



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



RUBIA CRISTIANI CAMOCHENA

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO À MANCHA OCULAR E
CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2009

RUBIA CRISTIANI CAMOCHENA

**REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO À MANCHA OCULAR E
CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE CAUSAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Idalmir dos Santos

PATO BRANCO

2009

C185r

Camochena, Rubia Cristiani

Reação de genótipos de milho à mancha ocular e caracterização do agente causal / Rubia Cristiani Camochena.

Pato Branco. UTFPR, 2009

66 f. : il. : ; 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Idalmir dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, 2009.

Bibliografia: f. 62 – 66.

1. Milho. 2. Mancha ocular. 3. Patometria. 4. Resistência genética. I. Santos, Idalmir dos, orient. II. Mazaro, Sergio Miguel, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD 630

CDD: 633.15



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco
Gerência de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 003

Reação de genótipos de milho à mancha ocular causada e caracterização do agente causal

por

Rubia Cristiani Camochena

Dissertação apresentada às quatorze horas do dia seis de fevereiro de dois mil e nove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho. . APROVADO

Banca examinadora:

Dr. Ricardo Trezzi Casa
UDESC

Dra. Rosângela Dallamole Giaretta
UFV

Dr. Sérgio Miguel Mazaró
UTFPR

Dr. Idalmir dos Santos
UTFPR
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Idemir Citadin
Coordenador do PPGA

Dedico este trabalho a meus pais, Mário e Marli, e irmãos, e a meu marido Cleomar, por se constituírem diferentemente como pessoas, igualmente queridos e admiráveis em essência, são estímulos que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia, meus sinceros agradecimentos por terem aceitado se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Idalmir dos Santos, pela amizade, incentivo, paciência, e auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e normatização desta Dissertação.

Ao Prof. Sérgio Miguel Mazaro, pela sua co-orientação e auxílio no desenvolvimento da dissertação, e também pela sua disciplina, que esclareceu dúvidas e auxiliou muito nos trabalhos.

Às colegas de mestrado Lúcia e Greice pela amizade e por compartilharem momentos difíceis e de alegria durante o curso, e aos estagiários Malagi, Claudia, Adauto e à colega de mestrado Claudia Manteli, pelo apoio e realização dos trabalhos de campo.

Ao querido Prof. Jamhour, sem o qual a organização e formatação da nossa dissertação não teria a mesma qualidade.

Ao meu marido Cleomar, pelo constante incentivo e palavras de conforto nos momentos de dificuldade e paciência nas minhas ausências destinadas ao estudo.

A todos que de alguma forma auxiliaram e prestaram seu apoio durante esta caminhada e ofereceram sua amizade.

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PPGA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade da realização do curso, e a todos os membros integrantes, agradeço pela troca de conhecimentos, companheirismo e amizade.

E, finalmente, a Deus pela oportunidade e privilégio que nos foi dado para compartilhar tanta experiência, e ao frequentar este curso, atentar para assuntos novos, que antes não faziam parte de nossas vidas.

“Querem que vos ensine um modo de chegar à ciência verdadeira?
Aquilo que se sabe, saber que se sabe, aquilo que não se sabe, saber
que não se sabe, na verdade, é este o saber!” (Autor desconhecido)

RESUMO

CAMOCHENA, Rubia Cristiani. Reação de genótipos de milho à mancha ocular e caracterização do agente causal. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Linha de Pesquisa: Sistemas de Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2009.

A investigação da mancha ocular do milho foi baseada no seu agente causal e na elaboração de uma escala diagramática da doença que auxiliou na avaliação da sensibilidade dos genótipos de milho, correlacionada com a resposta de defesas bioquímicas da planta. Na primeira etapa do trabalho, 35 isolados de *Kabatiella zeae*, de diferentes materiais genéticos de milho, foram avaliados quanto à coloração e aspecto das colônias e mensuração dos esporos do fungo em BSA. Os meios de cultura utilizados foram BSA (batata, sacarose e ágar), MA (malte e ágar), AvA (aveia e ágar) e FA (fubá de milho e ágar). Discos de 5 mm de diâmetro, foram colocadas no centro das placas contendo os respectivos meios de cultura. As placas foram incubadas a 24° C com fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias. As características das colônias e mensuração dos conídios foram avaliadas em BSA, e o crescimento radial, nos quatro meios. Houve diferença entre todos os isolados em relação aos meios de cultura. Observou-se que a dimensão dos esporos variou de 3-4 x 27-33 µm, de largura e comprimento, respectivamente, e que 80% dos isolados apresentaram coloração clara (rosa) e aspecto coreáceo e enrugado, e o maior crescimento micelial foi observado no meio BSA. A escala diagramática foi desenvolvida coletando-se 110 folhas doentes, aleatoriamente no campo, eliminando-se 20 cm da extremidade, sendo utilizados os 20 cm seguintes. Foi mensurada a área foliar e área das lesões para determinação dos limites de severidade mínima e máxima da doença, e os níveis intermediários calculados matematicamente. Os níveis de severidade observados em campo seguiram incrementos logarítmicos, representando: 0,9; 2,0; 4,0; 9,0; 18,0; 32,0 e 51,0% da área foliar lesionada. A validação da escala consistiu-se em duas etapas: na primeira, 10 avaliadores, com experiência na avaliação de doenças em plantas, avaliaram 30 folhas com diferentes níveis de severidade, com e sem o uso da escala diagramática. Na segunda etapa, outros 10 avaliadores, sem experiência, fizeram as mesmas avaliações, com e sem uso da escala diagramática. Por meio de regressão linear, foram confrontados valores de severidade reais e estimados, sendo analisadas a acurácia e a precisão dos avaliadores. Constatou-se melhora na acurácia e na precisão das estimativas visuais efetuadas com o auxílio da escala diagramática. A reação de genótipos de milho à mancha ocular foi avaliada no município de Pato Branco-PR na safra 2006/2007, com 33 híbridos e na safra 2007/2008, com 10 híbridos em duas épocas de semeadura e no município de Palma Sola-SC, na safra 2007/2008 com 8 híbridos. Os híbridos AG 9020 e SPRINT apresentaram maior suscetibilidade à doença, em relação à AS 1565 e DKB 234, repetindo este comportamento nos dois locais e épocas de cultivo. A enzima peroxidase foi observada em maior concentração nas folhas dos híbridos de milho com menor severidade de mancha ocular.

Palavras-chave: *Zea mays*. Micologia. Patometria. Resistência Genética.

ABSTRACT

CAMOCHENA, Rubia Cristiani. Reaction of corn genotypes to eyespot and characterization of the causal agent. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2009.

