade de isolados, como observado ser essencial em estudos anteriores (Goertz et al., 2010).

Na realização do ensaio experimental, verificou-se que em todos os casos as plantas não apresentaram qualquer tipo de sintomas na parte aérea da planta, tanto ao fim de 15 dias como ao fim de um mês. No entanto, observou-se que as plantas que cresciam no mesmo meio onde estava inoculado o agente patogénico *M. maydis*, apresentavam maior dificuldade em emergir. Após os 15 dias, ao retirar as plantas dos vasos não se verificou qualquer tipo de sintoma na raiz da planta. No entanto, ao fim de um mês verificou-se que as raízes na presença de *M. maydis* apresentavam necroses.

O aparecimento de necroses nas raízes pode ser devido ao substrato de crescimento do *M. maydis*, este substrato não se revelou ideal para o crescimento das plantas em emergir, e atrasos no crescimento. É pouco provável as necroses serem causadas pela presença de *M. maydis*, uma vez que não foi detetado.

Apesar de alguns estudos anteriores mostrarem retardamento no crescimento de plantas inoculadas com *Fusarium* (Oren et al., 2003), neste trabalho isso não foi observado, tal como também verificado em outros estudos, em Espanha (Jurado et al., 2006), que mostrou a presença do *F. verticillioides* e do *F. proliferatum* em plantas de milho que não mostraram sintomas visíveis de fusariose.

Também (Munkvold et al., 1997), confirmaram que o *F. verticillioides* consegue infetar as plantas de milho sistémicamente sem causar qualquer tipo de sintoma, e que a infeção pode progredir até à fase final da produção de grãos.

O ensaio realizado por (Lee et al., 2009), considerou o *F. verticillioides*, como um fungo endofítico, podendo comportar-se como patogénico apenas em algumas situações, podendo ocorrer sintomas ou não da doença na planta.

De qualquer forma, seria importante um período de ensaio mais longo para confirmar a existência ou não de sintomas de ambas doenças.

A realização do qPCR, permitiu verificar que houve entrada do fungo *Fusarium* na planta, quer no ensaio só com *Fusarium*, quer no ensaio com *Fusarium* mais *M. maydis*. No caso do ensaio com *Fusarium*, o fungo foi detetado apenas na raiz, no entanto, no ensaio

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Fusarium com *M. maydis*, o *Fusarium* foi detetado na raiz e no colo das plantas. Para o caso dos vasos com apenas *M. maydis*, e nos vasos com ambos os fungos não existiu deteção do *M. maydis* nem na raiz nem no colo.

Além de percebermos se houve entrada dos fungos na planta ou não, conseguimos observar a diferença que existe na quantificação do *Fusarium* na raiz e no colo. Nas plantas apenas inoculadas com *Fusarium*, este fungo foi apenas detetado na raiz, quer ao dia 15, quer ao dia 30, sendo neste último a média dos Cts mais baixa (34,64) que no dia 15 (35,09), o que significa que o fungo foi encontrado em maior quantidade no dia 30, tendo continuado a sua progressão na planta. Não foi detetado *Fusarium* no colo durante os 30 dias de ensaio, no entanto, o prolongamento do ensaio seria importante para verificar esta possibilidade.

Nas plantas inoculadas com ambos os fungos, o *Fusarium* foi detetado no dia 15 na raiz e no colo, com uma média de Cts de 29,96 e 28,22, respetivamente, e no dia 30 apenas na raiz com uma média de Cts de 29,47. Estes valores mostram que o *Fusarium* está presente em maior quantidade no ensaio *Fusarium* mais *M. maydis*, para além disso, foi detetado no colo, ao fim de 15 dias, embora não o tenha sido ao fim de 30 dias. A maior quantidade de *Fusarium* nas raízes pareceu ajudar na progressão do fungo para o colo da planta. O facto de não ter sido detetado *Fusarium* no colo das plantas neste mesmo ensaio, não era expectável, especialmente porque no dia 30 o *Fusarium* foi encontrado em maior quantidade nas raízes do que no dia 15. Não será de descartar uma possível falha técnica de deteção, nomeadamente problemas na extração de DNA, pelo que seria interessante repetir este teste. Estudos anteriores de quantificação do fungo *F. verticillioides* mostraram que a quantificação na raiz ao fim de 15 dias apresentou um valor muito superior ao do colo (cerca do dobro) enquanto que ao fim de 30 dias, os valores na raiz baixaram e apresentaram valores idênticos ao do colo (Flavia et al., 2004), mostrando que a incidência do fungo na raiz vai diminuindo ao longo do tempo, no entanto no que diz respeito ao colo a quantificação é maior ao fim de 30 dias. Estes resultados, tais como os obtidos neste trabalho, mostram que a entrada do fungo se dá pela raiz. Diversos autores têm citado que o *F. verticillioides* causa a podridão radicular no milho. Logicamente, pela evolução da doença, ou seja, com o crescimento do micélio, o fungo conseguirá atingir outros órgãos da planta, nomeadamente o colo.

