

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANDERSON CARLOS FINGER

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO
COLMO (*Colletotrichum graminicola*) EM GERMOPLASMA DE MILHO TROPICAL**

PONTA GROSSA

2022

ANDERSON CARLOS FINGER

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO
COLMO (*Colletotrichum graminicola*) EM GERMOPLASMA DE MILHO TROPICAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Agronomia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Agricultura. Linha de Pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de culturas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

PONTA GROSSA

2022

F497 Finger, Anderson Carlos
Expressão diferencial de genes de resistência à antracnose do colmo (*Colletotrichum graminicola*) em germoplasma de milho tropical / Anderson Carlos Finger. Ponta Grossa, 2022.
79 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello.

1. Zea mays L. 2. Podridão do colmo. 3. Genes de defesa. 4. Expressão gênica. 5. RT-qPCR. I. Matiello, Rodrigo Rodrigues. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Agricultura. III.T.

CDD: 633



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO COLMO (*Colletotrichum graminicola*) EM GERMOPLASMA DE MILHO TROPICAL**”.

Nome: **Anderson Carlos Finger**

Orientador: Rodrigo Rodrigues Matiello

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

Profa. Dra. Silvana Ohse

Prof. Dr. Leocir José Welter

Ponta Grossa 08, de julho, de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Rodrigues Matiello, Professor(a)**, em 13/07/2022, às 17:26, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Silvana Ohse, Professor(a)**, em 14/07/2022, às 10:45, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Leocir José Welter, Usuário Externo**, em 29/08/2022, às 10:30, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1054388** e o código CRC **42302F06**.

Aos meus pais
Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos concedidas a cada novo dia.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial ao Programa de Pós-graduação em Agronomia e à todas as pessoas sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Professor Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, pela idealização do presente estudo e por todo auxílio, ensinamentos e excelente orientação.

À Professora Dr. Caroline de Jesus Coelho, pelo companheirismo, dedicação e ensinamentos repassados.

À Professora Dr. Mara Cristina de Almeida Matiello pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Artêmio e Leonida, e minha irmã Andréia, por serem fonte de inspiração e amor, exemplo de honestidade e perseverança, e pelo apoio e incentivo durante essa jornada.

Aos meus avôs (in memoriam) e avós, pelo exemplo de vida e humildade, e por todo amor e carinho.

Aos meus amigos Liandra Kulika, Jorge Locatelli, Érica Oliveira, Vanderson Duarte, e minha companheira Rosane Haupt, os quais foram essenciais nesses últimos anos.

A todos os meus colegas do Laboratório de Genética Molecular e Melhoramento Genético de Plantas, em especial Fátima, Júlia, Débora, Maria Fernanda, Mariana, Mateus, Guilherme, Felipe e Lucas, pela amizade e por todo auxílio na realização deste trabalho.

RESUMO

FINGER, A. C. **Expressão diferencial de genes de resistência à antracnose do colmo (*Colletotrichum graminicola*) em germoplasma de milho tropical.** 2022. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils., é uma das principais podridões da base do colmo no milho. O uso de cultivares resistentes é a estratégia de controle mais eficiente, econômica e sustentável. Neste estudo, foi realizada uma análise temporal da expressão gênica de duas linhagens endogâmicas de milho tropical inoculadas com *C. graminicola*. Foram utilizadas duas linhagens contrastantes para resistência, L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível), as quais foram cultivadas em duas condições ambientais, câmara de crescimento e casa de vegetação, e inoculadas no colmo com o patógeno nos estádios V6 e VT, respectivamente. Para a extração do mRNA, tecido da medula do segundo internódio dos colmos, foi coletado as 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a inoculação. A análise da expressão gênica foi realizada através da RT-qPCR, para onze genes relacionados à resistência/defesa, e a quantificação relativa da expressão de cada gene foi determinada pelo método Cq comparativo. No estágio V6, houve expressão diferencial precoce para os genes *ZmPR5*, *ZmLOX3*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmCYP94B12*, enquanto que no estágio VT, para os genes *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX3*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmACO31*, com maior nível de indução na linhagem resistente L04-2 nos dois estádios. O pico de expressão dos genes *ZmBB* e *ZmWIP1* no estágio V6, e dos genes *ZmPR1*, *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmACO31* no estágio VT, foi atingido anteriormente na linhagem resistente L04-2, em relação à linhagem suscetível L99-4. Os resultados demonstraram que a expressão dos genes *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmCYP94B12* foi afetada pelo estágio de desenvolvimento, com maior nível de expressão no estágio VT. Nesse estágio, o *ZmWIP1* evidenciou um padrão de expressão notavelmente contrastante entre as linhagens, confirmando a indução da resistência precocemente na linhagem resistente L04-2, e tardiamente na linhagem suscetível L99-4. Sugere-se que no estágio V6, o gene *ZmBB* teve maior contribuição para a resistência ao *C. graminicola*, enquanto que em VT, o gene *ZmLOX5*. A resistência à antracnose do colmo da linhagem L04-2, é explicada por uma rápida indução de diferentes genes de defesa da planta, confirmando sua elevada resistência ao *C. graminicola*. Os resultados da expressão gênica ampliaram o conhecimento científico sobre os genes mais efetivos para a resistência à antracnose do colmo em germoplasma de milho tropical, bem como a resposta da expressão gênica das linhagens endogâmicas dependente do estágio de desenvolvimento (V6 ou VT). O conhecimento científico obtido poderá auxiliar no desenvolvimento de cultivares de milho com maior resistência à antracnose do colmo.

Palavras-chave: *Zea mays* L., podridão do colmo, genes de defesa, expressão gênica, RT-qPCR.

ABSTRACT

FINGER, A. C. **Differential expression of genes for resistance to anthracnose stalk rot (*Colletotrichum graminicola*) in tropical maize germplasm.** 2022. Dissertation (Master degree in Agronomy) – State University of Ponta Grossa.

Anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. is one of the main stalk-base rots in maize. The use of resistant cultivars is the most efficient, economical and sustainable control strategy. In this study, a temporal analysis of gene expression of two inbred tropical maize lines inoculated with *C. graminicola* was performed. Two lines contrasting for resistance, L04-2 (resistant) and L99-4 (susceptible), were used and cultivated in two environmental conditions, growth chamber and greenhouse, and inoculated in the stalk with the pathogen at the V6 and VT stages, respectively. For mRNA extraction, pith tissue from the second internode of the stalks was collected at 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 and 336 hours after inoculation. Gene expression analysis was performed by RT-qPCR for eleven resistance/defense related genes, and the relative quantification of the expression of each gene was determined by the comparative Cq method. At the V6 stage, there was early differential expression for genes *ZmPR5*, *ZmLOX3*, *ZmBB*, *ZmWIP1* and *ZmCYP94B12*, while at the VT stage, for genes *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX3*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* and *ZmACO31*, with a higher level of induction in resistant line L04-2 at both stages. The peak expression of *ZmBB* and *ZmWIP1* genes at the V6 stage, and of *ZmPR1*, *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* and *ZmACO31* genes at the VT stage, was reached earlier in the resistant line L04-2 compared to the susceptible line L99-4. The results showed that the expression of *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* and *ZmCYP94B12* genes was affected by developmental stage, with higher expression level at VT stage. At this stage, *ZmWIP1* evidenced a remarkably contrasting expression pattern between lines, confirming the induction of resistance early in resistant line L04-2, and late in susceptible line L99-4. It is suggested that at the V6 stage, the *ZmBB* gene had the greatest contribution to resistance to *C. graminicola*, whereas at VT, the *ZmLOX5* gene. The resistance to anthracnose stalk rot of line L04-2, is explained by a rapid induction of different plant defense genes, confirming its high resistance to *C. graminicola*. The gene expression results extended the scientific knowledge about the most effective genes for anthracnose stalk rot resistance in tropical maize germplasm, as well as the gene expression response of inbred lines dependent on the developmental stage (V6 or VT). The scientific knowledge obtained may assist in the development of maize cultivars with greater resistance to anthracnose stalk rot.

Keywords: *Zea mays* L., stalk rot, defense genes, gene expression, RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lesão interna da antracnose do colmo (<i>C. graminicola</i>) na linhagem resistente (L04-2) (A) e suscetível (L99-4) (B).	32
Figura 2 - Plantas cultivadas em câmara de crescimento e inoculadas no estágio vegetativo V6 (A) e plantas cultivadas em casa de vegetação e inoculadas no estágio de florescimento pleno (B).	33
Figura 3 - Placa de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar, após a repicagem do <i>C. graminicola</i> (A), placa de Petri com colônias de <i>C. graminicola</i> esporuladas (B) e suspensão concentrada de conídios (C).	35
Figura 4 - Região do colmo inoculada com <i>C. graminicola</i> (A) e tecido da medula do colmo coletado para extração do mRNA (B).	36
Figura 5 - Visualização do perfil eletroforético de amostras de mRNA, em gel de agarose 1%.	40
Figura 6 - Expressão dos genes (A) <i>ZmPR3</i> , (B) <i>ZmPR5</i> e (C) <i>ZmPR10.1</i> na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao <i>C. graminicola</i> , em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio vegetativo V6, em câmara de crescimento.	45
Figura 7 - Expressão dos genes (A) <i>ZmLOX3</i> , (B) <i>ZmLOX5</i> , (C) <i>ZmBB</i> e (D) <i>ZmWIP1</i> na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao <i>C. graminicola</i> , em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio vegetativo V6, em câmara de crescimento... ..	48
Figura 8 - Expressão dos genes (A) <i>ZmACO31</i> , (B) <i>ZmCYP94B12</i> e (C) <i>ZmLECB</i> na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao <i>C. graminicola</i> , em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio vegetativo V6, em câmara de crescimento.	51
Figura 9 - Expressão dos genes (A e B) <i>ZmPR1</i> , (C e D) <i>ZmPR5</i> , (E) <i>ZmPR3</i> e (F) <i>ZmPR10.1</i> na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao <i>C. graminicola</i> , em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio de florescimento pleno - VT, em casa de vegetação.	55
Figura 10 - Expressão dos genes (A) <i>ZmLOX3</i> , (B) <i>ZmLOX5</i> , (C e D) <i>ZmBB</i> e (E) <i>ZmWIP1</i> na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao <i>C. graminicola</i> , em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio de florescimento pleno - VT, em casa de vegetação.	60
Figura 11 - Expressão dos genes (A) <i>ZmACO31</i> , (B) <i>ZmCYP94B12</i> e (C) <i>ZmLECB</i> na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao <i>C. graminicola</i> , em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio de florescimento pleno - VT, em casa de vegetação. ..	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos genes, descrição e sequência dos iniciadores (forward e reverse) dos genes avaliados para resistência à antracnose do colmo.	38
Tabela 2 - Concentrações e relações de absorvância do mRNA das linhagens de milho L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) cultivadas em câmara de crescimento e inoculadas com <i>C. graminicola</i> no estágio vegetativo V6, em diferentes períodos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h).	41
Tabela 3 - Concentrações e relações de absorvância do mRNA das linhagens de milho L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) cultivadas em casa de vegetação e inoculadas com <i>C. graminicola</i> no estágio de florescimento pleno - VT, em diferentes períodos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h).	43
Tabela 4 - Expressão relativa máxima e período após a inoculação para atingir o pico máximo da expressão gênica nas linhagens L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) à antracnose do colmo no estágio de florescimento pleno - VT.	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PODRIDÕES DA BASE DO COLMO EM MILHO.....	13
3.2	ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DO <i>Colletotrichum graminicola</i>	15
3.3	GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO COLMO	18
3.4	EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL	23
3.5	EXPRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO	32
4.2	OBTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E PREPARO DO INÓCULO	34
4.3	INOCULAÇÃO E COLETA DE TECIDO VEGETAL.....	35
4.4	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNAs	36
4.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	INTEGRIDADE, QUALIDADE E CONCENTRAÇÃO DO RNA EXTRAÍDO	40
5.2	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RESISTÊNCIA	44
5.2.1	Expressão de genes de resistência no estágio V6.....	44
5.2.2	Expressão de genes de resistência no estágio VT	53
5.2.3	Efeito do estágio de desenvolvimento e da condição ambiental na expressão de genes de resistência	65
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) atingiu nos últimos anos o patamar de maior cultura agrícola mundial, ultrapassando a marca de 1 bilhão de toneladas produzidas ao ano. Na safra 2021/22, os Estados Unidos da América se destacaram como maior produtor mundial, com produção estimada em 383,9 milhões de toneladas (31,6%), seguido da China com 272,6 (22,4%) e pelo Brasil com 116 milhões de toneladas (9,5%) (USDA, 2022).

No cenário nacional, o milho desponta no segmento agropecuário, haja vista sua importância socioeconômica, pela extensa área de cultivo e por constituir um dos principais insumos agrícolas no complexo industrial. A área cultivada com milho na safra 2021/22 foi superior a 21,5 milhões de hectares, com produtividade média de 5.330 kg ha⁻¹ (CONAB, 2022). Essa produtividade vem crescendo anualmente, embora ainda distante do real potencial genético da cultura, em função das inúmeras limitações, como estresses bióticos e abióticos. Dentre os estresses bióticos, as doenças apresentam grande importância, devido ao significativo aumento na incidência e na severidade que vem sendo observado nos últimos anos, acarretando em perdas de produtividade e qualidade dos grãos (PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006; COTA et al., 2013).

Entre os principais patógenos que incidem sobre a base do colmo do milho, o *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. é considerado o mais agressivo, pois além de infectar o colmo, pode atacar os demais órgãos da planta, independente do estágio de desenvolvimento. No colmo, esse patógeno coloniza e degrada os feixes vasculares, restringindo severamente a translocação de água e nutrientes, levando a morte prematura das plantas. Adicionalmente, pode ocorrer o tombamento da planta, resultando em perdas significativas no rendimento potencial da cultura (MATIELLO et al., 2012; BANDARA et al., 2019; COSTA et al., 2019).

A principal estratégia de manejo da antracnose do colmo é a utilização de cultivares resistentes, em função de ser um método altamente eficiente, sustentável e de baixo custo. O desenvolvimento de genótipos comerciais, pelos programas de melhoramento, tem sido viabilizado a partir de ciclos de seleção artificial, através da seleção assistida por marcadores moleculares, e na última década, pela análise da expressão gênica (COELHO et al., 2001; FERREIRA; CASELA, 2001; MATIELLO et al., 2012).

Os patógenos hemibiotróficos não suprimem as defesas da planta durante a fase biotrófica, desse modo ocorre alta indução de mecanismos de defesa durante a infecção pelo *C. graminicola* no decorrer do desenvolvimento biotrófico. Contudo, grupos de genes específicos

são expressos na planta em função da fase de crescimento do patógeno e do tecido que está sendo colonizado (VARGAS et al., 2012; BALMER et al., 2013).

Os mecanismos de defesa do milho à infecção por *C. graminicola* envolvem a estimulação da biossíntese de compostos fenólicos, especialmente ligados a síntese de fenilpropanoides, os quais são precursores da lignina (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977a; VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980). Além disso, também estão envolvidos genes que codificam para proteínas inibidoras da poligalacturonase 1 (PGIP), proteínas Barwin, proteínas relacionadas à patogênese (PR) e genes que estão ligados à biossíntese de ácido salicílico, ácido jasmônico, ácido abscísico, etileno e demais metabólitos secundários (BALMER et al., 2013; MIRANDA et al., 2017).

O controle genético da resistência nesse patossistema, envolve um ou poucos genes de efeito predominantemente aditivo, embora, também tem sido relatado resistência oligogênica com efeito dominante (LIM; WHITE, 1978; CARSON; HOOKER, 1981; BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987; TOMAN JÚNIOR; WHITE, 1993; JUNG et al., 1994; MATIELLO et al., 2012; MATIELLO; MÁXIMO; COELHO, 2021). Em relação ao número de genes, já foram mapeados locos de resistência quantitativa (QRLs), associados a alelos de resistência, nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (CARSON; HOOKER, 1982; JUNG et al., 1994; MATIELLO, 2004). Contudo, a expressão de um gene associado a um QRL, pode ocorrer em estádios de desenvolvimento específicos da planta (ZUO et al., 2015).

As respostas de defesa do milho ao *C. graminicola* e aos demais fungos patogênicos hemibiotróficos, envolvem a indução dos genes que codificam para proteínas PR, proteínas inibidoras de Bowman-Birk e proteínas antimicrobianas de percepção (lectinas). Além dessas, incluem a ativação de genes que codificam para enzimas que atuam na peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (LOX), e o aumento na expressão de genes que estão envolvidos no metabolismo hormonal (etileno e ácido jasmônico), e na biossíntese de fitoalexinas (BALMER et al., 2013; YUAN et al., 2013; MASCHIETTO et al., 2015; MIRANDA et al., 2017; KEBEDE et al., 2018; LAMBAREY et al. 2020; YUAN et al., 2020). Apesar disso, necessita-se de maiores investigações científicas, principalmente no que diz respeito a expressão de genes de defesa nos tecidos do colmo, tendo em vista a importância dessa doença na cultura do milho. Este trabalho é o primeiro relato na literatura avaliando a expressão de genes de resistência ao *C. graminicola* em tecido do colmo, além disso, utilizando linhagens endogâmicas de milho tropical contrastantes para resistência à doença. Adicionalmente, não há trabalhos na literatura avaliando a expressão de genes de resistência em tantos tempos de coleta de tecido vegetal, totalizando quatorze dias após a inoculação da planta com o patógeno.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de genes de resistência à antracnose do colmo (*Colletotrichum graminicola*) em linhagens endogâmicas de milho tropical.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar a expressão dos genes *ZmPR1*, *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX3*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1*, *ZmACO31*, *ZmCYP94B12* e *ZmLECB* em linhagens endogâmicas de milho tropical contrastantes para a resistência ao *C. graminicola*.

Identificar os períodos de máxima expressão dos genes *ZmPR1*, *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX3*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1*, *ZmACO31*, *ZmCYP94B12* e *ZmLECB* nas linhagens resistente (L04-2) e suscetível (L99-4) ao patógeno.

Avaliar a expressão gênica diferencial entre as linhagens L04-2 e L99-4, para os possíveis genes de resistência.

Verificar se a expressão dos genes relacionados à resistência à antracnose do colmo é dependente do estágio de desenvolvimento da planta.

Determinar qual ou quais dos genes possuem maior contribuição na expressão da resistência à antracnose do colmo em linhagens endogâmicas de milho tropical.

Estabelecer a partir dos dados da expressão gênica diferencial o momento que a fonte de resistência L04-2 ativa os mecanismos de defesa, com pico máximo de expressão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PODRIDÕES DA BASE DO COLMO EM MILHO

Ao longo das últimas décadas vem sendo observado um expressivo aumento na incidência e na severidade das podridões da base do colmo no milho, as quais podem ser ocasionadas por um complexo de patógenos. Nos Estados Unidos, os agentes causais das podridões da base do colmo compreendem as seguintes espécies de patógenos: *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis* e algumas espécies do gênero *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. graminearum* e *F. subglutinans*) (BYRNES; CARROL, 1986; GATCH; MUNKVOLD, 2002).

No Brasil, as principais espécies fúngicas relacionadas com as podridões da base do colmo são: *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* e *Fusarium subglutinans*. Entretanto, estudos demonstram que o *C. graminicola* é o agente causal de maior predominância em colmos de milho que apresentam sintomas de podridão (REIS; CASA, 1996; DENTI; REIS, 2001; DENTI; REIS, 2003).

O principal patógeno associado a ocorrência das podridões da base do colmo no milho é o *C. graminicola*, independente do sistema de produção (DENTI; REIS, 2001). Em estudo envolvendo a quantificação de patógenos relacionados com as podridões da base do colmo, Denti e Reis (2003), relataram a predominância do *C. graminicola* em 62,6% dos colmos, coletados nas regiões do Planalto Médio Gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná, na safra de 1997/98. Além disso, na safra 2006/07, estimativas evidenciaram que o *C. graminicola* teve predominância em mais de 62% das plantas que apresentavam sintomas de podridão da base do colmo (COSTA et al., 2008).

Entre os fatores que afetam a incidência da podridão da base do colmo no milho, o genótipo apresenta grande influência, visto que ao avaliar o desempenho de diferentes híbridos quanto à incidência de *C. graminicola*, em cultivo de segunda safra no Oeste do Paraná, Rosset et al. (2013) observaram que alguns híbridos não apresentaram sintomas da podridão da base do colmo, enquanto que o híbrido P3646HX evidenciou sintomas em 100% das plantas avaliadas, acarretando numa significativa redução da produtividade.

O *C. graminicola* é o agente causal predominante das podridões da base do colmo, uma vez que os níveis médios de incidência desse patógeno variaram de 26,3 a 62,5% em genótipos avaliados durante três safras agrícolas. Além disso, nos genótipos mais suscetíveis,

o patógeno encontrava-se amplamente distribuído ao longo de toda a extensão do colmo, ocasionando a morte prematura da planta (COSTA et al., 2010).

Dentre os agentes causais das podridões da base do colmo, o *C. graminicola* se destaca por ser considerado o mais agressivo, pois, além de infectar o colmo, pode atacar outras partes da planta, independente do estágio de desenvolvimento, promovendo reduções significativas na produtividade. Na década de 70, nos Estados Unidos, as reduções no rendimento de grãos, decorrentes da incidência da antracnose do colmo já chegavam a 17% em alguns genótipos. No Brasil, as reduções na produtividade, em média são de 27% nas plantas com sintomas da doença (PERKINS; HOOKER, 1979 apud CALLAWAY; SMITH; COFFMAN, 1992; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; COTA et al., 2009; COTA et al., 2012).

Ao avaliar quatro híbridos de milho com tolerância diferencial ao *C. graminicola*, em duas das principais regiões produtoras de grãos do Estado do Tocantins, Campos et al. (2021), relataram reduções significativas nos componentes de produção, em função da inoculação das plantas com o patógeno. A inoculação no estágio de pré-pendoamento reduziu de 6 a 8% o tamanho das espigas, e de 20 a 23% a massa das mesmas. Além do mais, induziu a uma perda de 20 a 25% na produção de grãos por espiga.

Essas reduções significativas nos componentes de produção, causadas pela podridão do colmo, ocorrem em função da colonização e da degradação dos feixes vasculares por parte do *C. graminicola*, o que restringe severamente a translocação de água e nutrientes para a parte aérea da planta. Tal comprometimento leva a uma significativa redução no crescimento da planta, podendo causar morte prematura. Adicionalmente, é possível que ocorra o quebramento do colmo, resultando em perda considerável na produtividade (BANDARA et al., 2019; COSTA et al., 2019).

Perdas de produtividade foram relatadas por Matiello et al., 2013, ao avaliar um híbrido suscetível à podridão do colmo causada pelo *C. graminicola*, sob diferentes condições ambientais. As reduções na produtividade foram de 16,1 e 20,2%, na primeira e segunda safra, respectivamente. Contudo, a magnitude dos danos ocasionados pela incidência do *C. graminicola* está diretamente relacionada ao estágio de desenvolvimento da planta no momento da infecção, uma vez que infecções mais precoces, em torno do estágio vegetativo V8, resultam na morte prematura da planta e na redução da massa da espiga, em função do patógeno interferir no metabolismo do colmo da planta por um maior período de tempo (COSTA et al. 2010; MATIELLO et al., 2013).

Outro fator que contribui para o aumento da severidade das podridões da base do colmo no milho, é a alteração no balanço da distribuição de carboidratos na planta, visto que

durante a fase de enchimento dos grãos, a intensa translocação dos carboidratos do colmo para a espiga é intensificada, resultando num enfraquecimento dos tecidos do colmo, tornando-o mais suscetível ao ataque dos patógenos (REIS; CASA, 1996).