This investigation on corn eyespot was based on its causal agent and on the preparation of a diagrammatic scale that helped evaluate the reaction of corn genotypes, in correlation with the response obtained from the plant's biochemical defenses. In the first step of the study, 35 *Kabatiella zeae* isolates from different corn genetic materials had their colonies evaluated for color and aspect, and their spores measured in PSA medium. The following culture media were used: PSA (potato, sucrose, agar), MA (malt and agar), OA (oat and agar) and CA (corn flour and agar). Disks (5 mm in diameter) were placed in the center of Petri dishes containing the respective culture media. The dishes were incubated at 24°C and a 12-hour photoperiod for 10 days. Colony traits and conidia measurements were evaluated in PSA, while radial growth was evaluated in the four media. There were differences between all isolates with regard to the culture media. Spore size varied from 3-4 × 27-33 µm in width and length, respectively, and 80% of the isolates had a light color (pink) and a coriaceous and wrinkled aspect; the highest mycelial growth was observed in the PSA medium. A diagrammatic scale was developed by randomly collecting 110 diseased leaves in the field, discarding 20 cm from the leaf tip, and using the next 20 cm. Measurements were made for leaf area and the area containing lesions in order to determine minimum and maximum severity limits of the disease; intermediate levels were calculated mathematically. The severity levels observed in the field followed logarithmic increases, representing: 0.9; 2.0; 4.0; 9.0; 18.0; 32.0; and 51.0% of leaf area with lesions. Scale validation consisted of two steps: in the first, 10 evaluators experienced in plant disease evaluations assessed 30 leaves with different severity levels, both using and not using the diagrammatic scale. In the second step, another 10 naive (without experience) evaluators performed the same evaluations, both using and not using the diagrammatic scale. Actual and estimated severity values were compared by linear regression, and evaluator accuracy and precision were analyzed. Better accuracy and precision were obtained for visual estimates made with the diagrammatic scale. The reaction of corn genotypes to eyespot was evaluated in the city of Pato Branco-PR during the 2006/2007 growing season using 33 hybrids, and during the 2007/2008 growing season using 10 hybrids at two distinct sowing seasons, and in the city of Palma Sola-SC during the 2007/2008 growing season with 8 hybrids. Hybrids AG 9020 and SPRINT were the most susceptible to the disease in relation to AS 1565 and DKB 234; this behavior was observed in both years and planting seasons. The peroxidase enzyme was observed at higher concentrations in leaves of corn hybrids with the lowest eyespot severity.

Keywords: *Zea mays*. Mycology. Pathometry. Genetic Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01 - Folha com mancha ocular (A), plaqueamento de pedaços de folhas com lesões em maio de cultura BSA (B) e culturas puras de *K. zeae* em meio de cultura BSA, com 3 dias de incubação (C)..... 26
- Figura 02 - Parcelas do experimento 2007/08 de Pato Branco. 31
- Figura 03 - Médias quinzenais de precipitação pluviométrica (mm) dos períodos e nos dois anos de cultivo, dos municípios de Pato Branco – PR e Palma Sola – SC..... 33
- Figura 04 - Médias quinzenais de temperatura (T°C), nos dois anos de cultivo, dos municípios de Pato Branco – PR e Palma Sola – SC (PS). 33
- Figura 05 - Cortes das plântulas de milho com 14 dias após a semeadura (A) e pedaços de plântulas de milho de 0,5 cm (B) para acondicionamento em nitrogênio líquido. 35
- Figura 06 - Análises bioquímicas. Maceração das plântulas em cadinho (A), centrifugação da solução(B) e banho-maria (C). 37
- Figura 07 – Cultura pura de *K. zeae*, crescida por 10 dias em meio de cultura BSA com esporulação no centro (A) fotomicrografia de *K. zeae* - conídio (B). 39
- Figura 08 - Aspecto e coloração de colônias de isolados de *Kabatiella zeae*, isolados de diferentes materiais genéticos de milho, aos 10 dias de incubação em BSA. 39
- Figura 09 - Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha ocular em milho UTFPR – Campus Pato Branco, 2007..... 44
- Figura 10 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores com experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A;K); 2 (B;L); 3 (C;M); 4 (D;N); 5 (E;O), sem auxílio (A-E) e com auxílio (K-O) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007..... 45
- Figura 11 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores com experiência em avaliação de doenças: avaliador 6 (F;P); 7 (G;Q); 8 (H;R); 9 (I;S); 10 (J;T), sem auxílio (F-J) e com auxílio (P-T) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007..... 46
- Figura 12 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores sem experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A*;K*); 2 (B*;L*); 3 (C*;M*); 4 (D*;N*); 5 (E*;O*), sem auxílio (A*-E*) e com auxílio (K*-O*) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007..... 47
- Figura 13 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores sem experiência em avaliação de doenças: avaliador 6 (F*;P*); 7 (G*;Q*); 8 (H*;R*); 9 (I*;S*); 10 (J*;T*), sem auxílio (F*-J*) e com auxílio (P*-T*) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007..... 48
- Figura 14 - Erros absolutos (diferenças entre severidades estimada e real) dos avaliadores com experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A;K); 2

(B;L); 3 (C;M); 4 (D;N); 5 (E;O); 6 (F;P); 7 (G;Q); 8 (H;R); 9 (I;S) e 10 (J;T), sem auxílio (A-J) e com auxílio (K-T) da escala diagramática. 49

Figura 15 - Erros absolutos (diferenças entre severidades estimada e real) dos avaliadores sem experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A*;K*); 2 (B*;L*); 3 (C*;M*); 4 (D*;N*); 5 (E*;O*); 6 (F*;P*); 7 (G*;Q*); 8 (H*;R*); 9 (I*;S*) e 10 (J*;T*), sem auxílio (A*-J*) e com auxílio (K*-T*) da escala diagramática. 50

Figura 16 - Folha de milho com as primeiras lesões de mancha ocular, 9 dias após a semeadura. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>Kabatiella zea</i> com respectivos genótipos de milho e locais de origem.	28
Tabela 2 - Genótipos de milho utilizados nas safras 2006/07 e 2007/08, nos municípios de Pato Branco – PR, e Palma Sola – SC.....	32
Tabela 3 - Dimensões de conídios, aspecto e coloração de colônias de <i>Kabatiella zea</i> , em meio de cultura BSA.	38
Tabela 4 - Médias de crescimento radial (raio da colônia) de <i>Kabatiella zea</i> em diferentes meios de cultura, com 10 dias de incubação.....	42
Tabela 5 – Severidade da mancha ocular (%) em genótipos de milho avaliados na safra 2006/2007, em 2 épocas de semeadura, 13/10/2006 e 27/12/2006, no município de Pato Branco.	53
Tabela 6 - Severidade da mancha ocular (%) em genótipos de milho, avaliados na safra 2007/2008 em duas épocas de semeadura em Pato Branco – PR e numa época em Palma Sola - SC.....	54
Tabela 7 - Concentração de proteínas (mg.g. tecido), peroxidase (unid. enzimática.min.), fenóis totais (mg/g) e açúcares redutores (mg.g. tecido) presentes nos extratos foliares de plântulas de milho sem e com inoculação de 4 híbridos de milho com diferentes níveis de severidade de mancha ocular.	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
1.2 EMBASAMENTO TEÓRICO	15
1.2.1 A cultura do milho	15
1.2.2 Importância da resistência genética às doenças.....	16
1.2.3 Mancha ocular.....	18
1.2.4 Quantificação de doenças	20
1.2.5 Respostas das plantas aos fitopatógenos	22
2 MATERIAL E METODOS	26
2.1 VARIABILIDADE DE COLÔNIAS DE <i>Kabatiella zeae</i> EM MEIOS DE CULTURA E MORFOLOGIA DE CONÍDIOS E ISOLADOS DO FUNGO.....	26
2.1.1 Obtenção dos isolados	26
2.1.2 Caracterização dos isolados	27
2.2 ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA MANCHA OCULAR EM MILHO	28
2.2.1 Elaboração da escala	28
2.2.2 Validação da escala.....	29
2.3 REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO À MANCHA OCULAR	30
2.3.1 Local de implantação dos experimentos.....	30
2.3.2 Preparo do solo e semeadura	30
2.3.3 Avaliação da doença e dados meteorológicos	31
2.3.4 Respostas bioquímicas das plantas de milho à <i>K. zeae</i>	34
2.3.4.1 Coleta de material e local de execução	34
2.3.4.2 Quantificação de compostos bioquímicos	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 VARIABILIDADE DE COLÔNIAS DE <i>Kabatiella zeae</i> EM MEIOS DE CULTURA E MORFOLOGIA DE CONÍDIOS E ISOLADOS DO FUNGO.....	37
3.2 ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA MANCHA OCULAR EM MILHO	43
3.3 REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO À MANCHA OCULAR	51
3.3.1 Respostas bioquímicas de plantas de milho à <i>K. zeae</i>	57
4 CONCLUSÕES	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) no Brasil é de grande importância econômica para o agronegócio nacional, propiciando sustentação para a pequena propriedade e constituindo-se em um dos principais produtos no complexo agro-industrial brasileiro, trazendo ainda benefícios com sua utilização na rotação de culturas e no sistema plantio direto.