O aparente maior sucesso do *Fusarium* no ensaio em que foram usados os dois agentes patogénicos, em relação ao ensaio em que foi usado apenas *Fusarium*, parecia sugerir que a presença de *M. maydis* ajudasse ao crescimento de *Fusarium*, no entanto, o facto de não se ter detetado *M. maydis* nas plantas remete para a diferença nos substratos utilizados. O facto de o substrato de crescimento de *M. maydis* ser menos poroso, fez

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

com que as plantas mostrassem algum atraso e dificuldade no crescimento. O stress causado pode estar na origem de uma mais fácil colonização do *Fusarium* nestas plantas e portanto na sua maior deteção nos vasos do ensaio *Fusarium* mais *M. maydis*.

De facto, estudos realizados em algodão (SABET et al., 1966), mostraram que poderia ser expectável um menor crescimento de *Fusarium* quando na presença de *M. maydis* e não o contrário, uma vez que o *M. maydis* mostrou tornar as raízes da planta menos adequadas para a progressão do *Fusarium*. No entanto, os mesmos autores, quando usaram plantas de milho, concluíram que o *F. oxysporum* não exerceu qualquer tipo de efeito apreciável na agressividade do *M. maydis*.

Outros estudos (Lee et al., 2009), mostraram que quando *F. verticillioides* foi inoculado simultaneamente com *Ustilago maydis*, a gravidade da doença no milho, diminui significativamente, sugerindo que o *F. verticillioides* inibiu a infeção de *Ustilago maydis* no início do desenvolvimento da doença.

Será essencial repetir o ensaio, prolongando o tempo e usando substratos mais adequados ao desenvolvimento das plantas para perceber a influência que estes fungos exercem um no outro.

O facto de não se ter detetado *M. maydis* em nenhum dos ensaios pode estar relacionado com a duração do ensaio. Estudos anteriores (Tej et al., 2018), mostraram que só se conseguiu quantificar o agente patogénico *M. maydis* ao fim de 6 semanas, mostrando que este fungo necessita de um período longo para entrar no interior da planta.

Outra hipótese que surgiu para não existir qualquer quantificação do agente patogénico *M. maydis* no milho, foi a utilização de uma variedade de milho mais tolerante a este fungo (híbrido P0933 com ciclo FAO-500). Esta apresenta maior tolerância ao agente patogénico, afetando a agressividade do fungo e atrasar a entrada do *M. maydis* na planta (Garcia-Carneros et al., 2012).

Menos provável é que o *Fusarium* tenha interferido no desenvolvimento de *M. maydis*, uma vez que o *M. maydis* também não foi detetado em plantas inoculadas apenas com este fungo. Seria necessário um novo ensaio para perceber se tal acontece.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

6. Conclusão

No nosso estudo através da recolha de amostras de plantas de milho em diferentes locais tanto de Espanha como em Portugal pretendeu-se identificar isolados de *Fusarium* sp. e *M. maydis* presentes. Inicialmente foi feita uma seleção dos isolados a partir de características morfológicas, com base em diferentes cores e texturas que cada um apresentava em placa, assim como pela morfologia dos esporos observados ao microscópio. Tal permitiu verificar a presença apenas de 69 isolados do género *Fusarium*. De seguida, procedeu-se a identificação molecular das espécies de *Fusarium* por PCR. Para tal foram utilizadas duas regiões do genoma, *elongation factor* e β -tubulina, com os respetivos *primers* Fa+7 e Ra+6 e T1 e T22. O par de *primers* Fa +7/Ra+6 permitiu identificar um maior número de espécies (31), esta identificação foi complementada pelos *primers* T1 /T22, que permitiu identificar 25, totalizando 40 isolados identificados a nível de espécie.