Segundo Blum et al. (2003), quanto maior a precocidade de um híbrido, maior é a sua suscetibilidade às podridões da base do colmo, uma vez que híbridos mais precoces apresentam menor área foliar e, portanto, maior é a contribuição do colmo no suprimento de fotoassimilados para o enchimento dos grãos. Além disso, a população de plantas também afeta a incidência das podridões da base do colmo no milho, visto que quanto maior a densidade de sementeira, maior a incidência de doenças causadas por *F. moniliforme*, *C. graminicola* e *S. maydis* (SANGOI et al., 2000).

No Brasil, a incidência e a severidade das doenças que acometem a cultura do milho vêm aumentando significativamente nos últimos anos, em função das alterações climáticas, das mudanças no sistema de cultivo e na época de sementeira, além da expansão das fronteiras agrícolas (PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006; COTA et al., 2013).

A ampla adoção do sistema de plantio direto, associado à ausência da rotação de culturas, favorecem o aumento da incidência e da severidade das podridões da base do colmo no milho, principalmente aquela causada pelo *C. graminicola*, devido à capacidade desse patógeno sobreviver nos restos culturais por longo período. Adicionalmente, a incidência e a severidade das podridões da base do colmo podem ser significativamente maiores quando o cultivo do milho de segunda safra é realizado sobre áreas de plantio direto com ausência de rotação de culturas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000; FERREIRA; CASELA, 2001; BARBOSA, 2010).

3.2 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DO *Colletotrichum graminicola*

O fungo *Colletotrichum graminicola* Ces. Wils. é o agente causal da antracnose do milho, conhecido desde 1852. A fase sexual, descrita como forma perfeita, é denominada *Glomerella graminicola* Politis, sendo raramente observada na natureza. Essa fase é caracterizada pela presença de peritécios, no interior dos quais são produzidas ascas cilíndricas a clavadas, que contém ascósporos hialinos e unicelulares (CASELA; FERREIRA, 1998; FERREIRA; CASELA, 2001).

Na fase assexual, ou forma imperfeita, o *C. graminicola* produz frutificações denominadas de acérvulos, caracterizados pelo formato oval a cilíndrico, e pela coloração escura. Esses acérvulos geralmente são produzidos no centro das lesões, e se formam na

epiderme e nas cavidades subepidérmicas de ambas as faces da folha ou do colmo. No interior dos acérvulos são produzidos os conidióforos, sendo que na parte terminal desses são gerados em grande quantidade os conídios, medindo aproximadamente 30 µm de comprimento e 5 µm de largura. Esses conídios são unicelulares, hialinos, não-septados e falciformes (CASELA; FERREIRA, 1998; FERREIRA; CASELA, 2001).

A viabilidade dos conídios está diretamente ligada com a umidade relativa do ar, podendo permanecer viáveis de semanas a meses, desde que estejam envoltos por uma matriz mucilaginosa composta por proteínas e polissacarídeos. Essa matriz mucilaginosa, além de estar relacionada com a sobrevivência dos conídios, evitando a dessecação dos mesmos, também está associada com a indução da patogenicidade, aumentando a eficiência da germinação e da penetração do patógeno (NICHOLSON; MORAES, 1980; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

O *C. graminicola* apresenta baixa capacidade de sobrevivência no solo, mas pode sobreviver por um longo período em restos culturais ou em sementes infectadas, na forma de micélio ou de conídios. Sob condição de baixa temperatura, em sementes infectadas, o patógeno pode permanecer viável por mais de três anos (WARREN, 1977; FERREIRA; CASELA, 2001).

Os conídios produzidos a partir dos resíduos culturais deixados sobre a superfície do solo são a fonte de inóculo primário para o próximo cultivo, sendo esses disseminados geralmente por curta distância, através de respingos da chuva e do vento. A fonte de inóculo secundário são os esporos oriundos da esporulação das lesões nas folhas, sendo esses responsáveis tanto pelo desenvolvimento de novas lesões foliares, quanto pela infecção do colmo (LIPPS, 1985; 1988; JIRAK-PETERSON; ESKER, 2011).

O sistema plantio direto associado à monocultura do milho, favorecem significativamente o aumento da incidência e da severidade da antracnose do colmo, uma vez que a incidência da doença apresenta relação direta com a quantidade de resíduos culturais que estão acumulados na superfície do solo, e conseqüentemente, com o período de sobrevivência desse patógeno nos restos culturais (BYRNES; CARROL, 1986; JIRAK-PETERSON; ESKER, 2011).

O patógeno pode infectar todos os órgãos da planta, resultando em diferentes sintomas nas raízes, no colmo, nas folhas, na espiga e no pendão. Essa infecção também pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, acarretando geralmente em danos significativos na produtividade e na qualidade dos grãos. A antracnose é favorecida sob condição de elevada temperatura e umidade por longo período, principalmente se ocorrer na fase de plântula ou após o florescimento (FERREIRA; CASELA, 2001; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

A antracnose foliar pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo caracterizada pela formação de lesões escuras sobre o limbo das folhas. Essas lesões apresentam forma variada e podem ter de 0,5 a 1,5 cm de comprimento, podendo ainda apresentar as bordas de forma irregular. Nessas lesões formam-se numerosos acérvulos, facilitando a identificação da doença a campo e em laboratório. Em genótipos que apresentam grande suscetibilidade ao *C. graminicola*, as lesões coalescem e causam a morte prematura das folhas mais velhas, apresentando-se como um sintoma típico da deficiência de nitrogênio (FERREIRA; CASELA, 2001; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

A infecção da nervura central das folhas é caracterizada pela formação de lesões elípticas e alongadas, de coloração escura, sobre as quais são formados os acérvulos. A expressiva formação de acérvulos geralmente resulta na queima das pontas das folhas em forma de V. O controle genético da resistência a infecção da nervura central das folhas é independente da infecção do limbo foliar, logo, a infecção da nervura pode ocorrer em cultivares que não apresentam a infecção no limbo. Quando a infecção da nervura central e do limbo foliar ocorrerem simultaneamente, a severidade dessa doença sobre as folhas pode ser muito maior. A temperatura ótima para o desenvolvimento das lesões foliares do *C. graminicola* é de 30°C, porém, o mesmo também depende da suscetibilidade do genótipo (LEONARD; THOMPSON, 1976; FERREIRA; CASELA, 2001).

Os sintomas da podridão do colmo geralmente tornam-se mais visíveis após o florescimento, durante a maturação fisiológica da planta, e a infecção do colmo pode se dar tanto pela região de junção com as folhas, quanto pelas raízes. A podridão do colmo é caracterizada pela formação, na epiderme, de lesões encharcadas, estreitas, elípticas na vertical ou ovais, que inicialmente apresentam uma coloração marrom-avermelhada e com o passar do tempo tornam-se marrom-escuras a negras, em função da grande quantidade de acérvulos produzidos. O coalescimento dessas lesões resulta na formação de extensas áreas necrosadas de coloração escura-brilhante, fazendo com que o colmo adquira um aspecto de murchamento, com afundamento da epiderme. O tecido interno do colmo apresenta uma coloração marrom-escuro de forma contínua e uniforme, e posteriormente, esse tecido pode desintegrar-se, resultando na morte prematura da planta, e conseqüentemente, no tombamento dessa, em função do quebramento do colmo (FERREIRA; CASELA, 2001; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006).

Outro sintoma típico do *C. graminicola* no milho e que pode ser observado com certa frequência nas lavouras é a seca do ponteiro, conhecido como “top dieback”. Inicialmente, observa-se o murchamento das folhas apicais, as quais adquirem coloração amarela ou

avermelhada, e posteriormente, nos genótipos muito suscetíveis, a parte do colmo localizada acima da espiga, seca totalmente, tornando o colmo mais vulnerável ao quebramento (FERREIRA; CASELA, 2001; COSTA et al., 2008).

3.3 GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO COLMO

A principal estratégia de manejo para a antracnose do colmo é a utilização de cultivares comerciais resistentes, considerando a sua eficiência e economia, além de não trazer riscos ao meio ambiente. Entretanto, a utilização de genótipos com resistência vertical ou raça-específica apresenta limitações, em função da rápida quebra pelo patógeno, devido ao aparecimento ou a introdução de novas raças para as quais os genótipos não têm resistência. Dessa forma, para se obter uma maior capacidade de limitar a incidência e a severidade da antracnose do colmo, é necessário a utilização de genótipos com resistência horizontal, a qual é mais duradoura e estável no campo, em função de exercer baixa pressão de seleção sobre o patógeno, reduzindo a possibilidade de surgimento de novas raças mais virulentas (FERREIRA; CASELA, 2001; GUIMARÃES; COSTA, 2016).

O desenvolvimento de cultivares comerciais resistentes ao *C. graminicola*, ocorre a partir de ciclos de seleção artificial em populações segregantes a campo, através da seleção assistida por marcadores moleculares, e na última década, através de novas ferramentas, como a análise da expressão gênica diferencial (COELHO et al., 2001; FERREIRA; CASELA, 2001; MATIELLO et al., 2012). De certa forma, o que tem reduzido a eficiência da seleção de genótipos resistentes pelos programas de melhoramento, diz respeito à variabilidade patogênica a campo. No Brasil, já foram identificadas cinco raças de *C. graminicola*, a partir da avaliação de 190 isolados monospóricos, oriundos de sete regiões ecogeográficas brasileiras (LIMA; MENEZES, 2002; COSTA et al., 2014).

As espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Colletotrichum* apresentam uma estratégia de infecção hemibiotrófica, dividida em vários estágios. Nesse tipo de infecção, primeiramente o apressório perfura a superfície da célula do hospedeiro, em sequência, hifas biotróficas desenvolvem-se dentro da epiderme das células vivas e finalmente, o patógeno muda para a necrotrofia, produzindo hifas finas de crescimento rápido que matam e destroem os tecidos da planta. O *C. graminicola* apresenta crescimento biotrófico e necrotrófico simultâneo, visto que a fase de biotrofia avança pelas células do hospedeiro na margem da colônia, e o centro da mesma torna-se necrotrófico (PERFECT et al., 1999; MIMS; VAILLANCOURT, 2002).

Segundo Hammerschmidt e Nicholson (1977a), a resistência do milho ao *C. graminicola* está relacionada com o metabolismo fenólico, em decorrência do acúmulo de compostos fenólicos totais nos tecidos da planta, associado à produção de antocianinas, restringir o aumento das lesões.

A resposta geral da resistência foliar ao *C. graminicola* no milho envolve a estimulação da biossíntese de compostos fenólicos, especialmente os ligados a síntese de fenilpropanoides, os quais são precursores da lignina, polímero complexo e extremamente rígido. A primeira evidência da estimulação da síntese de fenilpropanoides foi a identificação da formação de uma papila lignificada na parede externa da célula epidérmica diretamente abaixo do apressório fúngico, formada antes da penetração do patógeno na célula hospedeira. A formação dessas papilas lignificadas nas células circundantes das lesões, representa uma barreira física para o crescimento do fungo, bem como uma barreira química à degradação da parede celular e à expansão da lesão (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980; CADENA-GOMEZ; NICHOLSON, 1987).

Os principais agentes envolvidos na defesa do milho ao *C. graminicola* são os inibidores da poligalacturonase 1 (PGIP), proteínas Barwin, proteínas PR e os metabólitos secundários. A defesa é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno, que são ativados quando esse penetra nos tecidos do hospedeiro, desencadeando a imunidade, a qual varia em diferentes graus, conforme o genótipo infectado (WEIHMANN et al., 2016; MIRANDA et al., 2017).

Ao quantificar a biomassa fúngica em folhas de milho infectadas com *C. graminicola*, Weihmann et al. (2016) não observaram o crescimento do patógeno no genótipo B73 até 72 horas após a infecção, enquanto que no “Golden Jubilee”, o patógeno se encontrava notavelmente desenvolvido. Essa discrepância entre os genótipos de milho evidenciou o sucesso na penetração do patógeno e a ausência de reações de defesa no “Golden Jubilee”.

Folhas e raízes empregam diferentes metabólitos secundários durante a defesa antifúngica, embora os dois tecidos apresentem aumento nos níveis de flavonoides em resposta à infecção pelo *C. graminicola*. Além do mais, os hormônios apresentam significativa contribuição para defesa eficaz contra esse patógeno. Folhas e raízes também diferem quanto às alterações nos níveis hormonais durante a infecção, uma vez que as raízes reagem mais rapidamente à infecção do que as folhas, exibindo mudanças principalmente nos níveis de ácido salicílico, ácido jasmônico e ácido abscísico (BALMER et al., 2013).

O ácido salicílico induz à resistência sistêmica adquirida nas inflorescências após a infecção pelo *C. graminicola*, adicionalmente, as vias de sinalização de ácido jasmônico e

etileno também contribuem para desencadear a resistência. Em raízes inoculadas, a defesa é induzida pelo ácido salicílico e pelo ácido abscísico (MIRANDA et al., 2017).

Durante a fase de crescimento biotrófico do patógeno, o mesmo é incapaz de suprimir muitos dos mecanismos de defesa da planta, que nas folhas estão associados com o acúmulo de compostos antimicrobianos, como fitoalexinas, intermediários de fenilpropanoides e espécies reativas de oxigênio. Contudo, a mudança para o crescimento necrotrófico, que permite com que o patógeno mate o tecido vegetal antes de ser colonizado, evita que o *C. graminicola* entre em contato direto com as respostas de defesa da planta, e continue o desenvolvimento da doença (VARGAS et al., 2012).

A resistência do milho ao *C. graminicola* também está associada com a condição ambiental. Desta forma, em alta intensidade luminosa, há aumento considerável da resistência da planta, reduzindo significativamente a área foliar coberta pelas lesões, independentemente do nível de resistência do genótipo. Portanto, esse fenômeno reforça o envolvimento dos compostos fenólicos com a resistência do milho ao *C. graminicola*, uma vez que esses são essencialmente dependentes de luz (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977b; SCHALL; NICHOLSON; WARREN, 1980; JENNS; LEONARD, 1985; HOLTON; CORNISH, 1995).

Em relação ao controle genético da resistência do milho ao *C. graminicola*, diversos estudos revelaram o envolvimento de um ou poucos genes de efeito genético predominantemente aditivo, os quais possuem grande efeito na expressão fenotípica, podendo representar mais de 90% da variação total, embora, também tem sido relatado resistência por um ou poucos genes com efeito dominante (CARSON; HOOKER, 1981; BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM, 1987; TOMAN JÚNIOR; WHITE, 1993; JUNG et al., 1994; MATIELLO; MÁXIMO; COELHO, 2021).

Através de cruzamentos dialélicos, Lim e White (1978) relataram a predominância de genes com efeito aditivo e alguns com dominância parcial para a resistência à antracnose do colmo, sugerindo que o cruzamento entre linhagens resistentes à antracnose foliar e ao colmo, resultaria em híbridos resistentes às duas doenças causadas pelo *C. graminicola* neste patossistema.

Ao estudar a resistência à antracnose do colmo em linhagens endogâmicas de milho tropical, Matiello et al. (2012) observaram modo de herança distinto entre duas populações desenvolvidas a partir de duas linhagens consideradas resistentes à antracnose do colmo (DAS21 e DAS64) e outra suscetível (DAS86). Na população DAS86 x DAS21 foi observado o predomínio de efeitos genéticos dominantes para a resistência, e valores intermediários de herdabilidade, indicando herança complexa, provavelmente condicionada por vários genes de

pequeno efeito genético. Por outro lado, na população DAS86 x DAS64 houve predomínio de efeitos genéticos aditivos, revelando o envolvimento de poucos genes no controle da resistência.

Para Badu-Apraku, Gracen e Bergstrom (1987), o controle genético da resistência do milho à antracnose do colmo se dá por um único gene de efeito dominante. Da mesma forma, Coelho et al. (2001) ao estudar a herança utilizando linhagens e híbridos, demonstraram herança monogênica com dominância completa para a resistência à antracnose foliar.

Mesmo que a esporulação das lesões foliares seja fonte de inóculo para a infecção do colmo, a resistência à antracnose foliar é independente da resistência ao colmo, sugerindo que diferentes mecanismos de resistência estejam envolvidos nas duas fases. Tanto a resistência à antracnose foliar quanto a do colmo, são controladas por um ou poucos genes de grande efeito, ou por vários genes de pequeno efeito aditivo. Entretanto, a especificidade da expressão da resistência ainda é pouco conhecida (LIM; WHITE, 1978; CARSON; HOOKER, 1981; BADU-APRAKU; GRACEN; BERGSTROM 1987; TOMAN JÚNIOR; WHITE, 1993; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999; COELHO et al., 2001).

Com relação ao número de genes responsáveis pelo controle da resistência à antracnose do colmo, existe na literatura uma grande divergência de informações. Carson e Hooker (1982) localizaram genes de resistência nos braços longos dos cromossomos 1, 4 e 8, e em ambos os braços do cromossomo 6. Ao utilizar o marcador molecular RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), Jung et al. (1994) localizaram uma única região genômica no cromossomo 4, com forte associação a um loco de resistência quantitativa (QRL), responsável por mais de 50% da variação fenotípica para a resistência à antracnose do colmo.

Ao mapear genes de resistência à antracnose do colmo em linhagens endogâmicas de milho tropical, Matiello (2004) identificou vários QRLs, associados a alelos de resistência, nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, os quais explicaram de 2,1 a 14,7% da variação fenotípica presente na população de mapeamento.

Ao estudar o controle genético da resistência à antracnose do colmo, a partir da avaliação das gerações descendentes de nove cruzamentos, realizados entre seis linhagens contrastantes de milho tropical, incluindo as linhagens L04-2 e L99-4, Matiello, Máximo e Coelho (2021) observaram um modo de herança muito semelhante entre as famílias. Com relação ao comprimento interno das lesões, a variância decorrente dos efeitos aditivos explicou entre 85,1 a 98,07% da variação observada entre as famílias, sendo que das nove famílias analisadas, sete exibiram efeitos genéticos aditivos superiores a 90%. Além disso, em relação ao número de internódios descoloridos, as famílias derivadas da fonte de resistência L04-2 apresentaram variância decorrente dos efeitos aditivos de 98,1%, enquanto que nas famílias

derivadas das linhagens resistentes L03-2 e L23-1, os efeitos aditivos explicaram 93,45 e 94,25%, respectivamente.

A partir dos parâmetros genéticos estimados para o conjunto de linhagens de milho tropical, Matiello, Máximo e Coelho (2021) afirmaram que o controle genético da resistência do milho ao *C. graminicola* é oligogênico, com uma média global de 2,6 genes, independente da forma de avaliação da doença e da fonte de resistência utilizada. Desta forma, a prevalência da ação gênica aditiva, associada ao pequeno número de genes que controlam a resistência, e aos elevados coeficientes de herdabilidade no sentido restrito, evidenciam uma condição muito favorável aos programas de melhoramento, em função da facilidade na identificação e na seleção de genótipos, aumentando a frequência de alelos de resistência à antracnose do colmo nas populações sob efeito da seleção.

Ao mapear regiões genômicas associadas à alelos de resistência quantitativa à antracnose do colmo em milho tropical, a partir de um conjunto de 121 progêneses F_{2:3}, oriundas do cruzamento entre as linhagens L04-2 e L99-4, caracterizadas como resistente e suscetível à antracnose do colmo, respectivamente (TORRECIJA, 2012), Tasiar (2014) mapeou 31 QRLs em diferentes regiões genômicas dos 10 cromossomos de milho, contudo, a maioria dos QRLs mapeados foram dependentes do ambiente e ou da forma de quantificação da doença, embora o QRL mapeado no cromossomo 1 tenha se apresentado altamente estável. Em função do grande número de QRLs mapeados, o autor sugere que a herança da resistência no germoplasma estudado é complexa, provavelmente condicionada por um grande número de genes, sendo alguns de grande efeito fenotípico e a grande maioria com pequenos efeitos para resistência à antracnose do colmo.

Em estudo envolvendo um único gene de resistência à antracnose do colmo, através da avaliação de quatro combinações híbridas quase isogênicas para a presença ou ausência do gene *Rcg1*, Frey et al. (2011) observaram que a presença desse gene reduziu consideravelmente o impacto negativo da infecção pelo *C. graminicola*, conferindo produtividade 13% superior em relação aos híbridos que não possuíam o gene. Adicionalmente, a presença do *Rcg1* reduziu consideravelmente as lesões na parte externa do colmo, atrasando também o desenvolvimento da doença na parte interna. Desta forma, os efeitos positivos do *Rcg1* sugerem que pode haver uma redução na contribuição de inóculo primário nos restos culturais para a safra seguinte, reduzindo as chances do patógeno se adaptar ao gene, conferindo resistência mais durável a campo.

3.4 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

O estudo da expressão dos genes que são responsáveis pela síntese de proteínas que estão associadas à resistência do milho à antracnose do colmo é de extrema importância, e as abordagens genômicas contribuem consideravelmente para compreender a cascata de sinais que acontecem em plantas infectadas pelo *C. graminicola*. A expressão de um gene pode ser obtida a partir de uma pequena quantidade de mRNA, e os níveis de expressão variam drasticamente de gene para gene, de célula para célula, ou sob condições experimentais variadas. As tecnologias de análise de expressão gênica diferencial são de grande importância em estudos comparativos de processos biológicos, sendo a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), uma das tecnologias mais aplicadas. Essa técnica apresenta uma grande especificidade e sensibilidade, além de ser facilmente reproduzível, permitindo uma análise precisa dos transcritos de genes em diferentes tecidos (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; QUEIROZ, 2010).

De acordo com Nolan, Hands e Bustin (2006), a RT-qPCR é uma combinação de três passos: (i) a conversão do RNA em DNA complementar (cDNA), por meio da transcrição reversa, (ii) a amplificação do cDNA utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e (iii) a quantificação da amplificação dos produtos de expressão de genes em tempo real. Essa quantificação ocorre a partir de moléculas fluorescentes, covalentemente ligadas ou não à nucleotídeos, que são incluídas na reação (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004).

A técnica de RT-qPCR é caracterizada por três fases principais: fase exponencial, linear e platô. A dinâmica dessas fases consiste basicamente numa sucessão de ciclos de amplificação, no qual o ácido nucleico molde (*template*) é desnaturado, anelado com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos e estendido para gerar uma cadeia complementar, utilizando uma DNA polimerase termoestável. Cada ciclo de amplificação resulta num aumento exponencial dos produtos da amplificação (*amplicons*), os quais podem ser monitorados em tempo real, utilizando um repórter fluorescente. O aumento na fluorescência correlaciona-se com a quantidade original de molde (*template*), e essa fluorescência é detectada a cada ciclo de amplificação e plotada num gráfico, gerando uma curva de amplificação. Adicionalmente, nesse gráfico também é definida uma linha de limiar (*threshold line*), a qual determina o limiar de detecção, ou seja, o número mínimo de ciclos para que a amplificação seja considerada estatisticamente significativa (POSTOLLEC et al., 2011; LOBO; LOBO, 2014).

O número do ciclo ao nível do limiar de fluorescência é denominado de ciclo de quantificação (Cq), e sintetiza os resultados da RT-qPCR, pois está diretamente relacionado com o número de moldes na amostra do mRNA. Quanto maior o número de moldes no início da reação, menor é o número de ciclos de amplificação necessário para que o sinal de fluorescência seja primeiramente reconhecido como estatisticamente significativo, ou seja, esteja acima de um limiar arbitrário (*threshold*) (LOBO; LOBO, 2014).

O sucesso na aplicação da técnica de RT-qPCR depende da normalização adequada dos dados mensurados. Nesse sentido, é necessário que se tenha uma atenção especial na quantidade inicial de amostra utilizada (mRNA), na padronização da síntese de cDNA, no modelo matemático para análise dos dados e na escolha do gene de referência (UDVARDI; CZECHOWSKI; SCHEIBLE, 2008).