Sua produção vem crescendo a cada ano, principalmente com o expressivo crescimento em área do milho safrinha. Na safra de 2007/2008 a área cultivada foi de 14,7 milhões de hectares, com duas colheitas anuais, tendo participado com 58,59 milhões de toneladas, ou 14 % a mais que na safra 2007/2008, e os principais responsáveis por esta boa safra foram a produtividade e o aumento do milho safrinha no Paraná (CONAB, 2008).

Embora tenha ocorrido aumento na produção, certamente este aumento poderia ser ainda maior se não estivesse ocorrendo um aumento, a cada ano, no impacto de doenças, principalmente doenças foliares. Isso ocorre, muitas vezes, devido ao desrespeito às épocas adequadas de semeadura, recomendação equivocada de genótipos e sua semeadura em sucessão ao cultivo de milho, causando disseminação de patógenos nas lavouras (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000).

Destacam-se como as doenças foliares mais importantes, na cultura do milho, na maioria das regiões brasileiras, bem como na região do sudoeste do Paraná, a ferrugem comum (*Puccinia sorghi* Schwabe.), de maior ocorrência no sul do Brasil, helmintosporiose (*Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonar & Suggs), a mancha branca (*Phaeosphaeria maydis* (P. Henn.) Rae, Payak & Renfro) e a cercosporiose (*Cercospora zea-maydis* Tenhon & Daniels) (FERNANDES; OLIVEIRA, 2001; JULIATTI; SOUZA, 2005). A ocorrência destas doenças, por causar danos em alguns casos, tem estimulado a busca por materiais mais resistentes, bem como, a utilização do controle químico.

A mancha ocular, causada por *Kabatiella zae* (Narita & Hiratsuka) Dingley, vem ganhando importância no oeste de Santa Catarina e sudoeste do Paraná, devido à ocorrência epidêmica e a alta severidade que tem apresentado em diversos

híbridos comerciais de milho, desde a safra 2004/2005 (CAMOCHENA; SANTOS; MALAGI, 2007).

Esta doença foi descrita pela primeira vez no Japão por Narita e Hiratsuka em 1959 (NARITA; HIRATSUKA, 1959), e desde então se difundiu para várias áreas do mundo (CHIANG; HUDSON, 1990). No Brasil esta doença foi relatada pela primeira vez no ano agrícola 1982/1983, em dois híbridos de milho, na região de Dourados (MS), quando pesquisadores avaliavam a severidade de doenças foliares de milho (ESTEVES, 1984). A identificação da doença somente foi realizada através dos sintomas visuais, e não foi conduzido nenhum teste de patogenicidade para ter a confirmação da mesma. Somente vinte anos depois deste relato, foi confirmada sua presença, na safra de 2004/2005, em Santa Catarina e no Paraná (SANTOS; CAMOCHENA; MALAGI, 2007; SANTOS; MALAGI; SILVA, 2007). Ela apresenta como sintomas característicos pequenas manchas, rodeadas por um círculo pardo e com halo amarelo, semelhante a um olho, e quando observadas contra a luz, apresentam aspecto translúcido, encharcado. No início da doença, as manchas são raras, mas logo aumentam podendo cobrir totalmente a superfície da folha e eventualmente a palha da espiga. Sob clima úmido e fresco, os órgãos afetados tornam-se amarelados e secam prematuramente (REIFSCHNEIDER; ARNY, 1983).

A quantificação dos danos é o passo inicial, seguida pela caracterização do agente causal para o desenvolvimento de qualquer programa de manejo de doenças, principalmente quando se trata de um novo patossistema. Como a mancha ocular vem crescendo em importância, por manifestar-se em vários híbridos de milho, os danos poderão se tornar expressivos. Apesar disso, não há estudos epidemiológicos no Brasil e, para que esses estudos sejam realizados, é necessário o desenvolvimento de métodos padronizados de quantificação da severidade da doença em campo. Sendo assim, é importante o uso de métodos de quantificação confiáveis e facilmente reproduzíveis para auxiliar o avaliador e minimizar a subjetividade da estimativa. Desta forma, escalas diagramáticas têm sido uma ferramenta bastante útil (HORSFALL; COWLING, 1978; BERGAMIN FILHO; AMORIN, 1996; LEITE; AMORIM, 2002; SPÓSITO et al., 2004).

Desta maneira, a elaboração de uma escala para quantificação desta doença, a determinação de genótipos de milho resistentes à mancha ocular e a caracterização do agente causal da doença tornam-se importantes ferramentas de manejo integrado da doença e em programas de melhoramento genético.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade de genótipos de milho a mancha ocular, causada por *Kabatiella zaeae*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar isolados de *K. zaeae* obtidos de diversos genótipos de milho, quanto ao crescimento micelial em diferentes meios de cultura, tamanho de conídios, coloração e aspecto da colônia em meio batata, sacarose e Agar (BSA);
- Elaborar uma escala diagramática da doença;
- Avaliar a reação dos híbridos à doença e
- Correlacionar as respostas bioquímicas da planta ao ataque do patógeno.

1.2 EMBASAMENTO TEÓRICO

1.2.1 A cultura do milho

O milho é uma planta anual, possui haste cilíndrica com nós compactos e pertence à família Poaceae. Tem esta identificação taxonômica para diferir do teosinto, seu parente mais próximo (PATERNIANI; CAMPOS, 2005). Quando houve a descoberta das Américas, concretizou-se que o cereal já era cultivado por seus habitantes, desde o Canadá até a Argentina. Desta forma, o primeiro contato do homem com o milho, ocorreu com a chegada de Colombo, mas, a domesticação do cereal data de 8.000 a 10.000 anos atrás e sua subsequente seleção o conduziu à diminuição do número de espigas ocasionando aumento das mesmas e redução do número de perfilhos (GOODMAN; SMITH, 1987; PATERNIANI; CAMPOS, 2005).

O milho representa um dos principais cereais cultivados no mundo, fornecendo vários produtos largamente utilizados para a alimentação humana (como milho verde, pães, farinhas e massas), animal (“*in natura*” ou como rações e silagens) e serve como matéria-prima para a indústria, devido a quantidade e

natureza das reservas acumuladas nos grãos (DOURADO NETO; FANCELLI; 2000; PINAZZA, 1993). Segundo Paterniani e Campos (2005), existem agrupamentos de tipos de milho, sendo eles amiláceos, duro ou cristalino, dentados, doces, tunicata e pipoca.