A espécie de *Fusarium* sp. que apresentou maior incidência foi o *Fusarium verticillioides*, em Espanha enquanto que em Portugal foi o *F. subglutinans*. A espécie escolhida para o ensaio experimental foi o *F. verticillioides*.

O ensaio experimental que consistiu no estudo da interação entre *Fusarium* e *M. maydis*, mostrou que apenas o *Fusarium* entrou nas raízes das plantas de milho, tendo sido encontrado nestas em maior quantidade, no ensaio onde se combinou *Fusarium* com *M. maydis*, onde também foi encontrado no colo. Tal resultado parece ter sido devido ao diferente substrato utilizado na situação da mistura com *Fusarium* e *M. maydis*, que causou um maior stress nas plantas, e não devido a presença de *M. maydis*, o qual não foi detetado em nenhuma situação.

Como não existiu qualquer quantificação do *M. maydis*, não podemos concluir que tal seja resultado de qualquer interação com *Fusarium*, até porque o mesmo aconteceu no ensaio com apenas *M. maydis*, mas sim que, e como foi anteriormente referido em várias investigações, este necessitava de mais tempo para entrar na planta.

Em ensaios futuros deve-se alongar o período experimental, para que o agente patogénico responsável pela murchidão tardia do milho tenha tempo de entrar na planta e só aí observar a relação entres estes dois fungos.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

7. Referências Bibliográficas

- Aguín, O., Cao, A., Pintos, C., Santiago, R., Mansilla, P., and Butrón, A. (2014). Occurrence of *Fusarium* species in maize kernels grown in northwestern Spain. *Plant Pathology* 63, 946-951.
- ARIÑO, A., JUAN, T., ESTOPAÑAN, G., and GONZÁLEZ-CABO, J. F. (2007). Natural Occurrence of *Fusarium* Species, Fumonisin Production by Toxigenic Strains, and Concentrations of Fumonisin B1 and B2 in Conventional and Organic Maize Grown in Spain. *Journal of Food Protection* 70, 151-156.
- Bustos, C. M., Testi, L., García-Carneros, A., and Molinero-Ruiz, L. (2015). Geographic distribution and aggressiveness of *Harpophora maydis* in the Iberian peninsula, and thermal detection of maize late wilt. *European Journal of Plant Pathology* 144.
- Campos, M., Patanita, M., Campos, C., Materatski, P., Varanda, C., Brito, I., and Félix, M. (2019). Detection and Quantification of *Fusarium* spp. (*F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*) and *Magnaportheopsis maydis* in Maize Using Real-Time PCR Targeting the ITS Region. *Agronomy* 9, 45.
- Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo de milho (*Zea mays* L.). Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo. 2010. 84 f. Dissertação (Doutor- Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., and Etcheverry, M. (2005). In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production: effect of seeds treatment on maize root colonization. *Letters in Applied Microbiology* 41, 390-396.
- Degani, O., et al. (2019). "Methods for Studying *Magnaportheopsis maydis*, the Maize Late Wilt Causal Agent." *Agronomy* 9(4): 181.
- De Boevre, M., Landschoot, S., Audenaert, K., Maene, P., Di Mavungu, D., Eeckhout, M., Haesaert, G., and De Saeger, S. (2014). Occurrence and within field variability of *Fusarium* mycotoxins and their masked forms in maize crops in Belgium. *World Mycotoxin Journal* 7, 91-102.
- Degani, O., Dor, S., Movshovitz, D., and Rabinovitz, O. (2019). Methods for Studying *Magnaportheopsis maydis*, the Maize Late Wilt Causal Agent. *Agronomy* 9, 181.
- Degani, O., Weinberg, T., Cernica, G., and Rabinovitz, O. (2013). "The agent of late wilt of corn, *Harpophora maydis*, pathogenesis and control."
- Drori, R., et al. (2012). "Molecular diagnosis for *Harpophora maydis*, the cause of maize late wilt in Israel." *Phytopathologia Mediterranea* 52: 16-29.
- Estrada, A., et al. (2012). "Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: An endophyte, a pathogen, and their shared plant host." *Fungal Genet Biol* 49: 578-587.
- Figueira, E., Coelho, A., Ono, E., and Hirooka, E. (2003). Milho: Riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Ciências Agrárias* 24.
- Flavia, S., Melo Reis, E., and Trezzi, C. (2004). Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. *Fitopatologia Brasileira* 29.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