Os genes de referência ou genes normalizadores, são responsáveis por funções essenciais no metabolismo primário, ou seja, na manutenção da estrutura e do funcionamento celular. Esses genes apresentam transcritos que mostram uma expressão uniforme na grande maioria das células do organismo, assim como, durante todos os estádios de desenvolvimento da planta e mesmo sob condições ambientais distintas (QUEIROZ, 2010).

Atualmente, encontram-se descritos na literatura alguns genes de referência, candidatos para serem utilizados em estudos de expressão gênica para a cultura do milho. Ao analisar o padrão de expressão de doze genes, em amostras oriundas de diferentes tecidos, de plantas cultivadas em condição ambiental distinta, Manoli et al. (2012) observaram que os genes *CUL*, *FPGS*, *LUG*, *MEP* e *UBCP* exibiram a maior estabilidade na expressão, de acordo com os algoritmos utilizados (*genormPLUS*, *NormFinder* e *BestKeeper*), sendo considerados confiáveis para conduzir experimentos de RT-qPCR em milho.

Ao analisar a expressão dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1*, relacionados com a tolerância do milho ao alumínio, Coelho et al. (2021) verificaram que em amostras de raízes, oriundas de híbridos e variedades crioulas de milho tropical, os genes *LUG*, *MEP*, *CUL* e *FPGS* apresentaram uma maior estabilidade de expressão, de acordo com os algoritmos *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004) e *BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004), sendo ideais para serem utilizados como genes normalizadores em reações de RT-qPCR para a cultura do milho.

A expressão relativa de um gene alvo em relação a um gene de referência, é a base da quantificação relativa, a qual pode ser realizada a partir dos valores de Cq. Na quantificação relativa, os genes de referência são utilizados para normalizar os dados da RT-qPCR, pois reduzem os possíveis erros gerados na quantificação da expressão dos genes, oriundos da

quantidade e da qualidade do mRNA molde (*template*), e da eficiência da transcrição reversa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001; CHEN; FESSEHAIE; ARORA, 2012).

A quantificação relativa de um gene alvo em comparação com um gene de referência pode ser determinada a partir do método Cq comparativo, ou também conhecido como método $\Delta\Delta Cq$ ou $2^{-\Delta\Delta Cq}$, proposto por Livak e Schmittgen (2001). Esse método é baseado na razão da expressão relativa, onde se compara os níveis de expressão dos genes entre dois grupos biológicos (STEIBEL et al., 2009).

3.5 EXPRESSÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

Em estudo de expressão diferencial de genes de resistência ao *C. graminicola* no milho, Balmer et al. (2013) verificaram que folhas e raízes apresentaram um padrão de expressão local muito semelhante, contudo, a indução de genes de defesa nas raízes foi mais rápida do que nas folhas. Conforme os autores, a rapidez na ativação de genes de defesa nas raízes fez com que o patógeno não progredisse para a fase de necrotrofia, fazendo com que o seu crescimento biotrófico ficasse muito mais restrito. Por outro lado, observaram que nas folhas os níveis de transcrição do gene de defesa *PR1* foram cem vezes mais altos do que nas raízes, sugerindo que o sistema radicular possua um estado de defesa basal constitutivamente elevado, bloqueando a entrada de patógenos tão rapidamente que nenhuma indução importante de genes de defesa seja possível e ou que a resposta de defesa da planta possa ser ativamente suprimida pelo patógeno.

Através de RT-PCR semiquantitativa e sob condições de infecção local e sistêmica, Miranda et al. (2017) avaliaram a expressão de genes de defesa do milho ao *C. graminicola* nas raízes e nas inflorescências masculina e feminina, e observaram que a indução de resistência sistêmica adquirida em inflorescências femininas envolveu principalmente o acúmulo de genes de defesa induzíveis por ácido salicílico (*ZmNAC*, *ZmHSF*, *ZmWRKY*, *ZmbZIP* e *PR1*) e genes envolvidos na modificação da cromatina.

Tanto as folhas quanto as raízes do milho possuem a capacidade de desencadear resistência antifúngica sistêmica em tecidos distais que ainda não foram infectados, uma vez que a infecção radicular por *C. graminicola* ativa a expressão maciça de genes nas folhas, aumentando o acúmulo de ácido salicílico e ácido jasmônico (BALMER et al., 2013).

As proteínas relacionadas a patogênese da família 1 (PR-1) vêm sendo caracterizadas em diversos estudos por apresentarem efeito inibitório sobre os patógenos fúngicos em diversas culturas. Em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi) para o gene *PR-1a*,

Alexander et al. (1993), relataram que a transgenia conferiu às plantas maior resistência aos agentes causais do mofo azul (*Peronospora tabacina*) e da haste preta (*Phytophthora parasitica* var. *nicotinae*). Nesse trabalho, os autores destacaram que a natureza exata da resistência às doenças fornecida pela expressão constitutiva do gene *PR-1a* era desconhecida, uma vez que a proteína poderia exercer efeito fungicídico direto, explicando a diminuição no desenvolvimento das doenças em plantas transgênicas, ou então, poderia retardar o estabelecimento dos patógenos. Adicionalmente, a proteína ainda poderia auxiliar no reconhecimento dos mesmos, permitindo que a planta ativasse respostas de defesa adicionais, limitando o progresso das doenças.

Ao isolarem três proteínas (P14a, P14b e P14c) a partir de folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. baby) infectadas com *Phytophthora infestans*, e quatro proteínas (PR-1a, PR-1b, PR-1c e PR-1g) a partir de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* Samsun NN) infectadas com vírus, Niderman et al. (1995) observaram através de experimentos *in vitro* e *in vivo*, que essas proteínas pertencentes à família de genes *PR-1*, apresentavam atividade antifúngica diferencial contra o patógeno *P. infestans*. As proteínas P14c e PR-1g demonstraram maior eficiência na inibição da germinação de zoósporos e na redução da área foliar infectada pelo patógeno.

Para Rauscher et al. (1999), a proteína PR-1 condicionou às folhas de fava (*Vicia faba*), resistência à ferrugem (*Uromyces fabae*), em função da mesma ter desencadeado mecanismos que resultaram na inibição do desenvolvimento das hifas de infecção desse patógeno.

Ao avaliar a funcionalidade da proteína PR-1b na resistência ao oídio (*Blumeria graminis*) e demais patógenos que incidem na cultura da cevada (*Hordeum vulgare* L.), através do silenciamento da expressão do gene *PR-1b*, Schultheiss et al. (2003) relataram que a proteína PR-1b contribuiu para a resistência à penetração do oídio. Além do mais, a expressão do *PR-1b* correlacionou-se com a produção de peróxido de hidrogênio, em resposta ao oídio e a mancha marrom da cevada (*Bipolaris sorokiniana*).

Segundo Van Loon, Rep e Pieterse (2006), os genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PRs) compreendem uma família ampla e evolutivamente conservada, com genes que diferem quanto à ocorrência e à atividade desenvolvida. Esses genes, provavelmente são originados de um ancestral em comum, o qual se diversificou para atender diferentes funções. Os genes *PRs* codificam proteínas de defesa, perante a infecção de algum patógeno, sendo a indução desses genes regulada por hormônios de defesa, como o ácido salicílico, o ácido jasmônico e o etileno. Além de desempenharem papel importante na

atenuação dos efeitos da infecção por patógenos nas plantas, as proteínas PRs também atuam sob a incidência de pragas e determinados estresses abióticos.

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas que catalisam a oxigenação de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linoleico e ácido linolênico, sendo categorizadas como 9-LOX ou 13-LOX, dependendo de qual carbono está sendo oxigenado. As oxilipinas derivadas de LOX desempenham papéis fundamentais no crescimento, no desenvolvimento e na defesa das plantas contra pragas e doenças, sendo produzidas em resposta a uma variedade de estresses bióticos e abióticos. Os danos físicos que ocorrem nas células durante um estresse, podem resultar na degradação dos ácidos graxos poli-insaturados, mediada pelas lipoxigenases. Essa peroxidação resulta na produção de um hidroperóxido de ácido graxo, o qual é rapidamente metabolizado para produzir diversos elementos de sinalização ou moléculas que possuem atividade antimicrobiana e ou inseticida. As vias biossintéticas mais bem estudadas das LOXs, são aquelas que levam a produção de ácido jasmônico e voláteis de folhas verdes, os quais são conhecidos por auxiliar as plantas a se defenderem contra estresses bióticos e abióticos. Entretanto, o papel específico de cada isoforma de LOX ainda não está totalmente esclarecido (FEUSSNER; WASTERNAK, 2002; YAN et al., 2012).

Alguns estudos demonstram que a deleção das enzimas LOX no milho, influenciam o desenvolvimento das plantas, através da resistência ou suscetibilidade a patógenos. Em estudo envolvendo o gene *ZmLOX3*, uma isoforma 9-LOX, Gao et al. (2007) observaram que os mutantes *lox3* apresentaram alta resistência à infecção por *Fusarium verticillioides* no colmo. Adicionalmente, observaram que o bloqueio desse gene reduziu drasticamente a produção de fumonisina em grãos infectados por *F. verticillioides*. Segundo Christensen et al. (2014), o gene *ZmLOX12*, uma isoforma 9-LOX, desempenha um papel fundamental na resistência do milho ao *F. verticillioides*, dado que a interrupção de *ZmLOX12* causou diminuição significativa na resistência do mesocótilo. Constataram também, que os grãos dos mutantes *lox12* foram fortemente colonizados por *F. verticillioides*, acumulando maiores níveis de fumonisina B1, e os colmos apresentaram maior incidência e severidade da podridão de Fusarium. Deste modo, concluíram que, enquanto algumas lipoxigenases de isoforma 9-LOX facilitam a patogenicidade fúngica, contribuindo para a suscetibilidade, outras desempenham papel fundamental na defesa de diversos órgãos no milho contra a infecção por *F. verticillioides*.

De acordo com Balmer et al. (2013), no milho a via lipoxigenase (LOX) está mais envolvida na infecção foliar do que na infecção radicular por *C. graminicola*, uma vez que sob infecção local, o gene *LOX1* foi apenas regulado positivamente nas folhas. Somado a isso, a

infecção das raízes, desencadeou resposta sistêmica positiva nas folhas, por meio da indução do gene *LOX5*.

Os inibidores de Bowman-Birk (BBI) pertencem às famílias mais estudadas de inibidores de protease, destacando-se no grupo das serino proteases, os inibidores de tripsina e quimotripsina. A síntese dessas proteínas pode ser induzida por infecção ou fermento, sendo que as mesmas desempenham papel fundamental na defesa das plantas, em função de conferirem resistência a uma diversidade de pragas e doenças. Para facilitar a penetração e a infecção, o patógeno é capaz de produzir enzimas proteolíticas, as quais podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular do hospedeiro. Por outro lado, as células do hospedeiro podem produzir inibidores de proteinases, capazes de suprimir a atividade enzimática dos microrganismos fitopatogênicos (RYAN, 1990; TREMACOLDI, 2009).

Ao estudar os inibidores da família Bowman-Birk em feijão (*Phaseolus vulgaris*), Mosolov et al. (1976) observaram que os inibidores suprimiram o crescimento de hifas e a germinação de conídios de *Fusarium solani*, *F. culmorum* e *Botrytis cinerea*. Ao subclonar o cDNA de um inibidor de tripsina de milho, em um vetor de superexpressão de *Escherichia coli*, Chen et al. (1999) observaram que o inibidor de tripsina foi capaz de inibir a germinação de conídios e o crescimento de hifas de vários fungos fitopatogênicos, dentre eles: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *Fusarium moniliforme*.

Ao avaliar a expressão diferencial de genes de resistência ao *C. graminicola* no milho, Balmer et al. (2013) observaram que sob infecção local, o gene *BB*, um inibidor de tripsina serina Bowman-Birk, foi regulado positivamente nas raízes e nas folhas, porém, as raízes apresentaram resposta mais rápida. Não obstante, constataram que a infecção radicular também desencadeou resposta sistêmica nas folhas, regulando positivamente a expressão do gene *BB*.

O gene *WIP1* do milho codifica uma proteína inibidora de Bowman-Birk (BBI), e sua expressão é induzida por fermento ou infecção, conferindo de maneira geral às plantas, resistência a pragas e doenças. Em contraste com a maioria dos inibidores de Bowman-Birk, o gene *WIP1* é fortemente induzido por fermentos ou infecções, e sua indução é muito rápida, podendo ocorrer de forma sistêmica em tecidos que não foram feridos ou infectados (ROHRMEIER; LEHLE, 1993).

Assim como para o gene *BB*, Balmer et al. (2013) também observaram que o gene *WIP1* foi altamente induzido em folhas e raízes inoculadas com *C. graminicola*, e que as raízes responderam mais rapidamente do que as folhas. Somado a isso, a inoculação das raízes com o patógeno desencadeou rápida e alta expressão do gene *WIP1* nas folhas.

O ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC) é sintetizado a partir de S-adenosil-L-metionina (SAM), por enzimas ACC sintases (ACSs), e posteriormente, oxidado a etileno, por enzimas ACC oxidases (ACOs) (ADAMS; YANG, 1979). O gene 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO) codifica a enzima ACC oxidase e dessa forma, atua diretamente na regulação da biossíntese de etileno (POLKO; KIEBER, 2019). Esse hormônio regula muitos processos fisiológicos essenciais ao longo do ciclo de vida das plantas, desempenhando papel importante na defesa contra estresses bióticos e abióticos (LIN; ZHONG; GRIERSON, 2009; VAN DE POEL; SMET; VAN DER STRAETEN, 2015). As enzimas ACOs são codificadas por uma pequena família multigênica, composta geralmente de três a quatro membros. No milho, a família de genes ACO é representada pelos genes *ZmACO15*, *ZmACO20*, *ZmACO31* e *ZmACO35* (GALLIE; YOUNG, 2004).

Ao avaliar a expressão do gene *NBACO1* em tabaco selvagem (*Nicotiana benthamiana*), Shan e Goodwin (2006) observaram um expressivo aumento dos níveis de *NBACO1* nas folhas, após a inoculação com *Colletotrichum orbiculare*. Ao silenciar o gene *NBACO1*, observaram que o mesmo não é apenas induzível pela incidência do patógeno, mas também desempenha papel importante no aparecimento da fase de necrotrofia durante o desenvolvimento da infecção fúngica.

Ao estudar o efeito do gene *ZmLOX3* na resistência do milho ao nematoide de galhas (*Meloidogyne incognita*), Gao et al. (2008) observaram que o gene ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) oxidase (*ACO31*), foi expresso em um nível muito alto nas raízes dos mutantes *lox3-4*, enquanto os transcritos desse gene estavam abaixo do nível de detecção na linhagem do tipo selvagem. Em contraste com as raízes, nenhuma diferença nos níveis de mRNA de *ZmACO31* foi encontrada entre folhas do tipo selvagem e dos mutantes, sugerindo que a ruptura de *ZmLOX3*, resultou em uma superexpressão específica de *ZmACO31* nas raízes. Além disso, o etileno foi produzido em níveis significativamente mais altos nas raízes dos mutantes em relação ao tipo selvagem, sugerindo que o aumento da atratividade e da suscetibilidade do mutante *lox3-4* ao nematoide de galhas (*Meloidogyne incognita*), pode ser devido à elevada biossíntese de etileno.

Dentre os genes que estão envolvidos com a biossíntese de etileno, Balmer et al. (2013) observaram que o gene *ACO31* foi induzido tardiamente tanto nas folhas, quanto nas raízes, como uma resposta local à infecção por *C. graminicola*. Além disso, a inoculação de uma única folha, desencadeou rapidamente resposta sistêmica em folhas não inoculadas, através de uma baixa expressão do gene *ACO31*.

A superfamília do citocromo P450 (CYP) desempenha um papel vital na promoção do crescimento e do desenvolvimento das plantas, além de atuar na proteção das mesmas contra estresses bióticos e abióticos, por meio de múltiplas vias biossintéticas e de desintoxicação (OHKAWA et al., 1998). A família do citocromo P450 está envolvida na biossíntese de fitoalexinas, no metabolismo hormonal e na biossíntese de demais metabólitos secundários (HEITZ et al., 2012). Embora o gene do citocromo P450, *CYP94B12*, localizado no cromossomo 2 do milho ainda não tenha sido categorizado, membros da família CYP94 em *Arabidopsis* exercem controle negativo nos níveis de ácido jasmônico, visto que as folhas do mutante *cyp94b3* feridas por insetos apresentaram hiperacumulação desse hormônio (KOO; COOKE; HOWE, 2011; AUBERT et al., 2015). Estudos indicam que o ácido jasmônico desempenha papel fundamental na defesa precoce do trigo (*Triticum aestivum*) e da cevada (*Hordeum vulgare*) contra *F. graminearum* (CHEN et al., 2009; ZHANG et al., 2013). Mutantes em pimenta (*Capsicum annuum* L. cv. nockwang) para o gene *CYP94B*, foram mais suscetíveis a *Pseudomonas syringae*, patógeno bacteriano com estilo de vida semelhante ao *F. graminearum* (HWANG; HWANG, 2010).

O gene *CytP450* foi regulado positivamente em folhas e raízes de milho inoculados com *C. graminicola*. Além disso, a inoculação das raízes também ativou uma defesa antifúngica sistêmica nas folhas, regulando positivamente a expressão desse gene (BALMER et al., 2013).

As lectinas são proteínas antimicrobianas que desempenham um papel importante no mecanismo de defesa das plantas contra diversos microrganismos fitopatogênicos. Tal fato é atribuído que tanto as lectinas, quanto as proteínas com um ou mais domínios de lectinas, representem a maior parte dos receptores imunes intracelulares e de superfície celular, que auxiliam as plantas na percepção de estruturas microbianas conservadas e de padrões moleculares associados a danos, os quais são produzidos no apoplasto, como consequência da entrada de patógenos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LANNOO; VAN DAMME, 2014).

Muitas lectinas são expressas constitutivamente em grandes quantidades, em sementes e tecidos de armazenamento, onde desempenham papel fundamental na defesa. Todavia, pequenas quantidades de lectinas específicas são expressas como resposta particular a estresses ambientais e ataque de patógenos. As lectinas possuem a capacidade de se ligar a glicoconjugados de outros organismos, possuindo alta afinidade por oligossacarídeos, que são incomuns ou totalmente ausentes em plantas (LANNOO; VAN DAMME, 2010; 2014). Ao isolar lectinas a partir de sementes de pitomba (*Talisia esculenta*), Freire et al. (2002) observaram que as mesmas inibiram o crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae*. De forma semelhante, lectinas obtidas de

sementes de ervilha (*Pisum sativum*) inibiram o desenvolvimento de *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride* e *Fusarium oxysporum* (SITOHY; DOHEIM; BADR, 2007).

Ao avaliar duas linhagens endogâmicas de milho contrastantes para a resistência à podridão da espiga, causada por *Fusarium graminearum*, Kebede et al. (2018) observaram que um gene que codifica para uma proteína contendo domínio beta de lectina (GRMZM2G076343), teve maior indução na linhagem resistente (CO441), apresentando nível máximo de expressão em quatro dias após a inoculação das espigas.

De acordo com Zuo et al. (2015), o nível de expressão de um gene de resistência pode variar conforme o tecido da planta, e a expressão pode ocorrer em estádios de desenvolvimento específicos. Ao avaliar a expressão basal do gene *ZmWAK*, o qual está ligado a um dos principais QRLs do milho ao carvão do pendão (*Sporisorium reilianum*), observaram que nas plântulas da linhagem resistente Ji1037, o nível de expressão no mesocótilo foi cerca de 10 vezes superior ao das folhas e raízes. Em contrapartida, em plantas no estágio de pré-pendoamento, o gene *ZmWAK* foi expresso principalmente no primeiro internódio do colmo acima da superfície do solo e na folha bandeira.

As plantas possuem um conjunto complexo de mecanismos de defesa que atuam contra o ataque de patógenos. As respostas de defesa de diferentes genótipos de milho ao *C. graminicola* e aos demais fungos patogênicos hemibiotróficos que incidem na cultura, até certo ponto são semelhantes, uma vez que envolvem a indução dos genes que codificam para proteínas relacionadas à patogênese (PR), proteínas inibidoras de Bowman-Birk e proteínas antimicrobianas de percepção (lectinas). Além do mais, também incluem a ativação de genes que codificam para enzimas que atuam na peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados (LOX), e o aumento na expressão de genes que estão envolvidos no metabolismo hormonal (etileno e ácido jasmônico), e na biossíntese de fitoalexinas e demais metabólitos secundários.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As linhagens endogâmicas que foram utilizadas neste estudo (L04-2 e L99-4), pertencem ao Programa de Melhoramento Genético de milho da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, sendo a L04-2, caracterizada como resistente à antracnose do colmo (Figura 1A), e a L99-4, suscetível (Figura 1B). Essas linhagens endogâmicas da geração S₆ são oriundas de ciclos continuados de autofecundação de uma população de base genética ampla de milho (germoplasma tropical), composta inicialmente por trinta e cinco variedades de milho crioulo. As duas linhagens foram caracterizadas em estudos prévios para a resistência e ou suscetibilidade à antracnose do colmo (TORRECIJA, 2012; MATIELLO; MÁXIMO; COELHO, 2021) e para a antracnose foliar (PROCHNO et al., 2016).



Figura 1 - Lesão interna da antracnose do colmo (*C. graminicola*) na linhagem resistente (L04-2) (A) e suscetível (L99-4) (B). Fonte: Máximo (2013).

O estudo foi desenvolvido em duas condições ambientais distintas (câmara de crescimento e casa de vegetação), e com inoculação das plantas das linhagens L04-2 e L99-4 com o patógeno, em dois estádios de desenvolvimento (V6 e VT). O primeiro experimento foi

conduzido em câmara de crescimento sob ambiente controlado (UR = 60%; temperatura média diurna de 25°C e noturna de 20°C; fotoperíodo de 12 horas, sob intensidade luminosa de aproximadamente 0,2 cal cm⁻² min⁻¹), inoculando as plantas no estágio vegetativo V6 (Figura 2A), quando as plantas apresentavam a sexta folha completamente expandida (HANWAY, 1966).