Sua origem tropical faz com que suas exigências edafoclimáticas durante o período vegetativo sejam voltadas para calor e umidade para que se obtenham altos rendimentos. Depois de passar por várias seleções de cultivares, o milho vem sendo cultivado em regiões compreendidas entre 58° de latitude norte (Canadá, União Soviética) e 40° de latitude sul (Argentina), sendo que a temperatura do solo recomendada para que a semente germine deve ser maior que 10°C, e para seu desenvolvimento, deve girar em torno de 25°C. Temperaturas do solo menores que 10°C e superiores a 42°C prejudicam a germinação, e durante os períodos de florescimento e maturação, temperaturas acima de 26° C e inferiores a 15,5°C promovem aceleração ou retardamento desta fase, respectivamente (DOURADO NETO; FANCELLI, 2000). Estes autores apontam que o milho possui ciclo vegetativo variado, podendo a polinização ocorrer 30 dias após a emergência e o ciclo completo pode chegar até 300 dias. Entretanto, o ciclo total varia de 110 a 180 dias, em função de genótipos se caracterizarem em superprecoces, precoces e tardios.

De acordo com Dourado Neto e Fancelli (2000), o rendimento da cultura do milho é afetado pela disponibilidade de água e nutrientes no solo. A saturação ideal da capacidade de troca de cátions (CTC) do solo é em torno de 60% e pH 6, para o sul do Brasil e São Paulo (CANTARELLA, 1993). Avaliações mostraram que altos rendimentos, no Brasil, foram obtidos utilizando-se uma população entre 55.000 a 71.000 plantas por hectare, com espaçamento variando entre 55 a 85 cm entre linhas e com 3,5 a 5 plantas por metro linear. Entretanto, salienta que para cultivo de sequeiro, populações de 45.000 a 55.000 plantas por hectare são adequadas (CANTARELLA, 1993).

1.2.2 Importância da resistência genética às doenças

Nos últimos anos, muitas cultivares comerciais de milho foram introduzidas no mercado, muito mais produtivas, mas com diferentes níveis de resistência a

doenças. Contudo, as táticas de controle não estão sendo eficientes permitindo que as doenças aumentem sua intensidade, principalmente com o advento do plantio direto, onde restos culturais permanecem na superfície do solo causando aumento da fonte de inóculo (JULIATTI et al., 2007).

O uso da resistência genética para o controle de doenças nos vegetais tornou-se uma grande ferramenta, muito importante dentro da agricultura, pois este método torna-se barato e de fácil utilização. Para algumas doenças como ferrugens e carvões de cereais e da cana-de-açúcar, a resistência genética é o único método empregado para o controle (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995). Apesar da existência de vários métodos que auxiliam no controle das doenças foliares do milho (rotação de culturas, plantio antecipado e aplicação de fungicidas), a utilização de cultivares resistentes é o mais eficiente e econômico. Todavia, desenvolver cultivares é um trabalho mais intensivo, envolvendo desde a seleção de genitores resistentes e desenvolvimento do controle genético até a elaboração e execução de estratégias eficientes na transferência dos genes de resistência para as linhagens de milho melhoradas, que já fazem parte dos híbridos comerciais (SCHUELTER et al., 2003). Estudos de resistência genética à mancha ocular não foram encontrados na literatura.

Para iniciar um programa de melhoramento visando à resistência a determinada doença, devem ser escolhidas cultivares comerciais, por já serem melhoradas e conterem somente genes selecionados. Em um segundo momento, identificam-se as plantas com características desejáveis em relação a determinada doença e realiza-se a transferência intraespecífica de genes por meio de cruzamentos (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995). Silva et al. (2003), estudando controle genético da resistência aos enfezamentos do milho, concluíram que se for realizada uma combinação híbrida e recíproca entre os materiais resistentes, ocorre baixa incidência de sintomas de enfezamentos. Todavia, se combinações entre os materiais resistentes x suscetíveis forem realizadas, ocorre incidência intermediária dos enfezamentos.

Paterniani et al. (2002), estudando a variabilidade genética de híbridos de milho para resistência à ferrugem tropical, avaliaram 60 híbridos triplos e constataram diferenças entre eles para resistência à ferrugem. Separaram os híbridos em quatro classes, resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis e suscetíveis à ferrugem. Portanto, inferiram que, a

partir das linhagens resistentes e moderadamente resistentes, pode ser obtido um milho sintético com alta resistência à ferrugem, podendo ser utilizado em programas de melhoramento para inserir resistência a esta doença.

A introdução de resistência a doenças em plantas, selecionando-se cultivares resistentes, torna-se uma estratégia de baixo custo e não causa danos ao meio ambiente.

1.2.3 Mancha ocular

A mancha ocular, causada por *Kabatiella zae* foi descrita em milho pela primeira vez no Japão por Narita e Hiratsuka (Narita & Hiratsuka) Dingley em 1959. Deste ano em diante ela tem sido detectada nos Estados Unidos, Canadá, Argentina, Áustria, França, Alemanha, Iugoslávia e Nova Zelândia. Danos de até 50% foram observados com inoculação artificial e 9% com inoculação natural no campo, em cultivares susceptíveis (REIFSCHNEIDER; ARNY, 1983; CHIANG; HUDSON, 1990).

No Brasil a doença data do ano agrícola 1982/1983, em Dourados-MS (ESTEVES, 1984). Somente vinte anos depois deste relato, foi confirmada sua presença, em dezembro de 2004, em folhas do híbrido de milho AG 9020, procedente dos municípios de Campo-Erê (SC) e de Palmas (PR) (SANTOS; MALAGI; SILVA, 2007). Nas safras subsequentes, a mancha ocular assumiu maior importância, sendo detectada em mais de 30 genótipos de milho, na região sudoeste do Paraná, com severidades variando entre 7 e 17% (CAMOCHENA, SANTOS, MALAGI, 2007).

A mancha ocular apresenta como sintomas pequenas manchas, encharcadas e translúcidas, circulares a ovais (1 a 4 mm de diâmetro), rodeadas por um círculo pardo e com halo amarelo, semelhante a um olho. Quando observadas contra a luz, apresentam aspecto translúcido, encharcado. No início da doença, as manchas são raras, mas logo aumentam podendo cobrir totalmente a superfície da folha e eventualmente a palha da espiga. Algumas manchas podem coalescer, formando grandes áreas necróticas, podendo produzir uma seca antecipada das folhas. Sob clima úmido e fresco, os órgãos afetados tornam-se amarelados e

secam prematuramente (REIFSCHNEIDER, ARNY, 1983; SANTOS, MALAGI, SILVA, 2007).

Nos primeiros estudos sobre a mancha ocular como uma nova doença nos Estados Unidos, Arny et al. (1971) descreveram algumas características do fungo *K. zeae*. Salientaram que no início do crescimento as colônias apresentaram-se amarelas ou rosa escuro, tornando-se azul-escuras ou pretas. Por este motivo, o fungo pertence ao grupo das leveduras negras. Além disso, os autores descreveram que o patógeno apresenta esporos curvos ou falcados com terminais pontiagudos e aceptados, medindo 18 a 33 x 3 a 4 μm .