- Freeman, S., Maimon, M., and Pinkas, Y. (1999). Use of GUS Transformants of *Fusarium* subglutinans for Determining Etiology of Mango Malformation Disease. *Phytopathology* 89, 456-61.
- Gams, W. (2000). Phialophora and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent Ascomycetes. *Studies in Mycology* 2000, 187-199.
- Garcia-Carneros, A. B., Giron, I., and Molinero-Ruiz, L. (2012). Aggressiveness of *Cephalosporium maydis* causing late wilt of maize in Spain. *Commun Agric Appl Biol Sci* 77, 173-9.
- Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology* 133, 1-4.
- Goertz, A., Zühlke, S., Spitteller, M., Steiner, U., Dehne, H. W., Waalwijk, C., Vries, I., and Oerke, E. (2010). *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* 128, 101-111.
- Hsuan, H.M.; Salleh, B.; Zakaria, L. Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 6722-6732.
- Jurado, M., Vázquez, C., Callejas, C., and González-Jaén, M. (2006). Occurrence and variability of mycotoxigenic *Fusarium* species associated to wheat and maize in the South West of Spain. *Mycotoxin research* 22, 87-91.
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M., Kolseth, A.-K., Steinberg, C., Persson, P., and Friberg, H. (2016). Evaluation of genus-specific primers for studying *Fusarium* communities in field samples. *Applied and environmental microbiology* 82, 491-501.
- Lanza, F., Figueiredo, J., Figueiredo, F., Costa, R., Moura, L., Moura, O., Martins Marcondes, M., Da Silva, D., Viana, L., Lima Corrêa, C., Nicoli, A., Coeli, T., De, D., and Ramos, A. (2012). "Efeito do tratamento de sementes com o biofungicida bacteriano CNPMS22 na sobrevivência e desenvolvimento de plantas de milho em solo infestado com *Fusarium verticillioides*."
- Lee, K., Pan, J. J., and May, G. (2009). Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize. *FEMS Microbiology Letters* 299, 31-37.
- Malavolta, E., Rapchan, V. M., Castro, A. M. G. d., Souza, A. P., Lopes, E. S., Sobral, L. F., Lovato, L. A., Menezes, M., Tisselli F^o, O., and Oliveira, G. D. (1975). Estudos sobre a nutrição mineral do milho: II - deficiências de macronutrientes na variedade Piranão. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz* 32, 509-525.
- Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M., and Mateos, A. (2010). *Cephalosporium maydis*, the Cause of Late Wilt in Maize, a Pathogen New to Portugal and Spain. *Plant Disease* 94, 379-379.
- Munkvold, G. P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* Diseases and their Mycotoxins in Maize Ears. *European Journal of Plant Pathology* 109, 705-713.
- Munkvold, G. P., and Hellmich, R. L. (2000). Genetically Modified, Insect Resistant Maize: Implications for Management of Ear and Stalk Diseases. *Plant Health Progress* 1, 17.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., and Carlton, W. M. (1997). Importance of Different Pathways for Maize Kernel Infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87, 209-217.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

- Nelson, P. E. (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117, 29-36.
- Olowe, O. M., Olawuyi, O. J., Sobowale, A. A., and Odebode, A. C. (2018). Role of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* causing ear rot of *Zea mays* L. (Maize). *Current Plant Biology* 15, 30-37.
- Olowe, O., et al. (2018). "Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi as biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* causing Ear rot of *Zea mays* L. (Maize)." *Current Plant Biology* 15.
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., and Sharon, A. (2003). Early Events in the *Fusarium verticillioides*-Maize Interaction Characterized by Using a Green Fluorescent Protein-Expressing Transgenic Isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1695-1701.
- Ortiz-Bustos, C. M., et al. (2015). "La marchitez tardía del maíz (*Zea mays* L.) causada por *Cephalosporium maydis* en la Península Ibérica, y otros hongos asociados." *Summa Phytopathologica* 41: 107-114.
- Patanita, M., Campos, M., Félix, M., Carvalho, M., and Brito, I. (2020). Effect of Tillage System and Cover Crop on Maize Mycorrhization and Presence of *Magnaportheopsis maydis*. *Biology* 9, 46.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., and Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312, 105-112.
- Ranum, P., et al. (2014). "Global maize production, utilization, and consumption." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312.
- Reid, L. M., Woldemariam, T., Zhu, X., Stewart, D. W., and Schaafsma, A. W. (2002). Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium subglutinans* inoculated maize ears. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24, 162-167.
- Rojas, M., et al. (2018). "Infection of maize inbred B73 by *Ustilago maydis* and *Fusarium proliferatum* triggers differential expression of the β -glucosidase genes." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 104.
- SABET, K. A., SAMRA, A. S., and MANSOUR, I. S. (1966). Interaction between *Fusarium oxysporum* F. *vasinfectum* and *Cephalosporium maydis* on cotton and maize. *Annals of Applied Biology* 58, 93-101.
- Saleh, A., and Leslie, J. (2004). "*Cephalosporium maydis* Is a Distinct Species in the *Gaeumannomyces-Harpophora* Species Complex."
- Samra, A. S., Sabet, K. A., and Hingorani, M. K. (1963). Late wilt disease of Maize caused by *Cephalosporium maydis*. *Phytopathology* 53, 402-406 pp.
- Sankar, N. R., and Babu, G. P. (2012). First Report of *Fusarium proliferatum* Causing Rot of Garlic Bulbs (*Allium sativum*) in India. *Plant Disease* 96, 290-290.
- Scarpino, V., Reyneri, A., Vanara, F., Scopel, C., Causin, R., and Blandino, M. (2015). Relationship between European Corn Borer injury, *Fusarium proliferatum* and *F. subglutinans* infection and moniliformin contamination in maize. *Field Crops Research* 183, 69-78.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