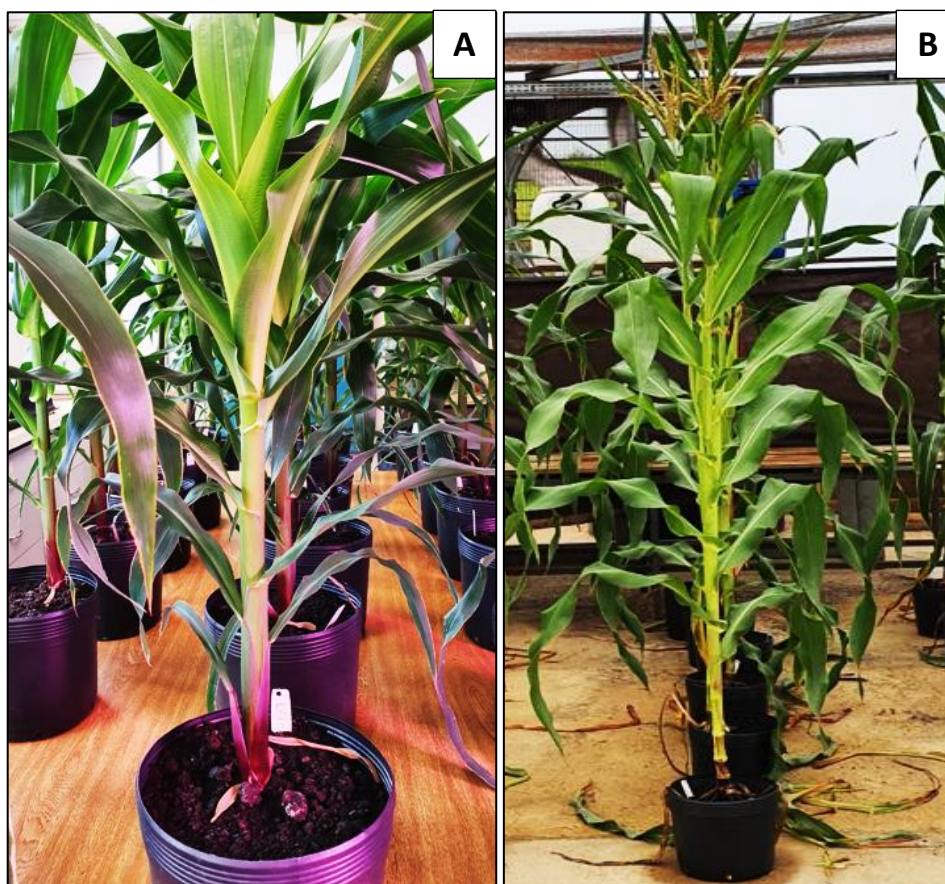


Figura 2 - Plantas cultivadas em câmara de crescimento e inoculadas no estágio vegetativo V6 (A) e plantas cultivadas em casa de vegetação e inoculadas no estágio de florescimento pleno (B). Fonte: Finger (2022).

O segundo experimento foi conduzido em casa de vegetação (UR = 60%; temperatura na faixa de 20 a 32°C, com média diária de 25°C; fotoperíodo natural), com inoculação das plantas no estágio de florescimento pleno (VT) (Figura 2B), quando as plantas apresentavam o último ramo do pendão completamente expandido (HANWAY, 1966).

Nos dois experimentos, as plantas foram cultivadas em vasos plásticos individuais com capacidade de 8 L, contendo substrato comercial, e a irrigação das mesmas foi efetuada manualmente de acordo com a necessidade hídrica. Os vasos com as plantas foram dispostos no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

4.2 OBTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E PREPARO DO INÓCULO

O isolado monospórico de *C. graminicola* foi cedido pela empresa Dow AgroSciences Ltda. (Jardinópolis – SP). Inicialmente, discos de meio de cultura aveia-ágar contendo o micélio do patógeno (isolado ORI), foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (40 g de farinha de aveia, 10 g de ágar e 1000 mL de água destilada). Após a repicagem, as placas permaneceram a temperatura ambiente ($21 \pm 4^\circ\text{C}$), até a esporulação completa das colônias.

Visando preservar a patogenicidade do isolado, foram realizados reisolamentos periódicos, através da inoculando as plantas de milho com o *C. graminicola*, por meio da pulverização de uma suspensão de conídios na superfície das folhas, até o ponto de escorrimento. Imediatamente após a inoculação, cada planta foi envolta individualmente por um saco plástico transparente umedecido, formando uma câmara úmida, com o objetivo de fornecer a condição ideal de umidade para a infecção pelo patógeno. Após o período de 48 horas, os sacos plásticos foram retirados, e as plantas foram mantidas em casa de vegetação, até o aparecimento dos sintomas típicos da antracnose foliar.

O reisolamento do patógeno foi efetuado através do método indireto de isolamento de fungos fitopatogênicos, consistindo na deposição de quatro fragmentos de folha com sintomas da doença, previamente desinfestados, de forma equidistante, em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar – BDA (39 g de BDA e 1000 mL de água destilada). Após a transferência dos fragmentos foliares sintomáticos, as placas de Petri foram vedadas com filme plástico transparente (PVC) e mantidas a temperatura ambiente ($21 \pm 4^\circ\text{C}$).

Com o crescimento inicial do *C. graminicola* sobre o meio de cultura BDA, discos do meio que continham o micélio do fungo, foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (Figura 3A). Após a repicagem, as placas permaneceram a temperatura ambiente ($21 \pm 4^\circ\text{C}$), até a esporulação das colônias.

No dia da inoculação, com as colônias do patógeno completamente esporuladas (Figura 3B), adicionou-se aproximadamente 20 mL de água deionizada estéril em cada placa, a fim de facilitar a raspagem superficial das colônias, realizada com o auxílio de um pincel, visando a liberação dos conídios. Posteriormente, a suspensão concentrada de conídios (Figura 3C) foi filtrada em uma dupla camada de gaze e a concentração ajustada em câmara de Neubauer para 5×10^5 conídios mL^{-1} .

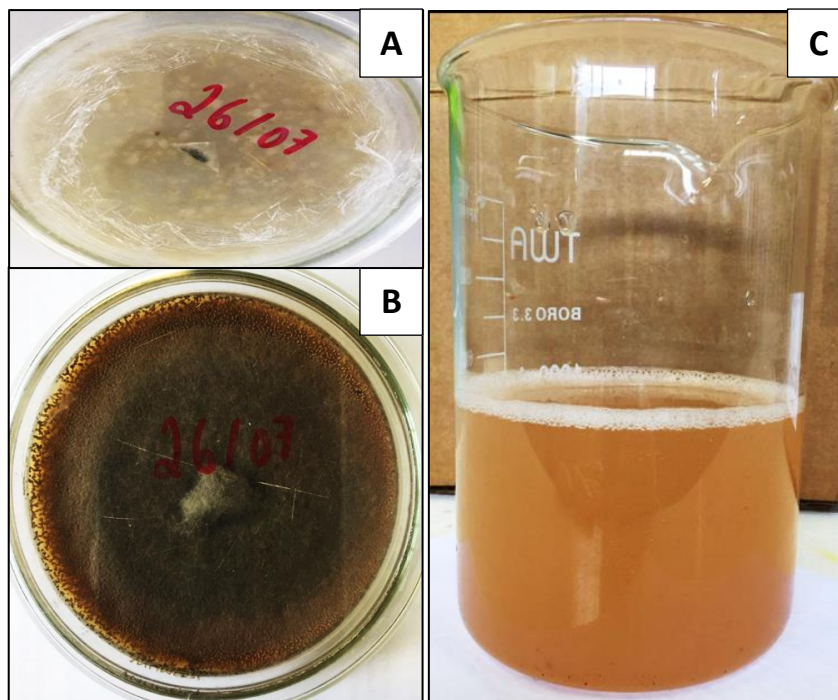


Figura 3 - Placa de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar, após a repicagem do *C. graminicola* (A), placa de Petri com colônias de *C. graminicola* esporuladas (B) e suspensão concentrada de conídios (C). Fonte: Finger (2022).

4.3 INOCULAÇÃO E COLETA DE TECIDO VEGETAL

As inoculações com o *C. graminicola* foram realizadas através da aplicação de 1 mL da suspensão de conídios, na região central do primeiro internódio visível acima da superfície do solo (Figura 4A). Primeiramente, foi efetuada a abertura de um pequeno orifício no colmo, com o auxílio de uma haste metálica pontiaguda, e posteriormente, foi aplicada a suspensão de conídios, através da utilização de uma seringa de uso veterinário.

Foram realizadas oito coletas de tecido vegetal do colmo para a extração de RNA mensageiro (mRNA), efetuadas em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a inoculação (hai), para os dois experimentos. Para tanto, procedeu-se cortes transversais no colmo, logo acima do ponto de inoculação, coletando-se o tecido da medula (Figura 4B) dos respectivos colmos das linhagens endogâmicas (L04-2 e L99-4). Para cada período de coleta foram amostradas três repetições biológicas de cada linhagem de milho, eliminando-se as plantas que foram coletadas.

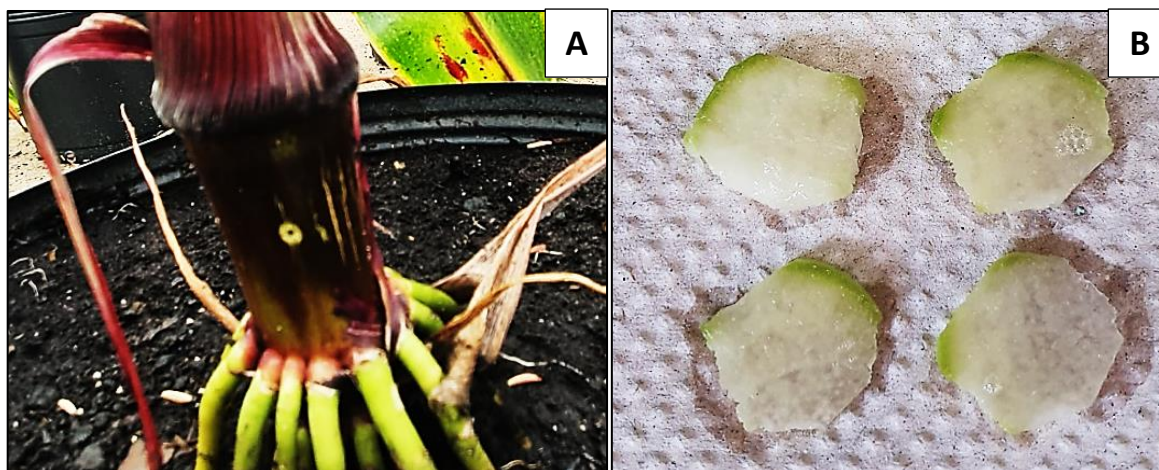


Figura 4 - Região do colmo inoculada com *C. graminicola* (A) e tecido da medula do colmo coletado para extração do mRNA (B). Fonte: Finger (2022).

4.4 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNAs

A extração do mRNA de cada amostra foi realizada a partir do tecido da medula do segundo internódio do colmo, primeiramente fragmentado em nitrogênio líquido e, posteriormente, submetido à extração, utilizando-se o kit comercial PureLink RNA Mini Kit (Ambion®), seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, as amostras de mRNA foram armazenadas em ultrafreezer (- 80°C), para posterior utilização.

A quantificação do mRNA extraído e a determinação da pureza, indicada pelas relações de absorvância A_{260}/A_{280} (RNA/proteínas) e A_{260}/A_{230} (RNA/polissacarídeos e polifenóis), foram obtidas através do espectrofotômetro BioPhotometer D30 (Eppendorf).

Para visualizar a integridade do mRNA extraído, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Foram aliqüotados 2,0 μL de cada amostra de mRNA, aos quais foram adicionados 4 μL da mistura tampão de carregamento + corante GelRed (1:500), na proporção de 1:1. No primeiro poço do gel de agarose foi aplicado o marcador de 100 pb (Norgen®), preparado a partir da mistura de 4 μL desse com 3 μL de GelRed (1:500). As amostras de mRNA foram submetidas à corrida eletroforética por 1,5 h a 70 V. A imagem do gel de agarose foi capturada no fotodocumentador AlphaImager® HP (Protein Simple).

Após determinar a concentração do mRNA de cada amostra, e comprovar a pureza e a integridade do mRNA extraído, as amostras concentradas de mRNA foram diluídas em água ultrapura estéril, com o objetivo de padronizar a quantidade de mRNA para 1,0 μg . Posteriormente, foi realizado o tratamento das amostras de mRNA com a enzima DNase, utilizando-se o kit comercial DNase I - Amplification Grade (Sigma-Aldrich®), seguindo o protocolo do fabricante.

Após o tratamento com a DNase, procedeu-se a síntese dos cDNAs. Para a síntese do DNA complementar, 1,0 µg de mRNA foi submetido à transcrição reversa, utilizando o kit comercial GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT) (Promega®), seguindo as recomendações técnicas do fabricante.

Alíquotas do cDNA foram diluídas para 10 ng µL⁻¹, concentração utilizada para a análise de expressão gênica através da RT-qPCR. Por fim, as amostras concentradas e diluídas foram estocadas em freezer (-20°C), para posterior utilização nos experimentos de expressão gênica.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

A expressão diferencial dos genes foi validada pela análise de RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real) no equipamento AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies®). A partir dos resultados obtidos por Coelho et al. (2021), o gene *FPGS* (folilpoliglutamato) foi utilizado como controle interno dos experimentos de expressão gênica, para onze genes relacionados à resistência do milho à antracnose do colmo, ocasionada pelo fungo *C. graminicola*, descritos na Tabela 1.

Para as reações de amplificação foram utilizados 20 ng de cDNA para cada amostra, e os seguintes reagentes: 2X Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent®), 1 mM Reference Dye, 10 µM dos primers forward/reverse e água ultrapura estéril para completar 20 µL de reação. Para cada amostra, foram realizadas duas repetições técnicas. Em cada reação de RT-qPCR foi incluído um controle negativo (água ultrapura estéril no lugar do cDNA), visando a confirmação da ausência de contaminantes.

A reação de RT-qPCR foi programada no equipamento AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies®) com a seguinte ciclagem: 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos a 72°C. Para confirmar a presença de *amplicons* únicos, os produtos da amplificação foram submetidos à curva de dissociação (curva de Melt), composta pela seguinte programação: 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C e 10 segundos a 94°C.

Tabela 1 - Relação dos genes, descrição e sequência dos iniciadores (forward e reverse) dos genes avaliados para resistência à antracnose do colmo.

Genes	Descrição	Sequência dos Iniciadores	
		Forward	Reverse
<i>PR1</i>	Pathogenesis-related protein 1	5'CCTACGGCGAGAACCTCTT3'	5'TCGTAGTACTGCTTCTCGGACA3'
<i>PR3</i>	Pathogenesis-related protein 3	5'GGTGCGAACGTGGCTAAT3'	5'CCGGGTGTAGAAGTTCTTGC3'
<i>PR5</i>	Pathogenesis-related protein 5	5'CTGGCCGAGTTCACCATC3'	5'GCCATGGCGAGGTTGTAG3'
<i>PR10.1</i>	Pathogenesis-related protein 10.1	5'CAGCTGGACTGTTGAGATCG3'	5'GTGTGCCAGTCCATCACG3'
<i>LOX3</i>	Linoleate 9S-lipoxygenase3	5'CGCCAACCTCCTGGGTCTAC3'	5'TCTGGCTTGGCAGGTACG3'
<i>LOX5</i>	Linoleate 9S-lipoxygenase5	5'GCACCCAACAAAGAAAGACC3'	5'CGGGACGTAGATGTTTCAGGT3'
<i>BB</i>	Bowman-Birk tryp inhibitor	5'TCTTCTTCTGACGCCATGC3'	5'AGAGCAAGCACCGAACAGAG3'
<i>WIP1</i>	Bowman-Birk type wound-induced proteinase inhibitor	5'CATGAAGAGCAGCCCACAC3'	5'GGCCTTGCTCTCAACCAG3'
<i>ACO31</i>	B73 acc oxidase	5'GCTCGTCTTCGATCAATTCC3'	5'CAGCTTGGAGAAGTCGATCA3'
<i>CYP94B12</i>	Cytochrome P450	5'AGCTAGTAGTAATAACGAAGCAGTT3'	5'CGTCGTCTGGGAATTGAGTATT3'
<i>LECB</i>	Lectins beta domain containing protein	5'GCACGGCCTCTCATTTACT3'	5'ACCGCCTTTCCTGAACAAA3'

Fonte: Balmer et al. (2013); Kebede et al. (2018).

A partir dos valores de Cq obtidos com as reações de RT-qPCR, foi realizada a quantificação relativa da expressão de cada gene, utilizando o método Cq comparativo, proposto por Livak e Schmittgen (2001). Primeiramente, foram excluídos manualmente os outliers, e posteriormente, foram calculados o desvio padrão e a média aritmética entre os Cqs das três repetições biológicas. Em seguida, foram determinados os ΔCq s e os $\Delta\Delta Cq$ s de todos os períodos de coleta. O ΔCq corresponde à diferença do valor de Cq entre a amostra inoculada e a amostra controle (0 h após a inoculação), enquanto que o $\Delta\Delta Cq$ refere-se à diferença entre o valor de ΔCq do gene alvo e do gene de referência. Por fim, para se obter a expressão relativa do gene em cada amostra, foi calculada a potência (P) a partir da seguinte equação: $P = 2^{-\Delta\Delta Cq}$. Esta razão é interpretada como a expressão do gene alvo, relativo ao gene de referência na amostra inoculada, em comparação com a amostra controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INTEGRIDADE, QUALIDADE E CONCENTRAÇÃO DO RNA EXTRAÍDO

Na Figura 5, pode ser observado as duas moléculas correspondentes ao 28S e 18S do RNA ribossomal (rRNA), sem a presença de “arraste” no lane da corrida, indicando que as amostras do mRNA encontram-se integras e não degradadas. A etapa crucial para qualquer análise que envolva estudos de expressão gênica através da RT-qPCR, é a necessidade de um mRNA de alta integridade e qualidade (IBELLI; REGITANO; NICIMURA, 2007).

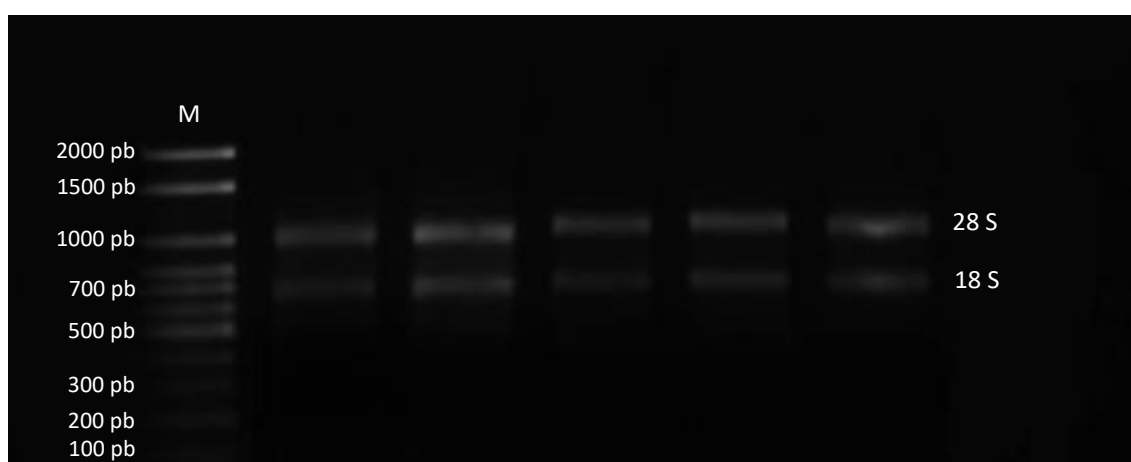


Figura 5 - Visualização do perfil eletroforético de amostras de mRNA, em gel de agarose 1%. M - marcador de 100 pb.

Nas amostras extraídas a partir de plantas cultivadas em câmara de crescimento e inoculadas no estágio vegetativo V6, a concentração do mRNA variou de 25,6 a 942,8 ng μL^{-1} . A relação de absorvância A_{260}/A_{280} oscilou de 1,78 a 2,10, enquanto que a relação de absorvância A_{260}/A_{230} variou de 0,43 a 2,42 (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentrações e relações de absorvância do mRNA das linhagens de milho L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) cultivadas em câmara de crescimento e inoculadas com *C. graminicola* no estágio vegetativo V6, em diferentes períodos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h).

T _{0h}	Amostras	[] ng μL^{-1}	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	T _{6h}	Amostras	[] ng μL^{-1}	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
L04-2	1	75,6	1,78	0,58	L04-2	1	114,4	2,05	2,40
	2	83,2	1,94	0,69		2	72,4	2,05	0,76
	3	391,6	2,04	1,79		3	87,6	2,08	0,67
L99-4	1	62,4	2,05	1,34	L99-4	1	259,2	2,04	0,93
	2	142,4	2,01	2,25		2	88,0	2,01	0,57
	3	272,4	2,05	1,22		3	801,2	2,02	2,42
L04-2	1	146,4	2,02	2,10	L04-2	1	437,2	2,01	2,33
	2	34,8	2,02	1,18		2	85,2	1,89	1,75
	3	62,0	2,10	0,43		3	494,8	2,01	2,28
L99-4	1	119,6	2,02	1,79	L99-4	1	231,5	2,09	1,22
	2	58,8	2,01	1,81		2	942,8	2,01	2,32
	3	131,8	1,99	2,21		3	838,0	2,03	1,97
L04-2	1	183,2	2,02	2,79	L04-2	1	25,6	2,09	0,70
	2	290,8	2,01	2,27		2	122,4	2,03	1,71
	3	290,0	2,01	2,17		3	94,4	2,03	1,82
L99-4	1	91,2	2,04	0,70	L99-4	1	84,4	2,05	1,07
	2	302,8	2,02	2,04		2	118,8	2,02	2,03
	3	72,4	2,03	0,78		3	272,0	2,04	1,95
L04-2	1	234,0	2,01	2,17	L04-2	1	136,4	2,02	2,19
	2	78,0	2,01	2,10		2	101,6	2,03	2,02
	3	192,4	2,01	2,30		3	53,2	2,02	1,92
L99-4	1	326,8	2,03	1,54	L99-4	1	231,6	2,01	2,11
	2	72,0	2,02	1,65		2	182,4	2,01	1,80
	3	259,6	2,01	2,14		3	50,0	1,95	1,47

*[] - concentração do mRNA extraído; A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₃₀ - relações de absorvância.

Para as amostras extraídas de plantas cultivadas em casa de vegetação e inoculadas no estágio de florescimento pleno (VT), a concentração do mRNA variou de 25,6 a 146,4 ng μL^{-1} , conforme pode ser observado na Tabela 3. A relação de absorvância A_{260}/A_{280} oscilou de 1,65 a 2,24, e a relação de absorvância A_{260}/A_{230} variou de 0,36 a 1,92 (Tabela 3).

A relação de absorvância A_{260}/A_{280} indica a contaminação do RNA extraído por proteínas, enquanto que a relação A_{260}/A_{230} , aponta a contaminação por polissacarídeos e polifenóis. Os valores dessas relações devem ficar na faixa de 1,8 a 2,1, o que indica RNA livre de contaminantes (MANNING, 1991; ASIF et al., 2006). Os resultados de pureza obtidos neste trabalho, confirmam que a maioria das amostras de mRNA estão livres da contaminação por proteínas, visto que os valores da relação de absorvância A_{260}/A_{280} , permaneceram próximos da faixa adequada. Com relação à contaminação por polissacarídeos e polifenóis, muitas amostras que foram extraídas a partir das plantas que foram cultivadas em casa de vegetação e inoculadas no estágio de florescimento pleno, apresentaram valores da relação de absorvância A_{260}/A_{230} abaixo da faixa adequada, condicionado pela alta concentração de polissacarídeos no colmo neste estágio de desenvolvimento. De acordo com Campos et al. (2010), o que dificulta a obtenção de um RNA de alta qualidade são os metabólitos secundários presentes em tecidos vegetais.

Tabela 3 - Concentrações e relações de absorvância do mRNA das linhagens de milho L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) cultivadas em casa de vegetação e inoculadas com *C. graminicola* no estágio de florescimento pleno - VT, em diferentes períodos após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h).