Após 10 anos de estudos mais aprofundados sobre a variabilidade cultural e morfológica de *K. zeae*, nos Estados Unidos, os autores Reifschneider e Arny (1980), concluíram que não houve diferenças significativas para largura dos conídios (2,5 μm). O crescimento micelial variou entre 1,1 e 4,4 mm/dia e a temperatura ótima para o desenvolvimento de 60% dos isolados utilizados foi de 24 °C. Complementaram o trabalho selecionando dois tipos básicos de colônias, as de coloração clara (18%) ou escuras (82%), e todas com aspecto coriáceo.

A variação das características morfológicas de *K. zeae*, isolado de diferentes materiais genéticos de milho, ainda não foi estudada no Brasil. As variações na utilização de diferentes meios de cultura pelo patógeno e o aspecto visual das colônias são características importantes para que se identifique corretamente e se conheça a amplitude da variabilidade existente entre isolados.

É muito importante o conhecimento das características morfológicas de colônias, micélio e conídios para que possam ser desenvolvidos estudos relacionados ao patógeno, analisando suas características fisiológicas, como composição química dos meios de cultura que servirão para determinar a eficiência da esporulação e crescimento micelial dos fitopatógenos (BOGO et al., 2008). Os microrganismos, de modo geral, possuem como característica uma grande variabilidade que pode refletir em sua morfologia, fisiologia ou patogenicidade. Eles possuem variações na capacidade da utilização de diferentes meios de cultura, produção de toxinas ou outros metabólitos que resultam, às vezes, em variações na patogenicidade dos biótipos, e o estudo de diferentes fontes nutritivas para o crescimento serve para embasar estudos morfológicos e estabelecer diferenças entre os isolados (LEVIC; PENCIC, 1990; MACHADO, 1980).

Na Jugoslávia, no ano de 1990, Levic e Pencic estudaram a utilização de compostos nitrogenados, carbônicos e sulfurosos por *K. zaeae*, chamando atenção para os carboidratos, pobres fontes de crescimento, mas fornecendo ótima energia de frutificação. Com relação aos compostos dos meios de cultura, os resultados mostraram que o meio com nitrogênio apresentou alto crescimento micelial e esporulação média. Já os compostos sulfurosos proporcionaram alta esporulação e crescimento médio, e o carbono proporcionou crescimento mais intenso depois de 10 dias de incubação.

Cutrim et al. (2006), em estudos sobre a influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum* Yam. concluíram que os substratos batata, dextrose e ágar e inhame, nos dois isolados utilizados, proporcionaram maior crescimento micelial, todavia, os meios czapeck e aveia proporcionaram maior esporulação para os isolados.

Estudos relacionados à caracterização das colônias e esporos e crescimento micelial de *K. zaeae* tornam-se importantes, tanto para verificar se existe semelhança com os isolados de outros países, quanto para saber qual meio de cultura é mais eficiente para o crescimento e esporulação.

1.2.4 Quantificação de doenças

A quantificação de doenças torna-se muito importante, pois por meio dela, podem-se inferir métodos de controle, eficiência e momento de aplicação de fungicidas, identificação de materiais resistentes, evolução e estimativas do progresso da doença e dos danos causados (AMORIM, 1995; JULIATTI; SANTOS, 1999).

Dentre os métodos de avaliação de doenças estão a quantificação de incidência e severidade, sendo que o primeiro refere-se à porcentagem de plantas ou de órgãos doentes em uma amostra, já a severidade avalia a porcentagem de área foliar, área da raiz, colmo, espiga e fruto com sintomas. Para as avaliações de doenças foliares usa-se a severidade, pois ela retrata melhor o nível de doença (AMORIN, 1995). Quantificar a severidade da mancha ocular em milho é fundamental para embasar estudos epidemiológicos e para avaliar estratégias de

controle. Não foi encontrado nenhum material para quantificação da mancha ocular, como escalas e chaves descritivas, no Brasil e também na literatura internacional.

Para avaliar as doenças do milho, geralmente são utilizadas escalas que consideram a planta como um todo, ou diagramas de severidade que não levam em consideração os verdadeiros níveis encontrados no campo. A escala proposta pela Agroceres (1996) é utilizada para quantificar a maioria das doenças foliares de milho, apresentando 9 notas que refletem o aumento crescente da porcentagem da área foliar afetada da planta considerando a planta inteira. Alguns pesquisadores também utilizam a escala de Cobb para doenças foliares de milho, elaborada em 1892 para quantificação de ferrugem do trigo, que apresenta 5 secções de folhas de trigo com 1, 5, 10, 20 e 50% de área foliar afetada (AMORIN, 1995).

Sobre as escalas utilizadas para quantificação das doenças foliares de milho, nenhum trabalho foi encontrado mostrando sua eficiência, e para a mancha ocular, que é um patossistema novo, nenhuma escala foi elaborada. Desta forma, torna-se importante a elaboração de uma escala que considere os níveis de severidade mínimo, intermediário e máximo da doença, levando em consideração a severidade no campo e seguindo incrementos logarítmicos. Os sintomas devem ser bem representados e reproduzir fielmente a severidade real, para que sejam respeitados os limites da vista humana, caracterizado pela lei do estímulo de Weber-Fechner. Esta lei preconiza que os sintomas devem proporcionar estímulos que cresçam exponencialmente para que a vista humana os diferencie (AMORIN, 1995).

A exatidão de uma medida sem qualquer erro sistemático é chamada de acurácia, podendo ser medida pelo coeficiente angular e interceptação da regressão linear entre as severidades real e estimada. Avaliações acuradas mostram a proximidade entre a estimativa e a realidade (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). Desta maneira, sem nenhum desvio sistemático, a inclinação da regressão linear entre valores reais e estimados não deve ser diferente de 1, e a interceptação deve ser igual a zero (NUTTER JR et al., 1993).

Mazaro et al. (2006) elaboraram uma escala para mancha-de-micosferela em morangueiro e comprovaram que, com seu uso, houve uma boa precisão dos avaliadores, apresentando coeficiente de determinação entre 0,79 e 0,92, todavia, sem o uso da escala o coeficiente variou de 0,36 a 0,81. Isso indicou que a utilização da escala fez com que as estimativas permanecessem relacionadas ao valor real. A utilização de uma escala faz com que os avaliadores situem sua

estimativa dentro de um menor intervalo estabelecido entre dois dos níveis representados pelos seus diagramas (AMORIN, 1995).

Uma escala para quantificação da pinta preta em citros foi elaborada, com uma precisão que variou entre 0,85 e 0,91, e 0,89 e 0,96, sem e com uso da escala, respectivamente. Isso mostrou que quando a avaliação foi realizada com a escala, todos os avaliadores melhoraram sua precisão (SPÓSITO et al., 2004).

Para avaliar a mancha de alternaria em girassol, também foi proposta uma escala e os autores concluíram que ela foi adequada, tanto para condições de campo como condições controladas, e está sendo muito utilizada para outros estudos com a doença (LEITE; AMORIN, 2002).

1.2.5 Respostas das plantas aos fitopatógenos

Durante a evolução, os vegetais adquiriram mecanismos de defesa contra agentes bióticos e abióticos respondendo rapidamente à presença dos fitopatógenos, pois, quando estes começam a invadir os tecidos da planta, esta mesma planta inicia as respostas de defesa, que podem ser fisiológicas ou bioquímicas. Esta resistência natural que as plantas possuem contra os microrganismos patogênicos está relacionada com a grande variedade de barreiras e de vários mecanismos de defesa já existentes (LEITE; PASCHOLATI, 1995). As interações entre hospedeiro-patógeno podem ser encaradas com uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. Nesta batalha entre planta e patógeno, de um lado o patógeno mobiliza suas armas químicas para atacar o hospedeiro, enquanto que este último, por meio de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura defender-se do patógeno (PASCHOLATTI et al., 1998).