- Scarpino, V., et al. (2015). "Relationship between European Corn Borer injury, *Fusarium proliferatum* and *F. subglutinans* infection and moniliformin contamination in maize." *Field Crops Research* 183: 69-78.
- Scaufaire, J., et al. (2012). "A multiplex real-time PCR method using hybridization probes for the detection and the quantification of *Fusarium proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. temperatum*, and *F. verticillioides*." *Fungal biology* 116: 1073-1080.
- Schroers, H.-J., O'Donnell, K., Lamprecht, S. C., Kammeyer, P. L., Johnson, S., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Geiser, D. M., and Summerbell, R. C. (2009). Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia* 101, 44-70.
- Sikhakolli, U. R., Lopez-Giraldez, F., Li, N., Common, R., Townsend, J. P., and Trail, F. (2012). Transcriptome analyses during fruiting body formation in *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* reflect species life history and ecology. *Fungal Genet Biol* 49, 663-73.
- Souza, A., et al. (2007). "Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho." *Fitopatologia Brasileira* 32.
- Tej, R., Rodríguez-Mallol, C., Rodríguez-Arcos, R., Karray-Bouraoui, N., and Molinero-Ruiz, L. (2018). Inhibitory effect of *Lycium europaeum* extracts on phytopathogenic soil-borne fungi and the reduction of late wilt in maize. *European Journal of Plant Pathology* 152, 249-265.
- Vigier, B., Reid, L. M., Seifert, K. A., Stewart, D. W., and Hamilton, R. I. (1997). Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 60-65.
- Vismer, H. F., Shephard, G. S., van der Westhuizen, L., Mngqawa, P., Bushula-Njah, V., and Leslie, J. F. (2019). Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains in vitro. *International Journal of Food Microbiology* 296, 31-36.
- Vismer, H., et al. (2019). "Mycotoxins produced by *Fusarium proliferatum* and *F. pseudonygamai* on maize, sorghum and pearl millet grains in vitro." *International Journal of Food Microbiology* 296.
- Walker, C., Maciel, C. G., Milanesi, P. M., Muniz, M. F. B., Mezzomo, R., and Pollet, C. S. (2016). CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE *Fusarium acuminatum* E *Fusarium verticillioides* A *Cordia americana*. *Ciência Florestal* 26, 463-473.
- Zeller, K. A., Jurgenson, J. E., El-Assiuty, E. M., and Leslie, J. F. (2000). Isozyme and amplified fragment length polymorphisms from *Cephalosporium maydis* in Egypt. *Phytoparasitica* 28, 121.
- Zeller, K., et al. (2012). "Isozyme and amplified fragment length polymorphism (AFLPs) from *Cephalosporium maydis* in Egypt." *Phytoparasitica* 28: 121-130.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

8. ANEXOS

Anexo I- Quadro das amostras que deram positivo e negativo com os diferentes primers utilizados no PCR, nomeadamente T1/T22 e Fa+7/Ra+6