T _{0h}	Amostras	[] ng μL^{-1}	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	T _{6h}	Amostras	[] ng μL^{-1}	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
L04-2	1	64,0	2,24	1,32	L04-2	1	120,4	1,97	1,92
	2	29,2	2,02	1,16		2	76,0	1,88	1,50
	3	39,2	2,22	0,73		3	88,8	2,04	1,49
L99-4	1	56,0	1,89	1,30	L99-4	1	68,0	1,96	1,60
	2	38,8	1,94	0,66		2	36,4	1,86	0,84
	3	47,2	1,87	0,93		3	56,0	1,84	1,09
T _{12h}	1	66,4	2,08	0,62	T _{24h}	1	25,6	2,03	0,65
	2	61,2	2,04	1,01		2	94,0	2,03	1,56
	3	37,2	2,02	0,59		3	109,2	2,02	0,89
L99-4	1	38,0	2,11	0,64	L99-4	1	69,2	1,99	1,47
	2	54,4	1,92	1,08		2	55,6	1,93	0,90
	3	85,2	1,97	1,41		3	68,0	1,87	1,29
T _{48h}	1	57,6	1,97	0,59	T _{96h}	1	116,0	2,03	1,56
	2	76,0	2,02	0,46		2	140,8	1,65	1,10
	3	120,0	2,01	0,97		3	93,2	1,99	1,22
L99-4	1	76,4	2,03	1,27	L99-4	1	69,2	1,92	1,27
	2	44,0	2,04	0,74		2	76,0	2,02	1,61
	3	80,0	2,02	1,55		3	49,6	2,00	0,36
T _{168h}	1	90,4	2,04	0,93	T _{336h}	1	110,4	2,02	1,22
	2	69,2	2,04	1,18		2	64,4	1,94	1,43
	3	29,6	1,85	0,76		3	79,6	2,01	1,14
L99-4	1	79,2	2,00	1,42	L99-4	1	34,0	2,02	0,99
	2	118,4	2,01	1,12		2	146,4	1,99	1,31
	3	51,2	1,97	1,42		3	85,3	2,02	1,33

*[] - concentração do mRNA extraído; A₂₆₀/A₂₈₀ e A₂₆₀/A₂₃₀ – relações de absorvância.

5.2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RESISTÊNCIA

5.2.1 Expressão de genes de resistência no estágio V6

A análise de expressão gênica através da RT-qPCR revelou que a linhagem L04-2, resistente à antracnose do colmo, e a linhagem L99-4, suscetível, apresentaram um padrão de resposta muito semelhante para o gene *ZmPR3*, após a inoculação com *C. graminicola*. As duas linhagens demonstraram aumento progressivo na expressão desse gene, de 6 a 24 horas após a inoculação (hai) (Figura 6A). Embora as duas linhagens tenham apresentado o pico de expressão em 24 hai, a linhagem resistente L04-2 exibiu expressão superior em relação à suscetível L99-4. A expressão diferencial ocorreu no período de 12 a 48 hai, com maior nível de expressão na L04-2 (Figura 6A). Após atingir o nível máximo de expressão, tanto a linhagem resistente quanto a suscetível, evidenciaram redução constante na expressão do gene *ZmPR3*, no período de 48 a 336 hai (Figura 6A).

De acordo com Balmer et al. (2013), a inoculação de folhas e raízes de milho da variedade “Jubilee” com *C. graminicola*, também ativou a expressão do gene *PR3*, como uma resposta local à infecção pelo patógeno. Enquanto que nas folhas esse gene foi altamente induzido em 48 e 96 hai, nas raízes essa indução ocorreu precocemente, em 12 hai. Além do gene *PR3* ser induzido como resposta local à infecção por *C. graminicola*, Planchamp (2013) também relatou que esse gene foi altamente induzido como resposta sistêmica nas raízes, aos 4 dias após a inoculação das folhas da variedade “Golden Jubilee”, suscetível ao patógeno.

O gene *PR3* codifica para a enzima quitinase 2, a qual aumenta a resistência do milho ao *Fusarium graminearum* (DOWD et al., 2018). Ao avaliar a resposta do milho à podridão do colmo de *Fusarium*, Salcedo et al. (2021) verificaram que o *PR3* foi regulado positivamente tanto na linhagem resistente (Mp717), quanto na suscetível (B73), aos 2 dias após a inoculação, em plantas cultivadas em câmara de crescimento.

Para o gene *ZmPR5*, a linhagem resistente L04-2 apresentou grande oscilação na expressão ao longo de todo o período de avaliação, exibindo três picos de expressão, em 6, 24 e 96 hai (Figura 6B). Por outro lado, a linhagem suscetível L99-4 demonstrou resposta tardia, não exibindo alteração significativa na expressão do gene *ZmPR5* até 24 hai e atingindo o pico de expressão em 48 hai, momento a partir do qual, apresentou redução constante na expressão do *ZmPR5* até 336 hai (Figura 6B). A expressão diferencial para o gene *ZmPR5* ocorreu em 6 hai, com maior nível de expressão na L04-2, e no período de 24 a 168 hai (Figura 6B).

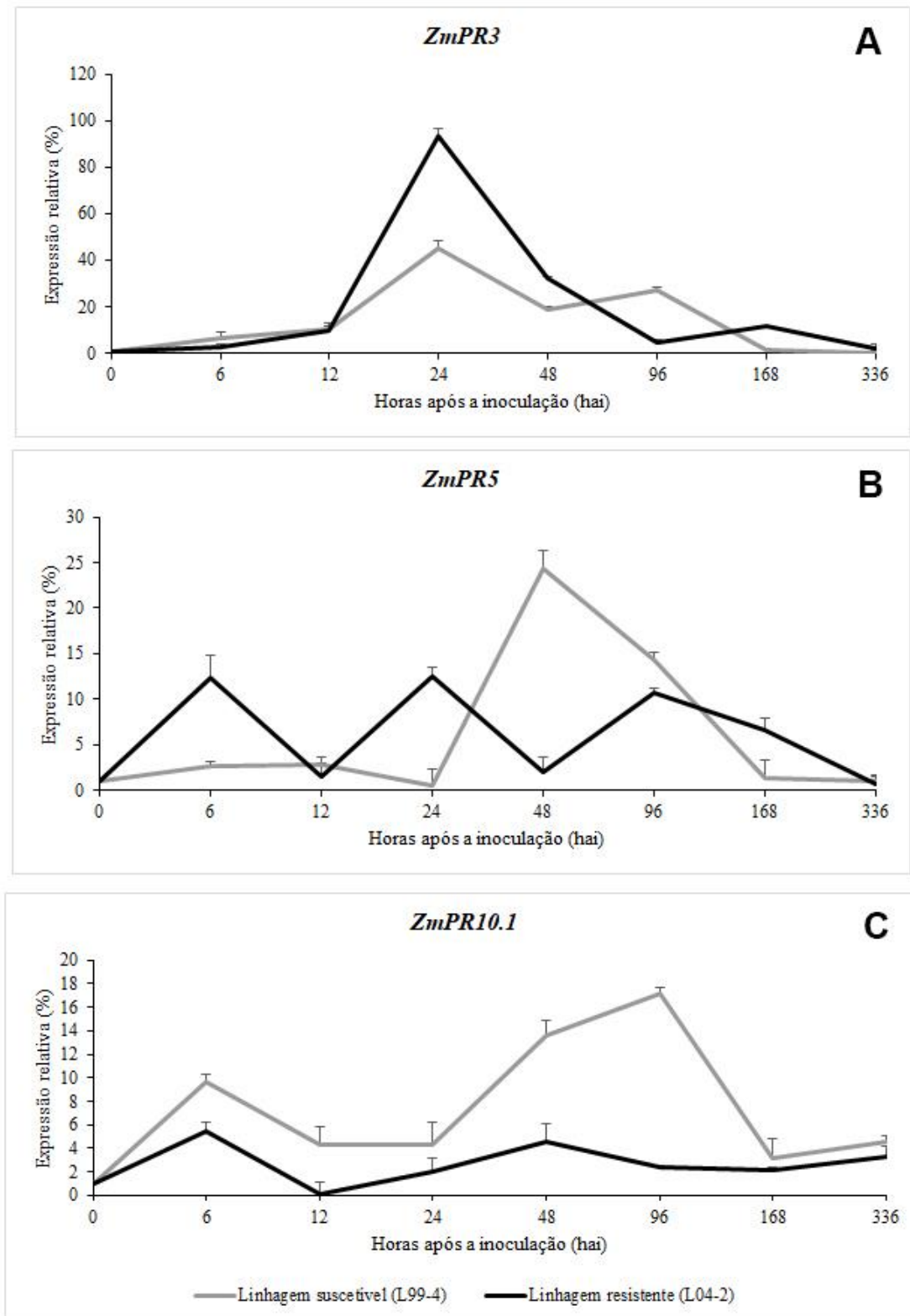


Figura 6 - Expressão dos genes (A) *ZmPR3*, (B) *ZmPR5* e (C) *ZmPR10.1* na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao *C. graminicola*, em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio vegetativo V6, em câmara de crescimento.

Ao avaliar a resposta local de folhas e raízes da variedade “Jubilee” ao *C. graminicola*, Balmer et al. (2013) observaram ativação da expressão do gene *PR5* em ambos os órgãos. As raízes apresentaram resposta mais rápida ao patógeno, pois exibiram alta indução do gene *PR5* em 12 hai, enquanto que nas folhas a indução desse gene ocorreu em 24 hai.

A ativação da expressão do gene *PR5* também foi observada por Planchamp (2013), ao inocular folhas da variedade “Golden Jubilee”, suscetível ao *C. graminicola*. A inoculação desencadeou a expressão do gene *PR5*, como resposta local ao patógeno nas folhas, e como resposta sistêmica nas raízes. Embora a ativação tenha ocorrido nos dois tecidos, o nível de expressão nas folhas foi superior ao das raízes. Essa diferença de expressão do *PR5*, entre folhas e raízes, também foi observada por Miranda et al. (2017), ao avaliar a resposta local desses tecidos, na variedade BRS1010, suscetível ao *C. graminicola*. Nas folhas, os autores relataram aumento de 30 vezes na expressão do gene *PR5*, enquanto que nas raízes, a expressão aumentou apenas 5 vezes.

Com relação ao gene *ZmPR10.1*, a linhagem resistente L04-2 exibiu um pequeno pico de expressão em 6 hai, mantendo baixa expressão do gene nos demais períodos avaliados (Figura 6C). A linhagem suscetível L99-4 também evidenciou um pequeno pico de expressão em 6 hai, no entanto, a partir de 24 hai, exibiu um aumento progressivo na expressão do gene *ZmPR10.1*, atingindo o segundo pico em 96 hai. Após esse pico, a L99-4 apresentou redução contínua na expressão do gene até o último período avaliado (336 hai) (Figura 6C). Para o gene *ZmPR10.1*, a expressão diferencial ocorreu nos períodos de 6 a 12 e de 48 a 96 hai, com expressão superior na linhagem L99-4 (Figura 6C).

Para Planchamp (2013), o gene *PR10.1* foi induzido como uma resposta local ao *C. graminicola*, em folhas da variedade “Golden Jubilee”, suscetível ao patógeno, aos 4 dias após a inoculação. Da mesma forma, Balmer et al. (2013) observaram que a inoculação de folhas e raízes da variedade “Jubilee” com o mesmo patógeno, induziu a expressão do gene *PR10* nos dois órgãos. Semelhante a outros genes *PR*, para o *PR10*, as raízes responderam mais rapidamente ao patógeno do que nas folhas. Nas raízes, esse gene foi altamente induzido em 12 hai, enquanto que nas folhas, a indução ocorreu apenas em 48 hai.

Para o gene *ZmLOX3*, a linhagem resistente L04-2 apresentou grande oscilação na expressão, após a inoculação do colmo com *C. graminicola*. Essa oscilação também foi observada na linhagem suscetível L99-4 (Figura 7A). A linhagem L04-2 (resistente) evidenciou três picos de expressão do gene *ZmLOX3*, em 6, 48 e 168 hai, enquanto que a L99-4 (suscetível) exibiu apenas dois picos, as 12 e 168 hai (Figura 7A). Os picos de expressão das duas linhagens correspondem aos tempos em que ocorreu expressão diferencial do gene *ZmLOX3*. Embora as

duas linhagens endogâmicas tenham demonstrado grande oscilação na expressão do gene *ZmLOX3*, a L04-2 evidenciou resposta mais rápida ao patógeno, e atingiu maior nível de expressão, comparativamente a linhagem L99-4 (Figura 7A).

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas que catalisam a oxigenação de ácidos graxos poli-insaturados, em células que sofreram danos físicos, em função de estresse biótico ou abiótico. Esta peroxidação resulta na produção de hidroperóxido de ácido graxo, o qual é rapidamente metabolizado para produzir diversos elementos de sinalização ou moléculas com atividade antimicrobiana e ou inseticida (FEUSSNER; WASTERNAK, 2002; YAN et al., 2012).

Alguns estudos demonstraram que a deleção das enzimas LOX no milho influencia a resistência e ou suscetibilidade aos patógenos. A mutação do gene *ZmLOX3*, conferiu ao colmo alta resistência ao *Fusarium verticillioides*, além de ter reduzido drasticamente a produção de fumonisina nos grãos (GAO et al., 2007). Em contrapartida, o nocaute do gene *ZmLOX12* diminuiu significativamente a resistência do mesocótilo ao *F. verticillioides*, aumentando a incidência e a severidade da podridão do colmo de Fusarium, resultando num maior acúmulo de fumonisina B1 nos grãos (CHRISTENSEN et al., 2014).

Ao inocular folhas e raízes da variedade “Jubilee” com *C. graminicola*, Balmer et al. (2013) observaram que o gene *LOX3* foi ativado em ambos os tecidos, em 24 hai, como resposta local à infecção pelo patógeno. Além disso, o *LOX3* também foi ativado nas folhas, como uma resposta sistêmica à inoculação das raízes, as 48 e 96 hai.

Ao estudar a capacidade da rizobactéria *Pseudomonas putida* (KT2440) de induzir resistência no milho contra *C. graminicola*, Planchamp (2013) observou que após a inoculação das folhas com o patógeno, o gene *LOX3* foi altamente induzido em plântulas que não foram tratadas com a rizobactéria, sugerindo que a mesma possa ter alterado a resposta do milho ao patógeno.

A expressão do gene *ZmLOX5* na linhagem resistente L04-2 foi baixa até 12 hai, contudo, aumentando consideravelmente até 24 hai, mantendo-se constante até 48 hai, decaindo até 336 hai (Figura 7B). Em contrapartida, a linhagem suscetível L99-4 atingiu apenas um pequeno pico de expressão as 6 hai, e em seguida, mostrou baixa expressão do gene no período de 12 a 336 hai (Figura 7B). A expressão diferencial do *ZmLOX5* ocorreu em 6 hai, com maior nível de expressão na linhagem suscetível, e no período de 24 a 168 hai, na linhagem resistente (Figura 7B).

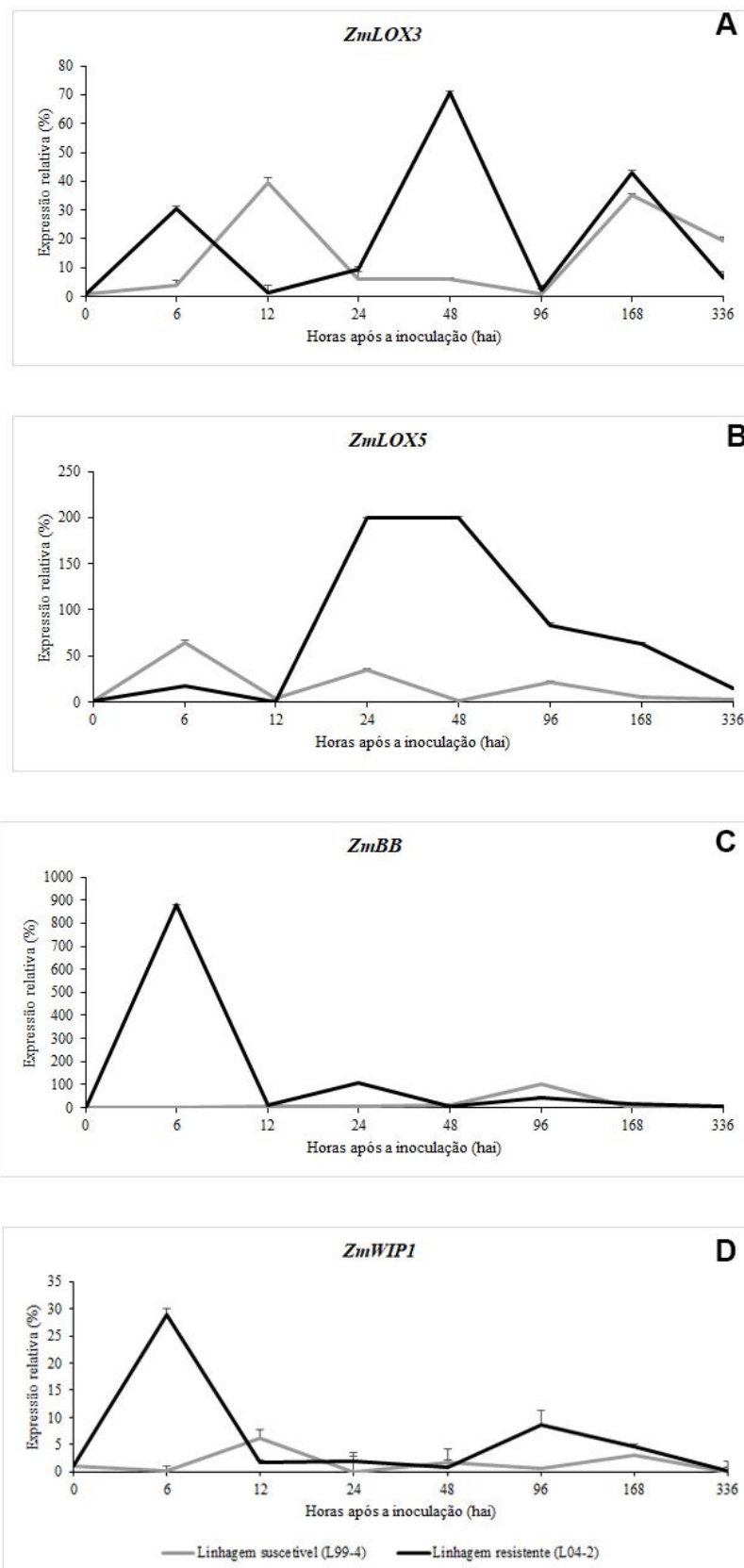


Figura 7 - Expressão dos genes (A) *ZmLOX3*, (B) *ZmLOX5*, (C) *ZmBB* e (D) *ZmWIP1* na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao *C. graminicola*, em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio vegetativo V6, em câmara de crescimento.

Regulação positiva do gene *LOX5* foi observada por Balmer et al. (2013), em folhas e raízes de milho, como resposta local à infecção por *C. graminicola* as 96 hai. Além de ser induzido como resposta local à infecção pelo patógeno, o *LOX5* também foi altamente induzido nas folhas, como resposta sistêmica à inoculação das raízes, em 48 e 96 hai.

Além do gene *LOX5* estar envolvido na resistência do milho ao *C. graminicola*, de acordo com Maschietto et al. (2015), esse gene também atua na resistência do milho à podridão da espiga. Ao avaliarem duas linhagens contrastantes quanto à resistência ao *Fusarium verticillioides*, observaram nível de expressão do gene *LOX5* muito semelhante entre grãos não inoculados de ambas as linhagens, tendo aos 7 dias após a inoculação, a expressão do gene *LOX5* sido quadruplicada em grãos inoculados na linhagem resistente (CO433).

Com relação ao gene *ZmBB*, a inoculação do colmo com *C. graminicola* desencadeou resposta rápida na linhagem L04-2 (resistente), com superexpressão do gene em 6 hai (Figura 7C). Nesse tempo de coleta de tecido vegetal, evidenciou-se a expressão diferencial entre as duas linhagens, com uma expressão do gene *ZmBB* na linhagem resistente, extremamente superior a linhagem suscetível. Após atingir o pico de expressão, a L04-2 exibiu redução significativa na expressão do gene *ZmBB*, mantendo-se baixa até a última avaliação (336 hai) (Figura 7C). Por outro lado, a inoculação do colmo não alterou a expressão do gene *ZmBB* na linhagem L99-4 (suscetível) até 48 hai. Particularmente, a mesma linhagem exibiu pequeno pico de expressão em 96 hai, e posteriormente, manteve baixa expressão desse gene até 336 hai (Figura 7C).

Os inibidores de Bowman-Birk (BBI) são uma das famílias mais estudadas de inibidores de protease, e a indução da síntese dessas proteínas pode ocorrer por infecção ou por ferimento. Durante o processo de infecção por um patógeno, o hospedeiro pode sintetizar inibidores de proteinases, os quais são capazes de suprimir a atividade enzimática dos microrganismos fitopatogênicos (RYAN, 1990; TREMACOLDI, 2009). No feijão (*Phaseolus vulgaris*), os inibidores da família Bowman-Birk suprimiram o crescimento de hifas e a germinação de conídios de *Fusarium solani*, *F. culmorum* e *Botrytis cinerea* (MOSOLOV et al., 1976). No milho, um inibidor de tripsina inibiu a germinação de conídios e o crescimento de hifas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *Fusarium moniliforme* (CHEN et al., 1999).

De acordo com Planchamp (2013), a inoculação de folhas de milho com *C. graminicola* também ativou a expressão do gene *BB*, aos 4 dias após a inoculação. Ao inocular raízes e folhas com o mesmo patógeno, Balmer et al. (2013) relataram que a inoculação desencadeou a expressão do gene *BB* nas raízes em 12 hai, e nas folhas, em 48 hai. Além da inoculação das raízes ter desencadeado a expressão do gene *BB* como uma resposta local ao

patógeno, a mesma também ativou esse gene nas folhas, como uma resposta sistêmica, em 96 hai.

Assim como para o gene *ZmBB*, a inoculação do colmo com *C. graminicola* também desencadeou resposta rápida na linhagem resistente L04-2 para o gene *ZmWIP1*, uma vez que a mesma exibiu pico de expressão as 6 hai (Figura 7D). Após atingir esse pico, houve redução significativa na expressão do gene *ZmWIP1* da linhagem resistente, mantendo-se num nível baixo no período de 12 a 336 hai. Por outro lado, na linhagem suscetível L99-4 não houve alteração significativa na expressão do gene *ZmWIP1* após a inoculação com o patógeno, visto que a mesma manteve baixa expressão ao longo de todo o período avaliado (Figura 7D). A expressão diferencial ocorreu em 6 hai, com uma maior expressão do gene *ZmWIP1* na linhagem resistente L04-2 (Figura 7D).

O gene *WIP1* do milho codifica uma proteína inibidora de Bowman-Birk (BBI), e sua expressão é induzida por ferimentos ou infecções. Em contraste com a maioria dos inibidores de Bowman-Birk, a indução do gene *WIP1* é muito rápida e pode ocorrer de forma sistêmica, em tecidos que não foram feridos ou infectados (ROHRMEIER; LEHLE, 1993).

Ativação precoce do gene *WIP1* foi observada por Balmer et al. (2013), em raízes de milho inoculadas com *C. graminicola*, em 12 hai. Por outro lado, as folhas apresentaram uma resposta tardia ao patógeno, uma vez que a indução do *WIP1* somente ocorreu a partir de 48 hai. Além de ter sido induzido como uma resposta local ao patógeno, a expressão do gene *WIP1* foi ativada nas folhas como uma resposta sistêmica, a partir de 24 hai das raízes. Uma ativação da expressão do gene *WIP1*, como uma resposta sistêmica à infecção pelo *C. graminicola*, também foi observada por Planchamp (2013) em raízes, aos 4 dias após a inoculação das folhas com o patógeno.

Para o gene *ZmACO31*, as linhagens resistente e suscetível apresentaram resposta muito semelhante após a inoculação dos colmos com o patógeno, com grande oscilação na expressão ao longo de todo o período de avaliação (Figura 8A). As duas linhagens demonstraram picos de expressão do gene *ZmACO31* em 6, 24 e 96 hai, porém, o nível de expressão foi muito baixo, em comparação com os demais genes já discutidos neste trabalho. Embora as duas linhagens tenham apresentado resposta à expressão gênica muito semelhantes, ocorreu expressão diferencial para o gene *ZmACO31* em 96 e 168 hai, com maior nível de expressão na linhagem resistente L04-2 (Figura 8A).