Apesar de não possuírem sistema imunológico, os vegetais têm suas respostas de defesa ligadas a uma grande diversidade de compostos presentes em seu metabolismo, que aparentemente parecem não apresentar uma função direta no desenvolvimento das plantas. Estes compostos são os metabólitos secundários, que começaram a ganhar importância a partir do século XIX por apresentarem proteção de plantas contra herbívoros e infecção por patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Estes autores salientam ainda que outros mecanismos de defesa estão presentes nas plantas e que são eficientes, permanecendo inativos ou latentes, sendo ativados

após a exposição e/ou contato com algum agente de indução, como as espécies reativas de oxigênio, por exemplo.

Os mecanismos de resistência da planta dividem-se em duas categorias: os pré-formados ou constitutivos, aqueles naturalmente presentes na planta, que funcionam como barreiras físicas (cutícula, tricomas) e barreiras químicas (inibidores de proteases e de α -amilases, lectinas, fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos). As defesas pós-formadas ou induzidas, ausentes ou de pouca expressividade em plantas saudáveis, são aquelas que se manifestam somente após a invasão do patógeno ou quando a planta é injuriada (LEITE; PASCHOLATI, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004).

No ano de 1901, ocorreram os primeiros trabalhos sobre indução de resistência de plantas a patógenos, elaborados por Ray e Beauverie. Estudaram a relação de *Botrytis cinerea* Pers. x *Begônia* sp. Quarenta anos depois, Muller e Borger inocularam tubérculos de batata com uma raça avirulenta de *Phytophthora infestans* Mont. e 24 horas após inocularam os mesmos tubérculos com outra raça virulenta. Concluíram que a inoculação com a raça avirulenta resultava em reação de hipersensibilidade e acúmulo de fitoalexinas, impedindo aquela raça de penetrar nos tecidos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

Os compostos fenólicos que atuam na defesa constitutiva são vários, como o ácido cumárico, clorogênico, caféico e ferúlico, precursores da lignina. Alguns compostos pré-formados aumentam de concentração após a infecção, constituindo assim a resistência induzida (RESENDE et al., 2008). A fenilalanina é precursora da maior classe de compostos fenólicos, pela eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico. A catálise desta reação é realizada pela enzima fenilalanina amônia-liase (FAL). Quando há invasão de patógenos ocorre a transcrição do RNA mensageiro que codifica a FAL, fazendo com que aumente a quantidade desta enzima e conseqüente estímulo à síntese de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) são aquelas induzidas por patógenos, e este termo também pode se estender à enzima peroxidase, presente constitutivamente e com acúmulo após o contato com o patógeno ou algum outro tipo de estresse (RESENDE et al., 2008). A participação das peroxidases na defesa vegetal está relacionada com a lignificação, suberização e metabolismo da parede celular (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Estas enzimas têm a função de reagir

com hidroxilas ligadas a anéis aromáticos, resultando na formação de radicais fenóxi e subsequente formação da lignina (HIRAGA et al., 2001).

O principal local de acúmulo das PRPs é o apoplasto, mas elas podem ser encontradas nos vacúolos das plantas, e possuem um grande efeito antifúngico, antibacteriano, inseticida, nematocida e antiviral (RESENDE et al., 2008). As PRPs, quitinases e β -1,3-glucanases são as enzimas mais estudadas, podendo causar enfraquecimento e decomposição da parede celular dos fungos que contêm glucanas e quitina (RESENDE et al., 2008).

Durante todos os estágios do crescimento, as plantas estão à deriva de algum tipo de estresse, biótico ou abiótico, podendo às vezes perder alguns órgãos e ficar sujeitas ao ataque dos patógenos. Desta forma, elas ativam sistemas de defesa, induzidos pelos ferimentos, para atuar contra os patógenos, e as enzimas peroxidases estão entre os compostos induzidos pelo ataque dos patógenos (HIRAGA et al., 2001).

As peroxidases são muito estudadas por terem um papel muito importante nas defesas da planta. Depois dos primeiros trabalhos com indução de resistência, muitos outros foram elaborados, como o de Araújo et al. (2008), que, em estudos de reações bioquímicas em resposta a patógenos, encontraram maior atividade da enzima peroxidase em microtangerinas inoculadas no caule com *Phytophthora parasitica* Dastur. e eram suscetíveis a este fungo. Salientam ainda que as variedades suscetíveis, quando inoculadas nas raízes, houve um acúmulo de compostos fenólicos nas raízes e isso acarretou diminuição na concentração destes nas folhas.

Marriott, Been e Perkins et al. (1978) concluíram que quando a atividade da peroxidase aumenta, relacionada com ferimentos nos vegetais, pode indicar aumento na biossíntese de lignina, que atuará como uma barreira à infecção por patógenos, podendo provocar aumento na concentração de produtos de oxidação de compostos fenólicos, alterando a concentração de auxinas. Muitas vezes o aumento da atividade da peroxidase está relacionado diretamente à redução da severidade da doença (KUHN, 2007).

O termo açúcares redutores é o nome genérico para carboidratos simples. Os carboidratos são a forma primária de armazenamento de energia e derivados diretos da fotossíntese, sendo os principais constituintes da parede celular (SILVA et al., 2008). Alternativamente, uma parte dos carboidratos pode ser desviada para

sintetizar compostos do metabolismo secundário associados com a defesa contra patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os monossacarídeos são classificados respeitando-se o número de carbonos, como trioses, tetroses, pentoses, hexoses e heptoses, intermediários no metabolismo da respiração e fotossíntese (SILVA et al., 2008). Segundo estes autores, as hexoses, além destas funções, ainda atuam como esqueletos de muitos outros carboidratos.

Existem relatos de que os açúcares se acumulam nas células da epiderme, próximo aos haustórios, de fungos biotróficos, e parede celular dos vegetais, vacúolos e citoplasma. Este acúmulo ou decréscimo é devido a possíveis alterações no fluxo de transporte, ou inativação de seus transportadores, e também aumento da enzima invertase. Esta alteração nos níveis de açúcares se deve a mudanças na atividade de enzimas do patógeno e do hospedeiro, e na planta pode haver hidrólise da sacarose, produzindo glicose e frutose (SILVA et al., 2008).

Magalhães et al. (2005), em estudos para verificar o efeito dos mollicutes na síntese de açúcares solúveis totais e de proteínas em duas cultivares de milho, concluíram que no estágio de grão leitoso as doenças causadas por mollicutes não interferiram na movimentação e no processo de síntese de açúcares na planta. Entretanto, quando foram analisadas separadamente as três partes da planta (superior, mediana e basal), a maior concentração de açúcares solúveis foi observada na parte superior. Isto se deve à maior atividade metabólica das folhas superiores, por estarem menos sombreadas e possuírem taxas fotossintéticas maiores e, conseqüentemente, com maior teor de açúcares.