Número do Isolado	Local de Origem	Identificação molecular	
		Fa+7/Ra+6	T1/T22
-	-	-	-
1	Portugal	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium subglutinans</i>
2	Espanha	-	-
3	Portugal	*	<i>Fusarium mangiferae</i>
4	Portugal	-	<i>Fusarium subglutinans</i>
5	Portugal	<i>Fusarium equiseti</i>	-
6	Portugal	-	-
7	Espanha	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium proliferatum</i> ;
8	Portugal	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium verticillioides</i>
9	Portugal	-	-
10	Portugal	-	-
11	Portugal	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Fusarium</i> sp.
12	Portugal	-	-
13	Portugal	-	-
14	Portugal	-	-
15	Portugal	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium subglutinans</i>
16	Portugal	*	<i>Fusarium Oxysporium</i>
17	Portugal	-	CP
18	Portugal	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium subglutinans</i>
19	Portugal	-	-
20	Portugal	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Fusarium</i> sp.
21	Portugal	-	-
22	Portugal	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
23	Portugal	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Fusarium</i> sp.
24	Portugal	-	-
25	Portugal	-	-
26	Portugal	<i>Fusarium subglutinans</i>	*
27	Portugal	<i>Fusarium equiseti</i>	-

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

28	Portugal	*	<i>Fusarium subglutinans</i>
29	Portugal	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.
30	Portugal	<i>Fusarium subglutinans</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>
31	Portugal	-	-
32	Portugal	-	-
33	Portugal	-	-
34	Portugal	<i>Fusarium subglutinans</i>	-
35	Portugal	*	-
36	Portugal	*	<i>Fusarium oxysporum</i>
37	Portugal	*	-
38	Portugal	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
39	Portugal	-	-
40	Portugal	<i>Fusarium</i> sp.	-
41	Portugal	*	<i>Fusarium proliferatum</i>
42	Portugal	<i>Fusarium equiseti</i>	-
43	Portugal	<i>Fusarium oxysporum</i>	*
44	Portugal	<i>Fusarium subglutinans.</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>
45	Portugal	<i>Fusarium oxysporum</i>	*
46	Portugal	<i>Fusarium equiseti</i>	-
47	Portugal	<i>Fusarium oxysporum</i>	-
48	Espanha	*	-
49	Espanha	-	-
50	Espanha	-	-
51	Espanha	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	-
52	Espanha	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
53	Espanha	<i>Fusarium equiseti</i>	-
54	Espanha	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium verticillioides</i>
55	Espanha	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
56	Espanha	-	-
57	Espanha	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium</i> sp.
58	Espanha	-	-
59	Espanha	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Fusarium</i> sp.

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

		<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
60	Espanha		
61	Espanha	-	-
62	Espanha	-	-
63	Espanha	-	-
64	Espanha	*	-
65	Espanha	-	-
66	Espanha	*	-
67	Espanha	-	-
68	Espanha	*	-
69	Espanha	-	-

* Produtos de amplificação de PCR que, após sequenciação, não foi possível a identificação.

Anexo II- Valores Ct dos vasos apenas com *Fusarium verticillioides*

Valores de Ct nas raízes	Valores de Ct no colo	Valores de Ct no controlo negativo (raiz e colo)	Valores de Ct da semente (Controlo negativo)
34,12	38,07	37,37	37,54
34,31	37,90	37,27	36,06
28,95	-	38,34	37,89
29,15	-	38,09	37,43
38,16	38,79	36,10	39,02
39,41	38,65	36,58	39,73
37,64	38,54	-	27,52
38,94	39,05	-	27,98
38,00	37,35	-	28,00
37,93	37,49		
32,17	36,16		
32,34	35,43		
31,07	35,66		
31,04	35,14		
37,33	-		
37,23	-		

Identificação de diferentes isolados de *Fusarium* spp. em plantas de milho com sintomas de fusariose

Anexo III- Valores Ct do *F. verticillioides* na mistura com ambos os fungos

Valores de Ct na raiz	Valores de Ct no colo	Valores de Ct no controlo negativo (raiz e colo)	Valores de Ct no controlo negativo (semente)
34,52	28,08	30,48	-
25,47	28,35	30,53	-
28,83	26,20	39,03	38,73
28,83	26,27	38,11	38,59
29,92	34,65	-	28,21
30,18	33,99	-	27,88
31,00	-	-	27,59
30,93	-		
34,63	27,54		
36,58	27,68		
27,93	36,68		
27,68	36,71		
28,10	35,35		
28,13	36,41		
30,69	36,46		
30,95	36,46		