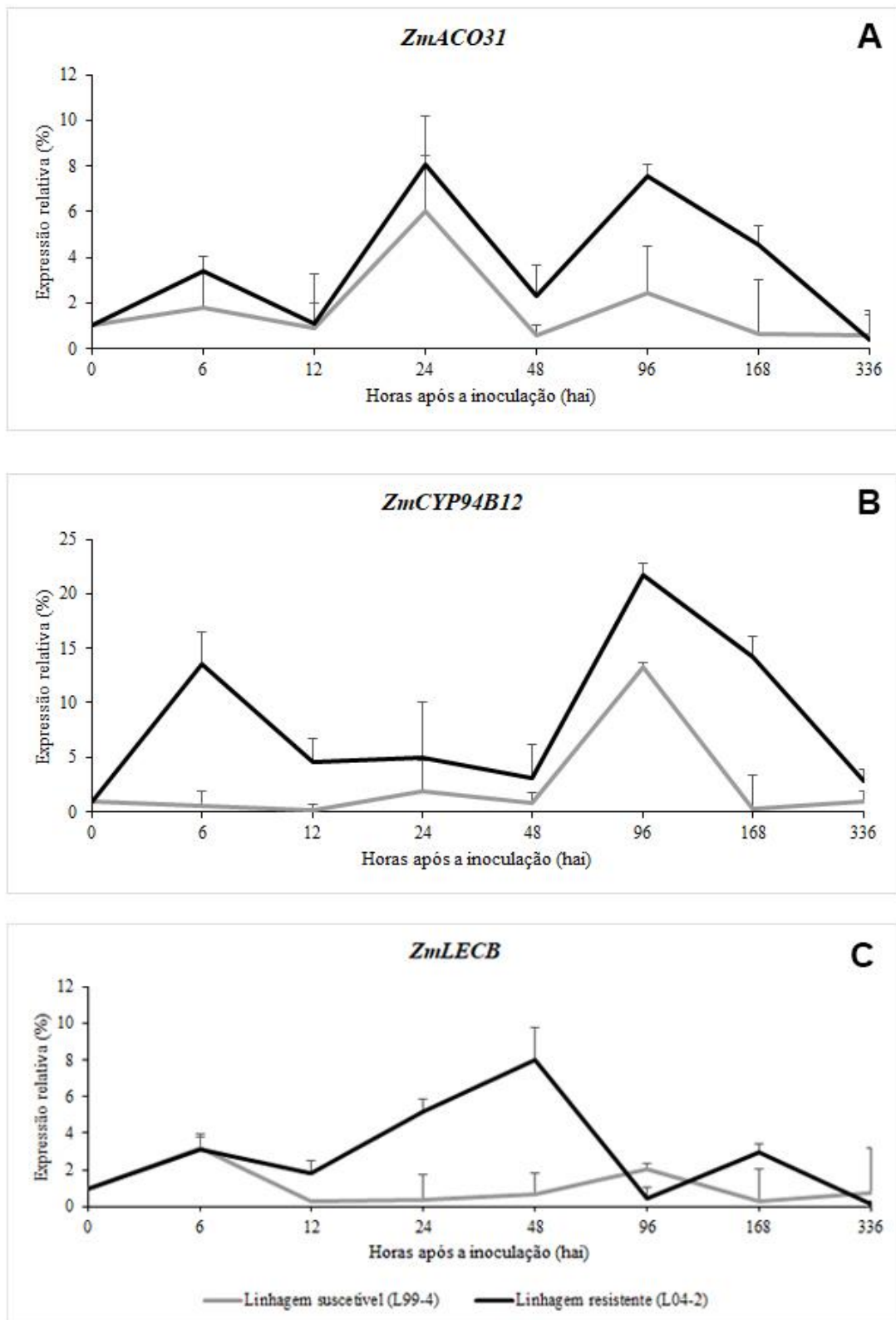


Figura 8 - Expressão dos genes (A) *ZmACO31*, (B) *ZmCYP94B12* e (C) *ZmLECB* na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao *C. graminicola*, em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio vegetativo V6, em câmara de crescimento.

O gene *ACO* codifica para uma enzima ACC oxidase, atuando diretamente na regulação da biossíntese do etileno (POLKO; KIEBER, 2019). No milho, um dos representantes dessa família gênica é o gene *ZmACO31* (GALLIE; YOUNG, 2004). Superexpressão específica do gene *ZmACO31* foi observada por Gao et al. (2008), em raízes do mutante *lox3-4*, aumentando a produção de etileno, refletindo numa maior suscetibilidade ao nematoide de galhas (*Meloidogyne incognita*).

Regulação positiva do gene *ACO31* foi relatada por Balmer et al. (2013), em folhas e raízes de milho inoculados com *C. graminicola*. Nas folhas esse gene foi altamente induzido em 96 hai, enquanto que nas raízes essa indução ocorreu em 24 hai.

Para o gene *ZmCYP94B12*, houve expressão diferencial entre a linhagem resistente L04-2 e suscetível L99-4, na maior parte do período de avaliação experimental, com expressão superior na linhagem L04-2 (Figura 8B). A L04-2 evidenciou dois importantes picos de expressão as 6 e 96 hai (Figura 8B). A linhagem L99-4 exibiu resposta tardia à inoculação do colmo com o patógeno, atingindo o pico de expressão as 96 hai (Figura 8B).

A superfamília do citocromo P450 (CYP) além de desempenhar papel vital na promoção do crescimento e do desenvolvimento das plantas, também atua na proteção das mesmas contra estresses, por meio de múltiplas vias biossintéticas e de desintoxicação (OHKAWA et al., 1998). A família do citocromo P450 está envolvida na biossíntese de fitoalexinas, no metabolismo hormonal e na biossíntese de demais metabólitos secundários (HEITZ et al., 2012). Dentre os hormônios regulados pela família do citocromo P450 está o ácido jasmônico, o qual tem papel comprovado na defesa precoce do trigo (*Triticum aestivum*) e da cevada (*Hordeum vulgare*) contra *F. graminearum* (CHEN et al., 2009; ZHANG et al., 2013). Na pimenta (*Capsicum annuum*), a mutação do gene *CYP94B*, aumentou a suscetibilidade a *Pseudomonas syringae* (HWANG; HWANG, 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho para o gene *ZmCYP94B12* corroboram com Kebede et al. (2018), que ao avaliar duas linhagens endogâmicas contrastantes para resistência à podridão da espiga, observaram que a inoculação das espigas com *F. graminearum* resultou em aumento da expressão do gene *CYP94B12* nas duas linhagens, tendo a linhagem resistente (CO441) exibido nível de expressão superior à suscetível (B73), aos 4 dias após a inoculação.

De acordo com Balmer et al. (2013), a inoculação de folhas e raízes de milho com *C. graminicola*, desencadeou a indução do gene *CytP450* em 96 hai, como resposta local dos dois órgãos à infecção pelo patógeno. Adicionalmente, a inoculação das raízes também ativou a expressão do gene *CytP450* nas folhas, como resposta sistêmica, em 48 hai.

Ao avaliar a capacidade da rizobactéria *Pseudomonas putida* (KT2440) de induzir resistência no milho ao *C. graminicola*, Planchamp (2013) observou que após a inoculação com o patógeno, somente houve indução do gene *CytP450* em folhas de plântulas que não foram tratadas com a rizobactéria, sugerindo que a mesma possa ter alterado a resposta do milho ao patógeno.

No presente trabalho a inoculação do colmo com *C. graminicola* desencadeou pequena indução do gene *ZmLECB* nas linhagens L04-2 e L99-4 as 6 hai (Figura 8C). A linhagem L04-2 (resistente) exibiu redução na expressão em 12 hai, e posteriormente, mostrou um aumento progressivo, até atingir um segundo pico em 48 hai (Figura 8C). Após esse pico, a L04-2 mostrou baixa resposta do gene *ZmLECB* no período de 96 a 336 hai. Para a L99-4 (suscetível), após atingir um pequeno pico em 6 hai, a mesma exibiu redução na expressão do gene *ZmLECB*, no período de 12 a 336 hai (Figura 8C). A expressão diferencial desse gene ocorreu no período de 12 a 48 hai, com maior indução na linhagem L04-2 (Figura 8C).

As lectinas são proteínas antimicrobianas que desempenham um importante mecanismo de defesa nas plantas contra diversos microrganismos fitopatogênicos, uma vez que atuam como receptores imunes intracelulares e de superfície celular, auxiliando as plantas na percepção de estruturas microbianas conservadas e de padrões moleculares associados a danos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LANNOO; VAN DAMME, 2014). Lectinas isoladas a partir de sementes de pitomba (*Talisia esculenta*) inibiram o crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* (FREIRE et al., 2002). Adicionalmente, lectinas obtidas de sementes de ervilha (*Pisum sativum*) inibiram o desenvolvimento de *Aspergillus flavus*, *Trichoderma viride* e *Fusarium oxysporum* (SITOHY; DOHEIM; BADR, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com Kebede et al. (2018), que ao avaliar duas linhagens endogâmicas de milho contrastantes para resistência à podridão da espiga, relataram que a inoculação com *F. graminearum* aumentou a expressão de um gene que codifica para uma proteína contendo domínio beta de lectina (GRMZM2G076343) nas duas linhagens, onde a linhagem resistente (CO441) exibiu maior nível de expressão aos 4 dias após a inoculação das espigas, em comparação com a linhagem suscetível (B73).

5.2.2 Expressão de genes de resistência no estágio VT

A análise de expressão gênica através da RT-qPCR revelou que a resposta inicial do milho à inoculação do colmo com *C. graminicola*, foi muito semelhante entre a linhagem

resistente (L04-2) e a suscetível (L99-4), para o gene *ZmPRI*. As duas linhagens não apresentaram alteração na expressão até 24 hai, porém, demonstraram aumento na expressão em 48 hai, com expressão diferencial do gene *ZmPRI* (Figura 9A). Em 48 hai, a linhagem L04-2 atingiu o pico de expressão e mostrou uma expressão superior à linhagem L99-4 (Figura 9A). A linhagem suscetível L99-4 evidenciou resposta mais tardia, com expressão diferencial e superexpressão do gene *ZmPRI*, no período de 96 a 336 hai (Figura 9B).

As proteínas relacionadas a patogênese da família 1 (PR-1) vêm sendo caracterizadas em diversos estudos por apresentarem efeito inibitório sobre fungos fitopatogênicos em diversas culturas. No tabaco (*Nicotiana tabacum*), o gene *PR-1a* conferiu as plantas maior resistência aos agentes causais do mofo azul (*Peronospora tabacina*) e da haste preta (*Phytophthora parasitica* var. *nicotinae*) (ALEXANDER et al., 1993). No tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), as proteínas P14c e PR-1g demonstraram maior eficiência na inibição da germinação de zoósporos e na redução da área foliar infectada por *Phytophthora infestans* (NIDERMAN et al., 1995). Em fava (*Vicia faba*), a proteína PR-1 contribuiu para a resistência à ferrugem (*Uromyces fabae*), em função de ter desencadeado mecanismos que resultaram na inibição do desenvolvimento das hifas de infecção do patógeno (RAUSCHER et al., 1999). Em cevada (*Hordeum vulgare* L.), a proteína PR-1b contribuiu para a resistência à penetração do oídio (*Blumeria graminis*) (SCHULTHEISS et al., 2003).

Ao inocular plantas de milho da variedade “Jubilee” com *C. graminicola*, Balmer et al. (2013) observaram através da RT-qPCR, um padrão de resposta local muito semelhante entre raízes e folhas, para o gene *PRI*, embora as raízes responderam mais rapidamente do que as folhas. Enquanto que nas raízes houve uma ligeira indução do gene *PRI* nos tempos iniciais após a inoculação, nas folhas os níveis de expressão desse gene aumentaram em até 800 vezes em 48 hai. Além do gene *PRI* ter sido induzido como uma resposta local à infecção pelo patógeno, o mesmo também foi ativado nas folhas como uma resposta sistêmica à inoculação das raízes, a partir de 24 hai.

Significativa diferença nos níveis de expressão do gene *PRI* entre folhas e raízes, também foi observado por Miranda et al. (2017), ao inocular plantas no estágio V4, da cultivar BRS1010, suscetível ao *C. graminicola*. Os autores demonstraram aumento na expressão do gene *PRI* de 600 vezes nas folhas, enquanto que nas raízes o aumento foi de apenas de 17 vezes.

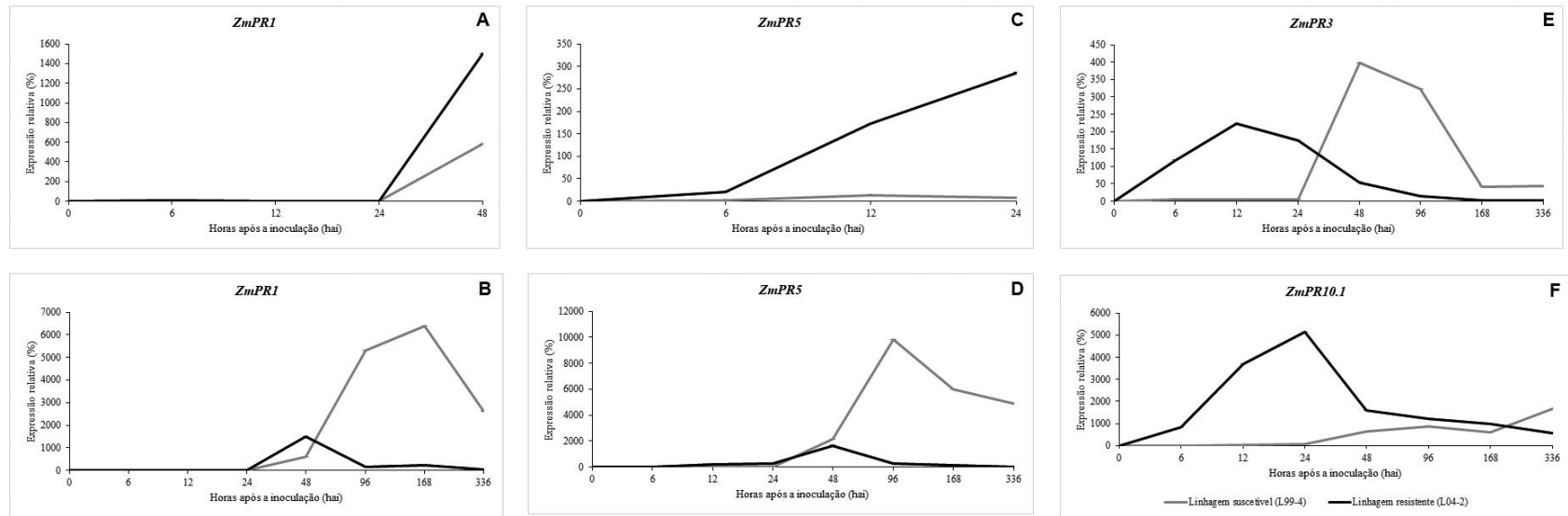


Figura 9 - Expressão dos genes (A e B) *ZmPR1*, (C e D) *ZmPR5*, (E) *ZmPR3* e (F) *ZmPR10.1* na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao *C. graminicola*, em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio de florescimento pleno - VT, em casa de vegetação.

Ao estudar a capacidade da rizobactéria *Pseudomonas putida* (KT2440) de induzir resistência no milho contra *C. graminicola*, Planchamp (2013) observou que na variedade “Golden Jubilee”, suscetível ao patógeno, o gene *PR1* foi altamente induzido nas folhas, como uma resposta local à infecção, e nas raízes, como uma resposta sistêmica, aos 4 dias após a inoculação. Contudo, a indução do gene *PR1* ocorreu tanto nas plântulas inoculadas e não inoculadas com a rizobactéria. Desta forma, o tratamento das sementes pré-germinadas com a rizobactéria, não induziu resistência no milho ao *C. graminicola*, através da ativação do gene *PR1*, uma vez que a expressão desse gene ocorreu notadamente devido à inoculação das folhas com o patógeno.

Ao avaliar a expressão diferencial do gene *ZmPR1* em linhagens contrastantes para resistência a antracnose foliar, Bombardelli; Coelho e Matiello (2020) observaram que a linhagem resistente (L04-2) e a suscetível (L70-2) apresentaram o mesmo padrão de resposta, após a inoculação das folhas com *C. graminicola*. As linhagens não evidenciaram alteração significativa na indução do gene *ZmPR1* até 72 hai, e exibiram aumento na expressão desse gene em 96 hai. Embora a linhagem L04-2 (resistente) tenha exibido maior nível de expressão em comparação a linhagem suscetível L70-2.

De acordo com Yuan et al. (2020), a família de proteínas PR1 desempenha papel essencial na resposta do milho à podridão da espiga, uma vez que ao avaliar linhagens contrastantes para resistência ao *F. graminearum*, observaram que a inoculação das espigas desencadeou drástico aumento no nível de expressão do gene *PR1* nas duas linhagens. O nível de expressão da linhagem resistente (IBM-81) foi superior ao da suscetível (IBM-85), durante todo o período de avaliação experimental.

Com relação ao gene *ZmPR5*, a inoculação do colmo com *C. graminicola* desencadeou resposta rápida na linhagem resistente L04-2, uma vez que exibiu aumento na expressão logo após a inoculação, mantendo acréscimo constante na expressão até 24 hai (Figura 9C). No período de 6 a 24 hai, evidenciou-se a expressão diferencial do gene *ZmPR5*, com maior nível de indução na linhagem L04-2, a qual atingiu o pico em 48 hai. A linhagem L99-4 (suscetível) apresentou uma resposta tardia, não demonstrando alteração na expressão do gene *ZmPR5* até 24 hai (Figura 9C). Em contrapartida, a partir de 48 hai exibiu expressão diferencial desse gene, mantendo superexpressão no período de 96 a 336 hai (Figura 9D).

Estes resultados corroboram com os de Balmer et al. (2013), os quais observaram regulação positiva do gene *PR5* em folhas e raízes de milho, como resposta local à infecção por *C. graminicola*. As raízes apresentaram alta indução do *PR5* em 12 hai, enquanto que nas folhas, a ativação somente ocorreu em 24 hai. Além do gene *PR5* ter sido ativado como resposta

local ao patógeno, o mesmo também foi altamente induzido nas folhas (48 hai), como resposta sistêmica à inoculação das raízes.

Embora as raízes apresentem uma resposta mais rápida ao *C. graminicola*, comparativamente às folhas (BALMER et al., 2013), Miranda et al. (2017) observaram diferença significativa nos níveis de expressão entre esses órgãos. Enquanto que a inoculação das folhas desencadeou aumento no nível de expressão do gene *PR5* de 30 vezes, a inoculação das raízes aumentou a expressão desse gene em apenas 5 vezes.

Regulação positiva do gene *PR5* também foi observada por Planchamp (2013), ao inocular plântulas da variedade “Golden Jubilee” com *C. graminicola*. A inoculação das folhas desencadeou a indução do gene *PR5*, como resposta local ao patógeno, e como resposta sistêmica nas raízes, sendo a indução nas folhas superior as raízes.

Além do gene *PR5* ser regulado positivamente no milho em resposta ao *C. graminicola*, Yuan et al. (2013) observaram que esse gene foi induzido em resposta ao *F. verticillioides*. Ao avaliar a expressão diferencial em duas linhagens contrastantes para resistência ao patógeno, observaram que a inoculação das espigas desencadeou regulação positiva do gene *PR5* nas duas linhagens, sendo que na resistente (Bt-1) houve expressão superior à suscetível (Ye478) a partir de 72 hai.

De acordo com Shi et al. (2018), alguns genes *PR* específicos podem estar envolvidos na defesa do milho contra *Setosphaeria turcica*, fungo hemibiotrófico, responsável pela mancha foliar de helmintosporiose. A inoculação de plantas da linhagem resistente C103^{HtN} no estágio V5 desencadeou regulação positiva do gene *PR5* nas folhas, em 60 hai.

Em relação ao gene *ZmPR3*, a linhagem resistente L04-2 apresentou resposta rápida à infecção do colmo com *C. graminicola*, com aumento na expressão logo após a inoculação, atingindo o pico em 12 hai (Figura 9E). Expressão diferencial do gene *ZmPR3* ocorreu no período de 6 a 24 hai, com maior nível de expressão na linhagem L04-2 (Figura 9E). Por outro lado, a linhagem L99-4 exibiu resposta tardia e diferencial, com pico de expressão em 48 hai, mantendo-se superior a linhagem resistente até 336 hai (Figura 9E).

De acordo com Balmer et al. (2013), a infecção local por *C. graminicola* em folhas e raízes de milho, também induz à expressão do gene *PR3*. Nas folhas esse gene foi altamente induzido em 48 e 96 hai, enquanto que nas raízes essa indução foi observada precocemente, em 12 hai. Além do gene *PR3* ter sido ativado como resposta local à infecção pelo patógeno, o mesmo também foi altamente induzido nas folhas, como resposta sistêmica, em 96 hai das raízes. Essa indução sistêmica do gene *PR3*, em resposta ao *C. graminicola*, também foi

observada por Planchamp (2013), em raízes da variedade “Golden Jubilee”, aos 4 dias após a inoculação das folhas.

Assim como para o gene *ZmPR3*, a linhagem resistente L04-2 também exibiu uma resposta rápida a inoculação do colmo com *C. graminicola* para o gene *ZmPR10.1*, uma vez que apresentou aumento progressivo na expressão, até atingir superexpressão em 24 hai (Figura 9F). A linhagem L04-2 evidenciou expressão diferencial para o gene *ZmPR10.1*, uma vez que manteve expressão superior à linhagem L99-4 até 168 hai (Figura 9F). Em contrapartida, assim como para os genes *ZmPR3* e *ZmPR5*, a linhagem suscetível também apresentou resposta tardia para o gene *ZmPR10.1*, visto que não houve indução até 24 hai, mantendo baixa expressão no período de 48 a 168 hai, atingindo um pequeno pico de expressão apenas em 336 hai (Figura 9F).

De acordo com Balmer et al. (2013), a inoculação de folhas e raízes de milho com *C. graminicola* desencadeou a expressão do gene *PR10*, como uma resposta local dos dois órgãos ao patógeno. As raízes apresentaram resposta rápida, com alta indução desse gene em 12 hai, enquanto que nas folhas, a ativação somente ocorreu em 48 hai. Além do mais, a inoculação das raízes desencadeou resposta sistêmica nas folhas, regulando positivamente a expressão do gene *PR10* a partir de 24 hai. Indução local do gene *PR10.1*, como resposta à infecção por *C. graminicola*, também foi observada por Planchamp (2013), aos 4 dias após a inoculação das folhas da variedade “Golden Jubilee”, suscetível ao patógeno.

Além do *PR10.1* ser induzido em folhas e raízes de milho, como resposta ao *C. graminicola* (BALMER et al., 2013), esse gene também foi expresso nas espigas, em resposta à infecção por *F. graminearum* (YUAN et al., 2020). Ao avaliar duas linhagens de milho contrastantes para resistência à podridão da espiga, observaram que a linhagem resistente (IBM-81) exibiu expressão do *PR10* superior à suscetível (IBM-85), em 48 e 96 hai.