Em clones de cacauero resistentes a *Crinipellis pernicioso* Stahel, os níveis de fenóis solúveis totais apresentaram-se mais elevados, sugerindo que podem ter contribuição na resposta de defesa contra o patógeno. Já os níveis de fenóis e a atividade das enzimas oxidativas apresentaram correlação inversa para a maioria dos clones avaliados, podendo indicar que as enzimas peroxidases e polifenoloxidasas estejam sendo inibidas pelos compostos fenólicos (NOJOSA, et al., 2003).

Trabalhos de respostas bioquímicas de plantas de milho à *K. zeae* inexistem.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 VARIABILIDADE DE COLÔNIAS DE *Kabatiella zea* EM MEIOS DE CULTURA E MORFOLOGIA DE CONÍDIOS E ISOLADOS DO FUNGO

2.1.1 Obtenção dos isolados

Folhas com sintomas de mancha ocular, de vários híbridos de milho, foram coletadas em vários locais da região sudoeste do Paraná e oeste de Santa Catarina, para isolamento do patógeno. Partes destas folhas foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 2%, por 1 minuto, e lavadas em água esterilizada três vezes. Após, com auxílio de pinça e bisturi, foram recortados pequenos pedaços de folhas com lesões e posterior plaqueamento em BSA (batata-200g/L, sacarose-10g/L, ágar-15g/L) (Figura 01). Após o isolamento e purificação do patógeno, foram obtidas culturas monospóricas através da adição de água destilada esterilizada nas colônias do fungo e a raspagem das estruturas (esporos). Em seguida, diluiu-se esta solução três vezes para facilitar o isolamento de um único esporo. Gotas desta solução foram colocadas em placas de Petry contendo meio de cultura ágar-água e marcada a área onde estava a suspensão. Após 12 horas, com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 400 vezes, o esporo germinado foi transferido para uma placa de Petry contendo meio de cultura BSA e levado para câmara de crescimento por 5 dias em temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2$. Após este período de incubação todos os isolados foram armazenados em água esterilizada, pelo método de Castellani (1939).



Figura 01 - Folha com mancha ocular (A), plaqueamento de pedaços de folhas com lesões em meio de cultura BSA (B) e culturas puras de *K. zea* em meio de cultura BSA, com 3 dias de incubação (C).

2.1.2 Caracterização dos isolados

Foram utilizados 35 isolados de *K. zeae* coletados no Estado do Paraná e Santa Catarina e posteriormente identificados de acordo com o híbrido de origem e a ordem de isolamento (Tabela 1).

A caracterização morfológica dos isolados fúngicos foi realizada com as colônias, previamente cultivadas em BSA e incubadas com fotoperíodo de 12 horas, a 24 °C. O aspecto e a coloração das colônias foram avaliados aos 5 e 10 dias de incubação.

Para a mensuração do tamanho dos conídios, foram preparadas lâminas. Adicionou-se uma gota de água e posteriormente, com auxílio de agulha histológica adicionou-se os conídios. Cinquenta conídios de cada isolado, obtidos do meio BSA, foram mensurados quanto à largura e comprimento médios, com auxílio de microscópio óptico com 40x de aumento. O valor correspondente às dimensões das imagens foi avaliado em micrômetros (μm).

A avaliação do crescimento radial foi realizada com os seguintes meios de cultura: a) BSA; b) AvA (flocos de aveia, 75 g; ágar, 17 g; água destilada, 1000 mL); c) FA (fubá de milho, 60 g; ágar, 17 g; água destilada, 1000 mL); d) MA (Malte, 25 g; ágar, 15 g; água destilada, 1000 mL).

A partir de culturas puras dos isolados de *K. zeae*, desenvolvidos por 10 dias em BSA com fotoperíodo de 12 horas, foram retirados, das bordas da colônia, discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro contendo estruturas dos isolados fúngicos e depositados no centro de placas de Petry contendo os diferentes meios de cultura. Em seguida, incubados em estufa de crescimento a 24 ± 1 °C com fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 35 x 4 (isolados x meios de cultura) com três repetições cada. As avaliações finais do raio médio da colônia foram feitas no 10º dia de incubação, com auxílio de uma régua graduada, registrando-se as medidas médias perpendicularmente, em cm. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Os isolados foram separados em 3 grupos de crescimento: baixo crescimento radial (menor que 1,1 cm); médio crescimento (1,1 a 2,2 cm) e alto crescimento (maior que 2,2 cm).

Tabela 1 - Isolados de *Kabatiella zae* com respectivos genótipos de milho e locais de origem.

Isolados	Geótipos de milho	Local	Safra
KPR 1	PENTA	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 2	BALU 761	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 3	DKB 234	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 4	AS 1565	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 5	SG 212	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 6	SPRINT	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 7	AX 890	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 11	AX 895	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 12	PREMIUM FLEX	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 13	CARGO	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 14	DKB 950	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 15	SG 6412	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 16	32R21	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 17	DKB 566	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 18	AG 9020	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 19	ATTACK	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 20	AGN 35A42	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 21	SG 6418	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 22	AS 1570	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 23	BALU 184	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 24	DKB 214	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 25	AS 3466	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 26	DKB 979	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 27	CD 306	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 28	IPR 121	Pato Branco - PR	2006/2007
KPR 29	ADVANCE	Dois Vizinhos - PR	2007/2008
KPR 30	2B710	Dois Vizinhos - PR	2007/2008
KPR 31	DKB 234	Clevelândia - PR	2006/2007
KSC 32	32R48	Planalto - SC	2006/2007
KSC 33	30R50	Planalto - SC	2006/2007
KSC 34	30F53	Planalto - SC	2006/2007
KSC 35	MAXIMUS	Abelardo Luz - SC	2006/2007
KSC 36	SPRINT	Abelardo Luz - SC	2006/2007
KSC 37	TORK	Abelardo Luz - SC	2006/2007
KPR 39	X	Foz do Iguaçu - PR	2007/2008

K(PR)(SC)= Designação dos isolados com a inicial do gênero do fungo (*K. zae*) acompanhada da abreviação dos estados do Paraná e Santa Catarina, seguida do número de ordenação.

2.2 ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA MANCHA OCULAR EM MILHO

2.2.1 Elaboração da escala

Para elaboração da escala diagramática, foram colhidas 110 folhas de milhos, de 33 híbridos ao acaso, em pleno florescimento, cultivados na área

experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Pato Branco, PR, na safra 2006/2007. Essas folhas apresentavam variação de severidade da doença. Para confecção da escala, foi coletada uma parte do centro da folha, de 20 cm de comprimento. A porção foi assim padronizada por ser difícil trabalhar com a folha inteira para reproduzir as lesões na escala. A parte selecionada correspondeu à área da folha onde houve maior manifestação dos sintomas da doença. As áreas lesionadas foram copiadas em lâminas de transparência e suas dimensões, bem como as dimensões das amostras de folhas, foram determinadas por meio do medidor de área foliar, marca LI-COR, modelo 3100. Foram consideradas a máxima e a mínima proporção de área foliar lesionada como sendo os valores máximo e mínimo da escala diagramática. Os quatro níveis intermediários foram definidos matematicamente, seguindo incremento logarítmico e respeitando-se a acuidade da visão humana de acordo com a “Lei do estímulo de Weber e Fechner” (HORSFALL; BARRATT, 1945).

Uma vez definidas as porcentagens de área foliar lesionadas e seus correspondentes níveis a serem adotados na escala, foram selecionadas, entre as 110 folhas iniciais, as que apresentavam severidade semelhante aos níveis indicados nos cálculos matemáticos. Então, com auxílio de máquina fotográfica digital e programa de edição de imagem (Adobe Photoshop 8.0), foi constituída a escala proposta.