Ao estudar a resposta de plântulas de milho da variedade “Golden Jubilee”, quanto à colonização pela rizobactéria *Pseudomonas putida* (KT2440), Planchamp, Glauser e Mauch-Mani (2015) observaram que o tratamento das raízes com a rizobactéria desencadeou resposta local, através da ativação de genes relacionados ao estresse e à defesa. Dentre os genes ativados, o *PR10.1* foi regulado positivamente aos 3 dias após a inoculação. Os autores sugerem que a rizobactéria possuiu capacidade de desencadear resistência sistêmica induzida no milho contra *C. graminicola*, uma vez que as plântulas tratadas com *Pseudomonas putida* (KT2440), apresentaram drástica redução no crescimento do patógeno, reduzindo a área foliar necrosada.

A inoculação do colmo com *C. graminicola* resultou rápido aumento na expressão do gene *ZmLOX3* na linhagem resistente L04-2, uma vez que a mesma apresentou progressivo

incremento na expressão das 6 as 24 hai, apresentando redução gradativa na expressão do *ZmLOX3* a partir desse pico (Figura 10A). Em contrapartida, a L99-4 (suscetível) evidenciou pequeno aumento na indução do gene em 6 hai, e atingiu o pico em 12 hai (Figura 10A). Após atingir esse pico, a linhagem L99-4 exibiu redução na expressão do gene *ZmLOX3*, mantendo baixa indução até o final de período de avaliação (Figura 10A). A expressão diferencial desse gene ocorreu no período de 6 a 48 hai, com maior nível de expressão na L04-2 (Figura 10A).

Ao inocular folhas e raízes com *C. graminicola*, Balmer et al. (2013) observaram uma regulação positiva do gene *LOX3* as 24 hai nos dois órgãos. Ao estudar a capacidade da rizobactéria *Pseudomonas putida* (KT2440) de induzir resistência no milho ao *C. graminicola*, Planchamp (2013) observou que a inoculação das folhas com o patógeno, induziu a expressão do gene *LOX3* somente em plantas que não foram tratadas com a rizobactéria, sugerindo que a mesma possa ter alterado a resposta do milho ao *C. graminicola*.

Ao avaliar a resposta do milho ao *F. verticillioides*, através da utilização de duas linhagens contrastantes para resistência, Maschietto et al. (2015) observaram que a inoculação da espiga resultou numa regulação positiva do gene *LOX3* tanto na linhagem resistente quanto na suscetível. Enquanto a maior expressão do *LOX3* na suscetível ocorreu aos 3 e 14 dias após a inoculação, na resistente foi aos 7 dias após a inoculação.

Em relação ao gene *ZmLOX5*, a linhagem resistente L04-2 apresentou resposta rápida ao *C. graminicola*, uma vez que exibiu superexpressão logo após a inoculação (Figura 10B). Essa superexpressão em 6 hai, evidenciou a expressão diferencial para o gene *ZmLOX5* entre as duas linhagens. A superexpressão na linhagem L04-2, foi seguida por redução significativa na expressão as 12 hai. Por outro lado, a linhagem suscetível L99-4 não evidenciou resposta à inoculação do colmo com o patógeno, visto que não exibiu nenhuma alteração significativa na indução do gene *ZmLOX5* ao longo de todo o período de avaliação (Figura 10B).

Regulação positiva do gene *LOX5* foi observada por Balmer et al. (2013) em folhas e raízes de milho, como resposta local à infecção por *C. graminicola*. Além disso, a inoculação das raízes desencadeou resposta sistêmica nas folhas, através de alta indução do *LOX5* em 48 hai. Além do gene *LOX5* participar na resposta do milho a infecção por *C. graminicola*, conforme Maschietto et al. (2015) esse gene também está notavelmente envolvido na resistência do milho ao *F. verticillioides*. Ao avaliar duas linhagens contrastantes para resistência ao patógeno, observaram que a expressão do *LOX5* foi semelhante entre grãos não inoculados da linhagem resistente (CO433) e da suscetível (CO354). Na linhagem resistente a expressão gênica foi quadruplicada aos 7 dias após a inoculação.

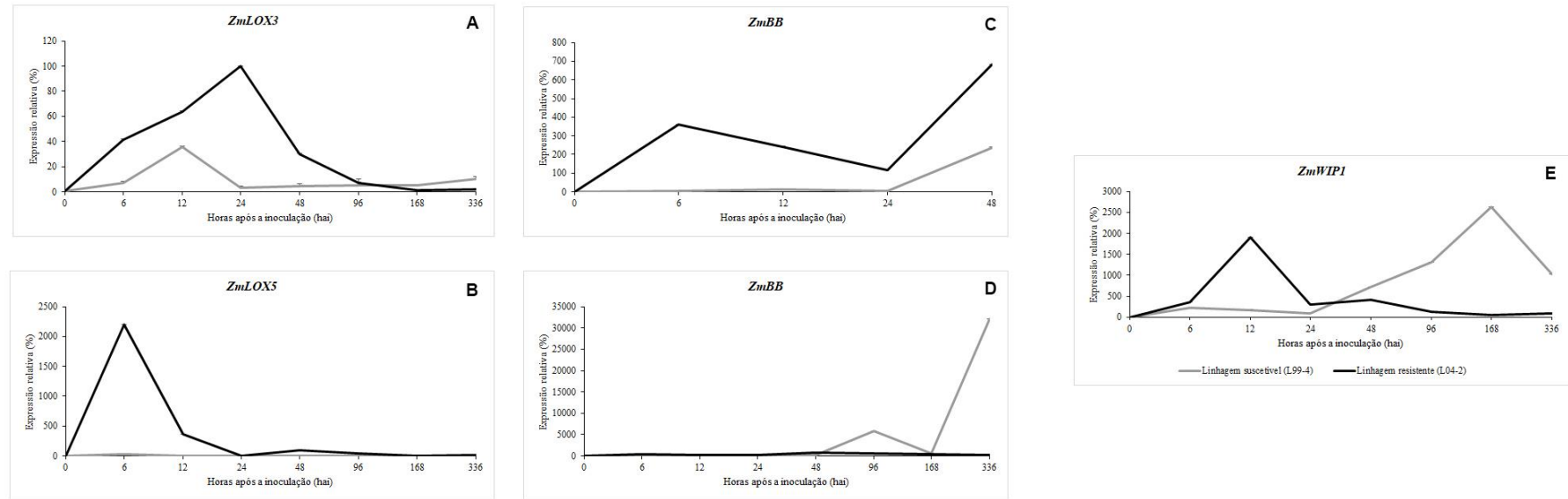


Figura 10 - Expressão dos genes (A) *ZmLOX3*, (B) *ZmLOX5*, (C e D) *ZmBB* e (E) *ZmWIP1* na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao *C. graminicola*, em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio de florescimento pleno - VT, em casa de vegetação.

De acordo com Maschietto et al. (2015), a resistência do milho ao *F. verticillioides*, responsável pela podridão da espiga, pode depender de uma ativação precoce dos genes que codificam para as lipoxigenases (LOXs). Ao simular a inoculação em espigas de plantas cultivadas à campo, através do fermento e da inoculação com água, observaram que vários genes da família 9-LOXs, incluindo o gene *LOX3*, foram superexpressos aos 3 e 7 dias após a inoculação, nos grãos da linhagem resistente (CO433), indicando que a mesma foi capaz de ativar uma transcrição rápida em resposta ao ferimento. Em contrapartida, a linhagem suscetível (CO354) apresentou resposta tardia ao ferimento, com expressão moderada dos genes *LOX3* e *LOX5*, aos 14 dias após a inoculação.

Para o gene *ZmBB*, a linhagem resistente L04-2 apresentou resposta rápida à inoculação do colmo com *C. graminicola*, em função de ter exibido um significativo aumento na expressão em 6 hai (Figura 10C). Contudo, a mesma evidenciou redução gradativa na expressão do gene *ZmBB* das 12 as 24 hai, e posteriormente, exibiu um segundo pico as 48 hai (Figura 10C). Expressão diferencial do gene *ZmBB* foi observada no período de 6 a 48 hai, com maior indução na linhagem L04-2. Em contrapartida, a linhagem suscetível L99-4 demonstrou resposta tardia ao patógeno (Figuras 10C), com expressão diferencial à L04-2, e superexpressão do gene *ZmBB* as 96 e 336 hai (Figura 10D).

O aumento imediato na expressão do gene *ZmBB* no colmo da linhagem resistente L04-2, em resposta à uma infecção por *C. graminicola*, também foi observada por Balmer et al. (2013), com indução nas raízes do gene *BB* em 12 hai. Por outro lado, resposta tardia da linhagem suscetível para o *ZmBB*, também foi relatado por Planchamp (2013), em folhas da variedade “Golden Jubilee”, suscetível ao patógeno, na qual a ativação do gene somente ocorreu aos 4 dias após a inoculação.

Para o gene *ZmWIP1*, a inoculação do colmo desencadeou dois picos de expressão nas duas linhagens estudadas. Para a linhagem resistente (L04-2) houve resposta rápida, com aumento na expressão as 6 hai, e superexpressão as 12 hai, seguido de queda nos demais períodos de avaliação (Figura 10E). Por outro lado, para a linhagem suscetível (L99-4) os resultados da análise evidenciaram expressão mais tardia desse gene, com um aumento expressivo a partir de 48 hai e superexpressão em 168 hai (Figura 10E). Resposta diferencial na expressão entre as linhagens foi observado inicialmente (6 a 24 hai) para a linhagem resistente, e mais tardiamente (48 a 336 hai) na linhagem suscetível à antracnose do colmo (Figura 10E).

Assim como para o gene *BB*, Balmer et al. (2013) também observaram um padrão de resposta local muito semelhante para o gene *WIP1*, após a inoculação de folhas e raízes com *C.*

graminicola. Enquanto que nas raízes o gene *WIP1* foi altamente induzido a partir de 12 hai, nas folhas essa indução ocorreu a partir de 48 hai. Além do gene *WIP1* ter sido ativado nas folhas, como resposta local à infecção pelo patógeno, esse gene também foi altamente induzido como resposta sistêmica, a partir de 24 hai das raízes. Indução sistêmica do *WIP1* também foi observada por Planchamp (2013), em raízes de milho, aos 14 dias após a inoculação das folhas com o mesmo patógeno.

A inoculação do colmo com *C. graminicola* desencadeou uma resposta rápida para o gene *ZmACO31* na linhagem resistente L04-2, uma vez que a mesma apresentou um pico de expressão as 6 hai, evidenciando expressão diferencial para esse gene. Essa resposta rápida da linhagem L04-2 foi seguida por uma queda acentuada na expressão do gene *ZmACO31* em 12 hai, com indução muito baixa até 336 hai (Figura 11A). Por outro lado, a linhagem suscetível L99-4 evidenciou um pequeno aumento na expressão do *ZmACO31* em 6 hai, seguido de baixa indução no período de 12 a 24 hai. Adicionalmente, a L99-4 apresentou um incremento na expressão (diferencial) desse gene de 48 a 96 hai, com queda a partir de 96 hai (Figura 11A).

Para Balmer et al. (2013), a inoculação de plantas de milho com *C. graminicola*, também desencadeou regulação positiva desse gene em folhas e raízes, como resposta local à infecção pelo patógeno. Nas folhas, o *ACO31* foi altamente induzido em 96 hai, enquanto nas raízes em 24 hai.

Ao avaliar a resposta do milho à rizobactéria *Pseudomonas putida* (KT2440), Planchamp; Glauser e Mauch-Mani (2015) observaram que a inoculação das raízes com rizobactérias, além de ter desencadeado resposta local, através da ativação dos genes *PR10.1* e *LOX3*, também induziu resposta sistêmica, regulando positivamente o gene *ACO31* nas folhas, aos 5 e 10 dias após a inoculação. Posteriormente, ao inocular as folhas com *C. graminicola*, observaram que as mesmas apresentaram redução drástica no crescimento do patógeno e conseqüentemente, na necrose foliar, sugerindo que a rizobactéria teve a capacidade de desencadear resistência sistêmica induzida no milho ao *C. graminicola*.

Para o gene *ZmCYP94B12*, o padrão de resposta das linhagens resistente e suscetível ao *C. graminicola*, foi muito semelhante até 24 hai, uma vez que ambas as linhagens apresentaram um pequeno incremento na expressão em 6 hai (Figura 11B). No período de 48 a 96 hai, evidenciou-se a expressão diferencial entre as linhagens de milho, onde a L99-4 (suscetível) demonstrou maior expressão desse gene, seguido de queda brusca em 168 hai, e retorno de incremento na indução do *ZmCYP94B12* as 336 hai (Figura 11B).

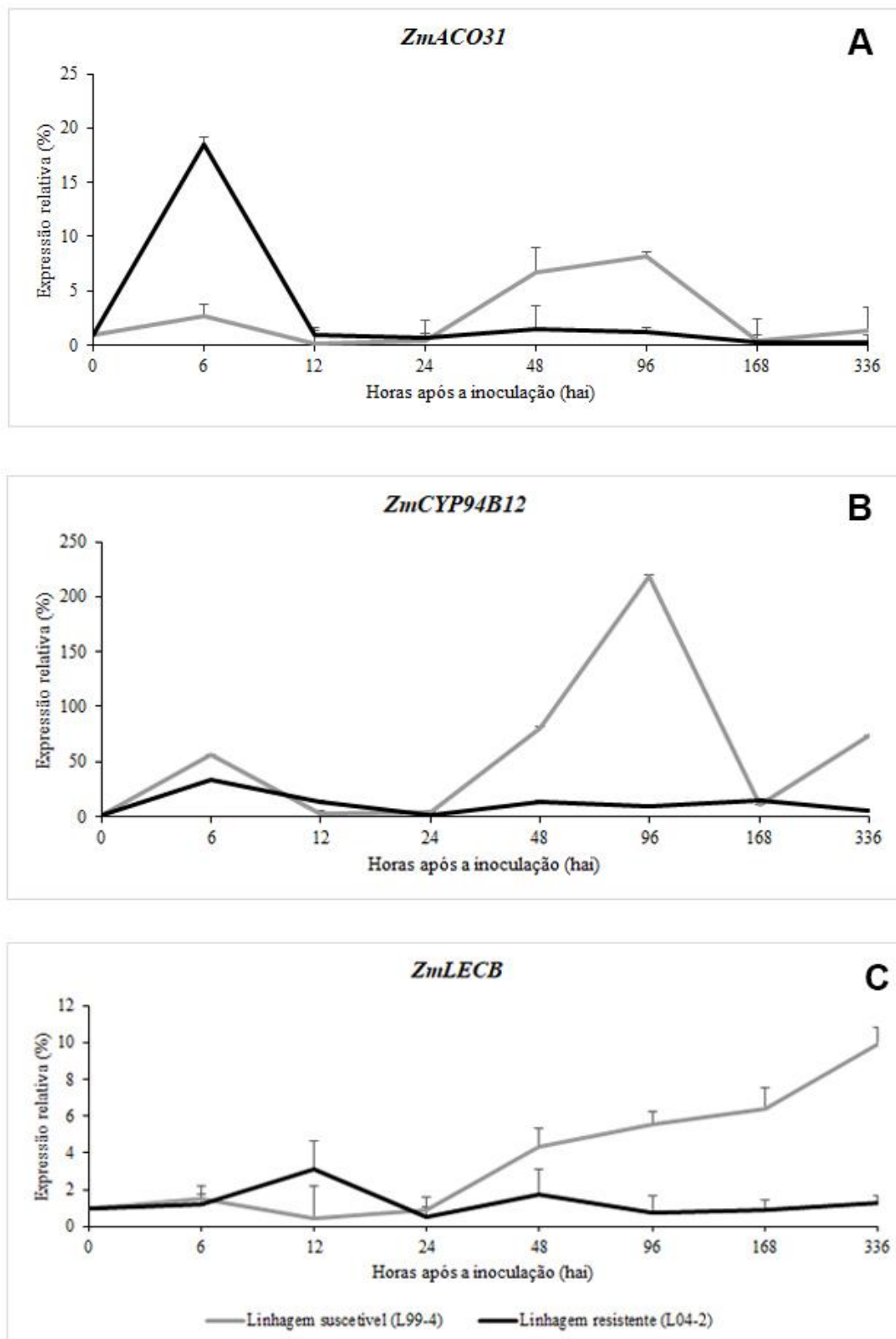


Figura 11 - Expressão dos genes (A) *ZmACO31*, (B) *ZmCYP94B12* e (C) *ZmLECB* na linhagem resistente (L04-9) e suscetível (L99-4) ao *C. graminicola*, em 0, 6, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a inoculação do colmo, no estágio de florescimento pleno - VT, em casa de vegetação.

De acordo com Balmer et al. (2013), o gene *CytP450* foi altamente induzido nas folhas e nas raízes do milho, em 96 hai, como resposta local à infecção por *C. graminicola*. Além disso, a inoculação das raízes ativou a expressão desse gene nas folhas em 48 hai, como resposta sistêmica ao patógeno. Conforme Planchamp (2013), a inoculação de folhas de milho com *C. graminicola*, desencadeou a indução do gene *CytP450* somente em plantas que não foram inoculadas com a rizobactéria *Pseudomonas putida* (KT2440), sugerindo que a mesma possa ter alterado a resposta do milho ao patógeno.

Além do gene *CYP94B12* ser induzido no milho como resposta à uma infecção por *C. graminicola*, para Kebede et al. (2018) esse gene também está envolvido na resistência ao *F. graminearum*. A inoculação das espigas com o patógeno, resultou num aumento da expressão do gene *CYP94B12* nas duas linhagens avaliadas, no entanto, aos 4 dias após a inoculação, a linhagem resistente (CO441) apresentou maior nível de expressão, comparativamente a linhagem suscetível (B73).

Resposta similar à infecção por *C. graminicola*, observada na linhagem suscetível (L99-4) para o gene *ZmCYP94B12*, foi verificada por Lambarey et al. (2020), para o gene *ZmCYA81A*, os quais pertencem à mesma família gênica do citocromo P450. Ao investigar os principais genes de defesa do milho ao *F. verticillioides*, através da avaliação de uma linhagem africana (CML144), suscetível ao patógeno, relataram que a infecção das espigas desencadeou regulação positiva do gene *ZmCYA81A*, aos 14 dias após a inoculação. De acordo com os autores, embora as espigas do milho tenham apresentado resposta de defesa ao *F. verticillioides*, ela não foi suficiente para prevenir a infecção pelo patógeno.

No presente trabalho, a inoculação do colmo com *C. graminicola* desencadeou resposta inicial semelhante nas duas linhagens avaliadas, para o gene *ZmLECB*, uma vez que não houve alteração significativa na expressão até 24 hai (Figura 11C). Porém, a partir de 96 hai, evidenciou-se a expressão diferencial para o gene *ZmLECB*, visto que enquanto a linhagem resistente L04-2 manteve baixa indução até 336 hai, a suscetível L99-4, mostrou incremento contínuo na expressão, com pico em 336 hai (Figura 11C).

Ao avaliar duas linhagens endogâmicas contrastantes quanto à resistência a podridão da espiga (*F. graminearum*), Kebede et al. (2018) observaram que após a inoculação das espigas com o patógeno, um gene que codifica para uma proteína contendo domínio beta de lectina (GRMZM2G076343), foi induzido tanto na linhagem resistente quanto na suscetível. No entanto, a linhagem resistente (CO441) demonstrou maior expressão em relação a linhagem suscetível (B73), aos 4 dias após a inoculação.

5.2.3 Efeito do estágio de desenvolvimento e da condição ambiental na expressão de genes de resistência

O nível de expressão dos genes *ZmACO31* e *ZmLECB*, foi muito semelhante entre as plantas inoculadas no estágio vegetativo V6 e no florescimento pleno (VT). Para os genes *ZmPR3* e *ZmLOX3*, os resultados evidenciaram apenas uma pequena diferença no nível de expressão entre os dois experimentos, sugerindo que tanto o estágio de desenvolvimento da planta no momento da inoculação, quanto a condição ambiental (câmara de crescimento ou casa de vegetação), não afetaram a expressão desses genes.

Em relação aos genes *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmCYP94B12*, as plantas inoculadas no estágio de florescimento pleno (VT), apresentaram maior nível de expressão, em comparação com aquelas inoculadas no estágio vegetativo V6. Provavelmente, essa diferença no nível de expressão gênica entre os dois experimentos (VT e V6), seja dependente do estágio de desenvolvimento, bem como da condição ambiental presente no ambiente de cultivo. Em relação à condição ambiental, destaca-se a temperatura, a qual apresentou média diária de 25°C (oscilando entre 20 e 32°C) na casa de vegetação, enquanto que em câmara de crescimento, a temperatura média diurna foi mantida em torno de 25°C e noturna de 20°C. Desta forma, a maior temperatura observada na casa de vegetação, possivelmente explicaria o maior nível de expressão dos genes estudados nas linhagens inoculadas no estágio VT (florescimento pleno da cultura).

De acordo com Salcedo et al. (2021), a condição ambiental influencia a resposta de defesa do milho ao *F. graminearum*. Ao avaliar duas linhagens contrastantes quanto à resistência à podridão do colmo de Fusarium, observaram que plantas cultivadas em câmara de crescimento, apresentaram maior nível de expressão de quatro genes de defesa, incluindo o gene *PR3*, em comparação com plantas cultivadas em casa de vegetação. Esses resultados corroboram com os obtidos neste trabalho, dado que o maior nível de expressão foi observado sob condição de alta temperatura. Em câmara de crescimento, Salcedo et al. (2021) mantiveram temperatura constante de 35°C, enquanto que no presente estudo, essa temperatura elevada somente foi observada na casa de vegetação.

Além da condição ambiental, sugere-se que o estágio de desenvolvimento também tenha afetado o nível de expressão dos genes *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmCYP94B12*. Em todos os trabalhos já realizados com as linhagens endogâmicas de milho L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível), desde as pesquisas iniciais de identificação de fontes de resistência à antracnose do colmo (TORRECIJA, 2012), controle genético da resistência

(MATIELLO; MÁXIMO; COELHO, 2021) e mapeamento molecular de genes de resistência da fonte L04-2 (TASIOR, 2014; ROMANEK et al., 2017), as plantas sempre foram inoculadas com *Colletotrichum graminicola* no estágio de florescimento pleno - VT. Ou seja, a resistência genética encontrada na fonte L04-2 refere-se a gene(s) com maior nível de expressão gênica nesse estágio de desenvolvimento (VT).

Ao avaliar a expressão basal do gene *ZmWAK*, o qual está envolvido na resistência quantitativa do milho ao carvão do pendão (*Sporisorium reilianum*), Zuo et al. (2015) observaram que nas plântulas da linhagem resistente Ji1037, o nível de expressão no mesocótilo foi cerca de 10 vezes superior ao das folhas e raízes. Em contrapartida, em plantas no estágio de pré-pendoamento, o gene *ZmWAK* foi expresso principalmente no primeiro internódio acima da superfície do solo e na folha bandeira. Além disso, as raízes no estágio de pré-pendoamento, exibiram expressão duas vezes superior ao das raízes em estágio vegetativo V3.

Além de alterar o nível de expressão de alguns genes de defesa, o estágio de desenvolvimento e a condição ambiental também afetaram consideravelmente a velocidade de resposta da linhagem L04-2 ao *C. graminicola*. A fonte de resistência L04-2, inoculada no estágio VT, apresentou resposta rápida à inoculação do colmo com o patógeno, uma vez que exibiu um significativo aumento na expressão dos genes *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX3*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmACO31*, logo após a inoculação, e para a maioria desses, atingiu o pico de expressão em períodos anteriores à linhagem suscetível L99-4, inoculada no mesmo estágio de desenvolvimento (Tabela 4).

Tabela 4 - Expressão relativa máxima e período após a inoculação para atingir o pico máximo da expressão gênica nas linhagens L04-2 (resistente) e L99-4 (suscetível) à antracnose do colmo no estágio de florescimento pleno - VT.

Genes	L04-2 (resistente)		L99-4 (suscetível)	
	Expressão relativa (%)	Período após a inoculação (hai)	Expressão relativa (%)	Período após a inoculação (hai)
<i>ZmPRI</i>	1499	48	6383	168
<i>ZmPR3</i>	223	12	399	48
<i>ZmPR5</i>	1663	48	9810	96
<i>ZmPR10.1</i>	5149	24	1675	336
<i>ZmLOX3</i>	100	24	36	12
<i>ZmLOX5</i>	2195	6	31	6
<i>ZmBB</i>	680	48	32094	336
<i>ZmWIP1</i>	1911	12	2628	168
<i>ZmACO31</i>	19	6	8	96

A inoculação do colmo com *C. graminicola* no estágio VT, resultou em elevados níveis de expressão dos genes *ZmPR1*, *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmBB* e *ZmWIP1* na linhagem suscetível, superando os picos de expressão atingidos pela linhagem resistente (Tabela 4). Contudo, a superexpressão desses genes na linhagem suscetível L99-4 ocorreu tardiamente (depois de 48 hai), sugerindo que o parasitismo da interação patógeno x hospedeiro já estava estabelecido no local, tornando impossível acionar um mecanismo de defesa para inibir a colonização e o crescimento do patógeno no colmo.

No estágio V6, a linhagem suscetível L99-4 apresentou maior nível de expressão do gene *ZmPR10.1*, comparado à L04-2, na maior parte do período de avaliação experimental. Adicionalmente, no estágio VT, a linhagem suscetível L99-4 exibiu maior nível de expressão dos genes *ZmCYP94B12* e *ZmLECB*, em comparação com a linhagem resistente L04-2. Como a linhagem L99-4, continua respondendo com suscetibilidade ao patógeno, sugere-se que a indução dos genes *ZmPR10.1*, *ZmCYP94B12* e *ZmLECB*, nessa linhagem continue acontecendo, entretanto, o produto desses alelos seja resultado de eventos de mutação espontânea de sentido errado, sintetizando a partir da tradução, cadeias polipeptídicas com propriedades diferentes dos genes não mutados, não sendo mais eficientes como mecanismo de defesa para a planta que carrega a possível mutação.

A mutação gênica ou mutação de ponto é a fonte original de variação genética, sendo caracterizada por alterações na sequência de nucleotídeos da molécula de DNA, que alteram a sequência dos aminoácidos na cadeia polipeptídica codificada pelo gene, induzindo alteração fenotípica, embora possam ocorrer mutações neutras, as quais não apresentam efeito sobre o fenótipo. Além da mutação de ponto ser muito rara, na grande maioria das vezes ela não ocorre no sentido de fornecer uma maior adaptação ao indivíduo (RAMALHO et al., 2012).

As mutações de ponto podem ocorrer pela adição, deleção ou substituição de uma base. A adição ou a deleção de um único par de bases no DNA, pode resultar numa mudança no quadro aberto de leitura do gene a partir desse ponto. Assim, toda a sequência de aminoácidos traduzida a partir do sítio mutante é alterada, não tendo relação com a sequência original. Em relação à substituição de uma base, pode ocorrer uma mutação sem sentido, a qual resulta no aparecimento de um códon de terminação no mRNA, impedindo a síntese completa da cadeia polipeptídica original. As mutações sem sentido levam ao término prematuro da tradução, tendo um efeito considerável no funcionamento normal para aquela proteína. Além disso, tanto as mutações sem sentido quanto a adição ou a deleção de uma base, resultam na perda completa da estrutura e da função normal da proteína (RAMALHO et al., 2012).

No estágio vegetativo V6, sugere-se que dentre os genes analisados, o gene *ZmBB* teve maior contribuição na resistência do colmo ao *C. graminicola*, uma vez que a expressão relativa na linhagem fonte de resistência (L04-2), aumentou em cerca de 900 vezes em 6 hai. O gene *ZmBB* codifica para inibidores de proteinases, os quais são capazes de suprimir a atividade enzimática de microrganismos fitopatogênicos (TREMACOLDI, 2009).

No estágio de florescimento pleno (VT), destaca-se que o gene *ZmLOX5* evidenciou maior participação para a resistência do colmo ao patógeno, visto que a expressão relativa na fonte L04-2, aumentou em aproximadamente 2200 vezes em 6 hai. O gene *ZmLOX5* codifica para lipoxigenases, enzimas que catalisam a oxigenação de ácidos graxos em células que sofreram danos físicos, resultando na produção de um hidroperóxido, que é rapidamente metabolizado para produzir diversos elementos de sinalização ou moléculas com atividade antimicrobiana (FEUSSNER; WASTERACK, 2002; YAN et al., 2012).

6 CONCLUSÕES

No estágio vegetativo V6, houve expressão diferencial dos genes *ZmPR5*, *ZmLOX3*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmCYP94B12* precocemente (6 hai), com maior nível de indução na linhagem resistente L04-2.

No estágio de florescimento pleno (VT), ocorreu expressão diferencial dos genes *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX3*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmACO31* em até 12 hai, com maior indução na linhagem resistente L04-2.

O pico de expressão dos genes *ZmBB* e *ZmWIP1*, no estágio V6, foi atingido previamente na linhagem resistente L04-2, em relação à linhagem suscetível L99-4.

No estágio VT, o pico de expressão dos genes *ZmPR1*, *ZmPR3*, *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmACO31*, ocorreu anteriormente na linhagem resistente L04-2 em relação à linhagem suscetível L99-4.

A expressão dos genes *ZmPR5*, *ZmPR10.1*, *ZmLOX5*, *ZmBB*, *ZmWIP1* e *ZmCYP94B12* foi afetada pelo estágio de desenvolvimento da planta, com maior expressão no estágio de florescimento pleno - VT.

Dos genes estudados, no estágio VT, o gene *ZmWIP1* evidenciou um padrão de expressão notavelmente contrastante entre as linhagens, confirmando a indução da resistência precocemente na linhagem resistente L04-2, e tardiamente na linhagem suscetível L99-4.

O gene *ZmBB* teve maior contribuição para a resistência ao *C. graminicola* no estágio vegetativo V6 e o gene *ZmLOX5* no estágio de florescimento pleno (VT).

A resistência à antracnose do colmo na linhagem L04-2, oriunda de germoplasma de milho tropical, é explicada pela rápida indução de diferentes genes de defesa da planta, confirmando a elevada resistência ao *C. graminicola*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Ethylene biosynthesis – identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, [s. n.], p. 170 - 174, 1979.
- ALEXANDER, D. *et al.* Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, [s. n.], p. 7327 - 7331, 1993.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245 - 5250, 2004.
- ASIF, M. *et al.* Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5227 - 5229, 2006.
- AUBERT, Y. *et al.* CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 13, p. 3879 - 3892, 2015.
- BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V. E.; BERGSTROM, G. C. A major gene for resistance to anthracnose leaf blight in maize. **Phytopathology**, v. 77, n. 6, p. 957 - 959, 1987.
- BALMER, D. *et al.* Induced resistance in maize is based on organ-specific defense response. **The Plant Journal**, v. 74, [s. n.], p. 213 - 225, 2013.
- BANDARA, A. Y. *et al.* Stalk rot resistant sorghum genotypes are resilient to pathogen-mediated photosystem II quantum yield retardation. **Crop Protection**, v. 124, n. 104852, p. 1 - 6, 2019.
- BARBOSA, C. A. **Manual da cultura do milho**, Viçosa: Agro Juris, 2010. 574 p.
- BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p. 596 - 608, 1999.
- BLUM, L. E. B. *et al.* Desfolha, população de plantas e precocidade do milho afetam a incidência e a severidade de podridões do colmo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 805 - 811, 2003.
- BOMBARDELLI, R. G. H.; COELHO, C. J.; MATIELLO, R. R. Expressão diferencial do gene de resistência *ZmPRI* à antracnose foliar em linhagens endogâmicas de milho. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 56021 - 56034, 2020.
- BYRNES, K. J.; CARROL, R. B. Fungi causing stalk rot of conventional-tillage and no-tillage corn in Delaware. **Plant Disease**, v. 70, n. 3, p. 238 - 239, 1986.
- CADENA-GOMEZ, G.; NICHOLSON, R. L. Papilla formation and associated peroxidase activity: A non-specific response to attempted fungal penetration of maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 31, [s. n.], p. 51 - 67, 1987.

CALLAWAY, M. B.; SMITH, M. E.; COFFMAN, W. R. Effect of anthracnose stalk rot on grain yield and related traits of maize adapted to the northeastern United States. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 72, [s. n.], p. 1031 - 1036, 1992.

CAMPOS, L. J. M. *et al.* Physiological and biophysical alterations in maize plants caused by *Colletotrichum graminicola* infection verified by OJIP study. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, [s. n.], p. 674 - 683, 2021.

CAMPOS, N. A. *et al.* Otimização de protocolos de extração de RNA de raiz de milho (*Zea mays*) visando estudos moleculares de alta sensibilidade. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. Anais. Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. p. 97 - 104.

CARSON, M. L.; HOOKER, A. L. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 71, n. 11 p. 1190 - 1196, 1981.

CARSON, M. L.; HOOKER, A. L. Reciprocal translocation testcross analysis of genes for anthracnose stalk rot resistance in a corn inbred line. **Phytopathology**, v. 72, n. 2, p. 175 - 177, 1982.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **Antracnose do sorgo** (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1998. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 28).

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

CHEN, K.; FESSEHAIE, A.; ARORA, R. Selection of reference genes for normalizing gene expression during seed priming and germination using qPCR in *Zea mays* and *Spinacia oleracea*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 2, p. 478 - 487, 2012.

CHEN, X. *et al.* *Fusarium graminearum* exploits ethylene signaling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. **New Phytologist**, v. 182, [s. n.], p. 975 - 983, 2009.

CHEN, Z. Y. *et al.* Inhibition of plant pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1320 - 1324, 1999.

CHRISTENSEN, S. A. *et al.* The novel monocot-specific 9-lipoxygenase *ZmLOX12* is required to mount an effective jasmonate-mediated defense against *Fusarium verticillioides* in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 11, p. 1263 - 1276, 2014.

COELHO, C. J. *et al.* Sequencing and gene expression studies for Al tolerance in contrasting genotypes of tropical maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1 - 10, 2021.

COELHO, R. M. S. *et al.* Controle genético da antracnose foliar em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 640 - 643, 2001.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Safra 2021/22, 8º levantamento, v. 9, n. 8, p. 1 - 100, maio, 2022.

COSTA, R. V. *et al.* Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 122 - 128, 2010.

COSTA, R. V. *et al.* **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 100).

COSTA, R. V. *et al.* **Raças de *Colletotrichum graminicola* patogênicas ao milho no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2014. 31 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 96).

COSTA, R. V. *et al.* Yield losses in of-season corn crop due to stalk rot disease. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, [s. n.], p. 1 - 10, 2019.

COTA, L. V. *et al.* **Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 5 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 120).

COTA, L. V. *et al.* **Histórico e perspectivas das doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 193).

COTA, L. V. *et al.* Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in brazilian conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 160, [s. n.], p. 680 - 684, 2012.

DENTI, E. A.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência das podridões da base do colmo e no rendimento de grãos do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 635 - 639, 2001.

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

DOWD, P. F. *et al.* Identification of a maize *Zea mays* chitinase allele sequence suitable for a role in ear rot fungal resistance. **Agri Gene**, v. 7, [s. n.], p. 15 - 22, 2018.

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

FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. **Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 13).

FEUSSNER I.; WASTERNAK C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 532, [s. n.], p. 275 - 297, 2002.

FREIRE, M. G. M. *et al.* Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, [s. n.], p. 61 - 68, 2002.

FREY, T. J. *et al.* Fitness evaluation of *Rcg1*, a locus that confers resistance to *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. using near-isogenic maize hybrids. **Crop Science**, v. 51, n. 4, p. 1551 - 1563, 2011.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445 - 1454, 2004.

GALLIE, D. R.; YOUNG, T. E. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, [s. n.], p. 267 - 281, 2004.

GAO, X. *et al.* Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisina. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 8, p. 922 - 933, 2007.

GAO, X. *et al.* Maize 9-lipoxygenase ZmLOX3 controls development, root-specific expression of defense genes, and resistance to root-knot nematodes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 1, p. 98 - 109, 2008.

GATCH, E. W.; MUNKVOLD, G. P. Fungal species composition in maize stalks in relation to european corn borer injury and transgenic insect protection. **Plant Disease**, v. 86 n. 10, p. 1156 - 1162, 2002.

GUIMARÃES, L. J. M.; COSTA, R. V. Manejo de doenças no milho. **Cultivar Grandes Culturas**, v. 17, n. 211, p. 6 - 8, 2016.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R. L. Resistance of maize to anthracnose: Changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, v. 67, [s. n.], p. 251 - 258, 1977a.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R. L. Resistance of maize to anthracnose: Effect of light intensity on lesion development. **Phytopathology**, v. 67, [s. n.], p. 247 - 250, 1977b.

HANWAY, J. J. **How a corn plant develops**, Iowa: Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service Ames, 1966. 21 p.

HEITZ, T. *et al.* Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 9, p. 6296 - 6306, 2012.

HOLTON, T. A.; CORNISH, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, [s. n.], p. 1071 - 1083, 1995.

HWANG, I. S.; HWANG, B. K. Role of the pepper cytochrome P450 gene *CaCYP450A* in defense responses against microbial pathogens. **Planta**, v. 232, [s. n.], p. 1409 - 1421, 2010.

IBELLI, A. M. G.; REGITANO, L. C. A.; NICIMURA, S. C. M. Extração de RNA. In: REGITANO, L. C. A. *et al.* **Protocolos em biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. p. 9 - 13.

- JENNS, A. E.; LEONARD, K. J. Effects of illuminance on the resistance of inbred lines of corn to isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 75, n. 3, p. 281 - 286, 1985.
- JIRAK-PETERSON, J. C.; ESKER, P. D. Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 601 - 610, 2011.
- JUNG, M. *et al.* Generation-means analysis and quantitative trait locus mapping of anthracnose stalk rot genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, [s. n.], p. 413 - 418, 1994.
- KEBEDE, A. Z. *et al.* Transcriptome profiling of two maize inbreds with distinct responses to Gibberella ear rot disease to identify candidate resistance genes. **BMC Genomics**, v. 19, n. 131, p. 1 - 12, 2018.
- KOO, A. J. K.; COOKE, T. F.; HOWE, G. A. Cytochrome P450 *CYP94B3* mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 108, n. 22, p. 9298 - 9303, 2011.
- LAMBAREY, H. *et al.* Transcriptomic Analysis of a Susceptible African Maize Line to Fusarium verticillioides Infection. **Plants**, v. 9, n. 1112, p. 1 - 23, 2020.
- LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 397, p. 1 - 16, 2014.
- LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1800, [s. n.], p. 190 - 201, 2010.
- LEONARD, K. J.; THOMPSON, D. L. Effects of temperature and host maturity on lesion development of *Colletotrichum graminicola* on corn. **Phytopathology**, v. 66, [s. n.], p. 635 - 639, 1976.
- LIM, S. M.; WHITE, D. G. Estimates of heterosis and combining ability for resistance of maize to *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 68, [s. n.], p. 1336 - 1342, 1978.
- LIMA, M. L. F.; MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões proteicos e isoenzimáticos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 12 - 16, 2002.
- LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, [s. n.], p. 3311 - 3336, 2009.
- LIPPS, P. E. Influence of inoculum from buried and surface corn residues on the incidence of corn anthracnose. **Phytopathology**, v. 75, n. 11, p. 1212 - 1216, 1985.
- LIPPS, P. E. Spread of corn anthracnose from surface residues in continuous corn and corn-soybean rotation plots. **Phytopathology**, v. 78, n. 6, p. 756 - 761, 1988.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, v. 25, [s. n.], p. 402 - 408, 2001.

LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. **Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR**. Embrapa Caprinos e Ovinos - Documentos (INFOTECA-E), Sobral, 2014.

MANNING, K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 45 - 50, 1991.

MANOLI, A. *et al.* Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, [s. n.], p. 807 - 815, 2012.

MASCHIETTO, V. *et al.* Resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in maize inbred lines involves an earlier and enhanced expression of lipoxygenase (LOX) genes. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, [s. n.], p. 9 - 18, 2015.

MATIELLO, R. R. *et al.* Comparison of yield damages of tropical maize hybrids caused by anthracnose stalk rot. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 128 - 132, 2013.

MATIELLO, R. R. *et al.* Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot (*Colletotrichum graminicola*) in tropical maize inbred lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, [s. n.], p. 179 - 184, 2012.

MATIELLO, R. R. **Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativas de danos na produção**. 2004. 116 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MATIELLO, R. R.; MÁXIMO, D. S.; COELHO, C. J. Genetic control of anthracnose stalk rot resistance in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, [s. n.], p. 1 - 8, 2021.

MÁXIMO, D. S. **Controle genético da resistência de milho à antracnose do colmo**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

MIMS, C. W.; VAILLANCOURT, L. J. Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. **Phytopathology**, v. 92, n. 7, p. 803 - 812, 2002.

MIRANDA, V. J. *et al.* Comparative transcriptomic analysis indicates genes associated with local and systemic resistance to *Colletotrichum graminicola* in maize. **Nature**, v. 7, n. 2483, p. 1 - 14, 2017.

MOSOLOV, V. V. *et al.* The Biological significance of proteinase-inhibitors in plants. **Plant Science Letters**, v. 7, [s. n.], p. 77 - 80, 1976.

NICHOLSON, R. L.; MORAES, W. B. C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v. 70, n. 3, p. 255 - 261, 1980.

NIDERMAN, T. *et al.* Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with

inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, v. 108, [s. n.], p. 17 - 27, 1995.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559 - 1582, 2006.

OHKAWA, H. *et al.* Molecular mechanisms of herbicide resistance with special emphasis on cytochrome P450 monooxygenases. **Plant Biotechnology**, v. 15, [s. n.], p. 173 - 176, 1998.

PERFECT, S. E. *et al.* *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, [s. n.], p. 186 - 198, 1999.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, [s. n.], p. 347 - 352, 1995.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002 - 2007, 2001.

PFAFFL, M. W. *et al.* Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, [s. n.], p. 509 - 515, 2004.

PINTO, N. F. J. A.; SANTOS, M. A.; WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 233, p. 82 - 94, 2006.

PLANCHAMP, C. **Direct and indirect effects of the rhizobacteria *Pseudomonas putida* KT2440 on maize plants**. 2013. 157 f. Dissertation (Doctor in Sciences) - University of Neuchâtel, Neuchâtel, 2013.

PLANCHAMP, C.; GLAUSER, G.; MAUCH-MANI, B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 719, p. 1 - 10, 2015.

POLKO, J. K.; KIEBER, J. J. 1-Aminocyclopropane 1-Carboxylic Acid and Its Emerging Role as an Ethylene-Independent Growth Regulator. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1602, p. 1 - 9, 2019.

POSTOLLEC, F. *et al.* Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848 - 861, 2011.

PROCHNO, H. C. *et al.* Genetic resistance of maize inbred lines to anthracnose leaf blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, [s. n.], p. 55 - 61, 2016.

QUEIROZ, R. J. B. **Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica**. 2010, 154 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

RAMALHO, M. A. P. *et al.* **Genética na agropecuária**, 5 ed. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 566 p.

- RAUSCHER, M. *et al.* PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. **The Plant Journal**, v. 19, n. 6, p. 625 - 633, 1999.
- REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 80 p. 1996.
- ROHRMEIER, T.; LEHLE, L. *WIP1*, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 22, [s. n.], p. 783 - 792, 1993.
- ROMANECK, C. *et al.* QTL mapping to anthracnose leaf blight resistance in tropical maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, [s. n.], p. 390 - 398, 2017.
- ROSSET, J. S. *et al.* Comportamento de híbridos de milho segunda safra quanto à incidência de podridões na Região Oeste do Paraná. **Scientia Agropecuaria**, v. 4, n. 3, p. 219 - 228, 2013.
- RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, [s. n.], p. 425 - 449, 1990.
- SALCEDO, A. *et al.* Comparative transcriptome analysis of two contrasting maize inbred lines provides insights on molecular mechanisms of stalk rot resistance. **PhytoFrontiers**, v. 1, [s. n.], p. 314 - 329, 2021.
- SANGOI, L. *et al.* Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados com diferentes densidades de plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 17 - 21, 2000.
- SCHALL, R. A.; NICHOLSON, R. L.; WARREN, H. L. Influence of light on maize anthracnose in the greenhouse. **Phytopathology**, v. 70, n. 10, p. 1023 - 1026, 1980.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101 - 1108, 2008.
- SCHULTHEISS, H. *et al.* Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. **Plant Science**, v. 165, [s. n.], p. 1275 - 1280, 2003.
- SHAN, X. C.; GOODWIN, P. H. Silencing an ACC oxidase gene affects the susceptible host response of *Nicotiana benthamiana* to infection by *Colletotrichum orbiculare*. **Plant Cell Reports**, v. 25, [s. n.], p. 241 - 247, 2006.
- SHI, F. *et al.* Expression profile analysis of maize in response to *Setosphaeria turcica*. **Gene**, v. 659, [s. n.], p. 100 - 108, 2018.
- SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, v. 104, [s. n.], p. 971 - 979, 2007.
- STEIBEL, J. P. *et al.* A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146 - 152, 2009.

TASIOR, D. **Estimativa de parâmetros genéticos e mapeamento molecular de QRLs à antracnose do colmo em milho tropical**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

TOMAN JÚNIOR, J.; WHITE, D. G. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot of corn. **Phytopathology**, v. 83, n. 9, p. 981 - 986, 1993.

TORRECIJA, M. **Resistência de linhagens endogâmicas de milho tropical à inoculação por *Colletotrichum graminicola***. 2012. 35 f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta grossa, 2012.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 44 p.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, v. 20, [s. n.], p. 1736 - 1737, 2008.

USDA - United States Department of Agriculture. World Agricultural Production, WAP 5-22, May, 2022.

VAN DE POEL, B.; SMET, D.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene and Hormonal Cross Talk in Vegetative Growth and Development. **Plant Physiology**, v. 169, [s. n.], p. 61 - 72, 2015.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, [s. n.], p. 135 - 162, 2006.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, [s. n.], p. 259 - 288, 1980.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1 - 12, 2002.

VARGAS, W. A. *et al.* Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. **Plant Physiology**, v. 158, [s. n.], p. 1342 - 1358, 2012.

WARREN, H. L. Survival of *Colletotrichum graminicola* in corn kernels. **Phytopathology**, v. 67, n. 2, p. 160 - 162, 1977.

WEIHMANN, F. *et al.* Correspondence between symptom development of *Colletotrichum graminicola* and fungal biomass, quantified by a newly developed qPCR assay, depends on the maize variety. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 94, p. 1 - 14, 2016.

YAN, Y. *et al.* Disruption of *OPR7* and *OPR8* reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense. **The Plant Cell**, v. 24, [s. n.], p. 1420 - 1436, 2012.

YUAN, G. *et al.* Different Gene Expressions of Resistant and Susceptible Maize Inbreds in Response to *Fusarium verticillioides* Infection. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, [s. n.], p. 925 - 935, 2013.

YUAN, G. *et al.* Transcriptomic responses in resistant and susceptible maize infected with *Fusarium graminearum*. **The Crop Journal**, v. 8, [s. n.], p. 153 - 163, 2020.

ZHANG, X. *et al.* Differentially expressed proteins associated with Fusarium head blight resistance in wheat. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1 - 10, 2013.

ZUO, W. *et al.* A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. **Nature Genetics**, v. 47, n. 2, p. 151 - 157, 2015.