2.2.2 Validação da escala

Para validação da escala diagramática, foram tomadas 30 folhas com diferentes níveis de severidade e apresentadas a 20 avaliadores, sendo 10 com experiência prévia e 10 sem experiência em avaliação de doenças em plantas. Com experiência: avaliador 1(A,K); 2(B,L); 3(C,M); 4(D,N); 5(E,O); 6(F,P); 7 (G,Q), 8 (H,R); 9 (I,S); 10 (J,T), sendo sem auxílio da escala (A-J) e com auxílio da escala (K-T). Sem experiência: avaliador 1(A*,K*); 2(B*,L*); 3(C*,M*); 4(D*,N*); 5(E*,O*); 6(F*,P*); 7 (G*,Q*), 8 (H*,R*); 9 (I*,S*); 10 (J*,T*), sem auxílio da escala (A*-J*) e com auxílio da escala (K*-T*). A severidade da mancha ocular foi estimada sem o uso da escala diagramática. Posteriormente, com o uso da escala. A porcentagem

de área foliar lesionada foi determinada considerando-se conjuntamente, o halo encharcado da mancha, observando a folha contra a luz e o tecido necrosado.

A acurácia e a precisão das estimativas visuais de cada avaliador foram determinadas por regressão linear simples, considerando severidade real (porcentagem de área foliar lesionada, determinada por incrementos logarítmicos) a variável independente e a severidade estimada a variável dependente. A precisão das estimativas foi avaliada pelo coeficiente de determinação da regressão (r^2) e pela variância dos erros absolutos (severidade estimada menos severidade real).

2.3 REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO À MANCHA OCULAR

2.3.1 Local de implantação dos experimentos

Os trabalhos referentes à sensibilidade de genótipos de milho a mancha ocular foram realizados em diferentes locais, anos e épocas de cultivo. Os ensaios foram instalados nos municípios de Pato Branco – PR, nas safras agrícolas de 2006/2007 e 2007/2008, e em Palma Sola – SC, na safra 2007/2008. No município de Pato Branco a semeadura foi realizada em duas épocas, nos dias 13 de outubro e 27 de dezembro para a primeira safra, e nos dias 20 de outubro e 12 de novembro para a segunda safra, e em Palma Sola no dia 30 de setembro. A região de Pato Branco está a uma altitude de 760 metros e o clima, na classificação de Köppen é subtropical úmido, sendo o solo Latossolo Roxo, e Palma Sola está localizada a uma altitude de 860 metros e o clima é mesotérmico úmido, com verão quente e temperatura média de 17,4°C, e o tipo de solo é o Latossolo Bruno Distrófico, com textura argilosa.

2.3.2 Preparo do solo e semeadura

A área utilizada na primeira safra, em Pato Branco, havia sido cultivada anteriormente com milho seguido de trigo no inverno. Já na segunda safra, em Pato Branco e Palma Sola, as áreas haviam sido utilizadas para o cultivo de soja no verão e trigo o inverno.

Em todos os ensaios foi utilizada uma semeadora para incorporação do adubo na formulação 8-20-20 (N,P,K) e após, realizou-se a semeadura manual dos diferentes materiais genéticos (Tabela 2), que foram dispostos ao acaso, dentro de três blocos casualizados e em parcelas constituídas de 5 linhas de 5 m (Figura 02). O espaçamento utilizado foi de 0,8 m entre linhas, com 6 plantas por metro linear, totalizando-se 75.000 plantas.ha⁻¹. A adubação nitrogenada (uréia) foi aplicada na dosagem de 200 kg.ha⁻¹ sendo dividida em duas etapas: quando as plantas apresentavam 3 e 5 folhas verdadeiras, respectivamente. A caracterização dos estádios fenológicos do milho foi baseada na escala da Agrocerec (1996), adaptada por Dourado Neto e Fancelli (2000).



Figura 02 - Parcelas do experimento 2007/08 de Pato Branco.

2.3.3 Avaliação da doença e dados meteorológicos

A avaliação da severidade da doença foi realizada sob condições naturais de inoculação, em Pato Branco aos 110 e aos 75 dias após a semeadura (d.a.s.), para primeira e segunda épocas, respectivamente, no primeiro ano de cultivo e aos 74 d.a.s, para primeira e segunda épocas no segundo ano. Em Palma Sola a avaliação foi realizada aos 131 d.a.s. Para avaliação foram utilizadas 4 plantas por parcela, aleatoriamente, com utilização de 16 folhas de cada planta, utilizando-se com base a escala diagramática para avaliação da severidade da mancha ocular em milho descrita por Camochena, Santos e Mazaró (2008).

Tabela 2 - Genótipos de milho utilizados nas safras 2006/07 e 2007/08, nos municípios de Pato Branco – PR, e Palma Sola – SC.

Safr 2006/07 Pato Branco			Safr 2007/08 Pato Branco			Palma Sola - SC
Genótipos	Tipo*	Ciclo*	Materiais	Tipo	Ciclo	Materiais
AS 1565	HS	P	SG 150	HT	P	SG 150
AS 1560	HS	P	SPRINT	HS	HP	SPRINT
AS 1570	HS	P	AS 1565	HS	P	AS 1565
AS 3466	HT	P	DKB 234	HS	SP	DKB 234
P 30F53	HS	P	AG 8011	HT	P	AG 8011
ATTACK	HSm	P	AG 9020	HS	SP	AG9020
P 30R50	HS	P	DKB 566	HT	P	DKB 566
P 32R21	HS	SP	P 30F53	HS	P	P 30F53
CARGO	HD	P	DOW 2A106	HS	SP	-
PENTA	HS	P	DOW 2A120	HS	HP	-
SPRINT	HS	HP	-	-	-	-
AGN 30A06	HS	SP	-	-	-	-
AGN 2012	HD	SP	-	-	-	-
AGN 35A42	HD	SP	-	-	-	-
DKB 214	HS	P	-	-	-	-
DKB 566	HT	P	-	-	-	-
DKB 979	HD	P	-	-	-	-
DKB 950	HS	P	-	-	-	-
DKB 234	HS	SP	-	-	-	-
PREMIUM FLEX	HS	P	-	-	-	-
AS 32	HD	P	-	-	-	-
AS 1545	HS	P	-	-	-	-
AG 8021	HS	P	-	-	-	-
AG 9020	HS	SP	-	-	-	-
AG 2020	HD	P	-	-	-	-
BALU 184	HD	P	-	-	-	-
BALU 761	HD	P	-	-	-	-
BD 7912	HS	P	-	-	-	-
SG 6418	HT	P	-	-	-	-
SG 150	HT	P	-	-	-	-
AX 895	HT	P	-	-	-	-
AX 892	HS	SP	-	-	-	-
AX 890	HS	SP	-	-	-	-

*TIPO: S-simples; Sm-simples modificado; D-duplo; T-triplo

*CICLO: P-precoc; SP-super-precoc; HP-hiper-precoc

Fonte: Associação Paulista de Produtores de Sementes, 2008.

Os dados meteorológicos foram coletados diariamente [Pluviosidade (mm) e Temperaturas (°C) e expressos em médias quinzenais durante os períodos de cultivo (Figuras 03 e 04).

Os valores de severidade foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

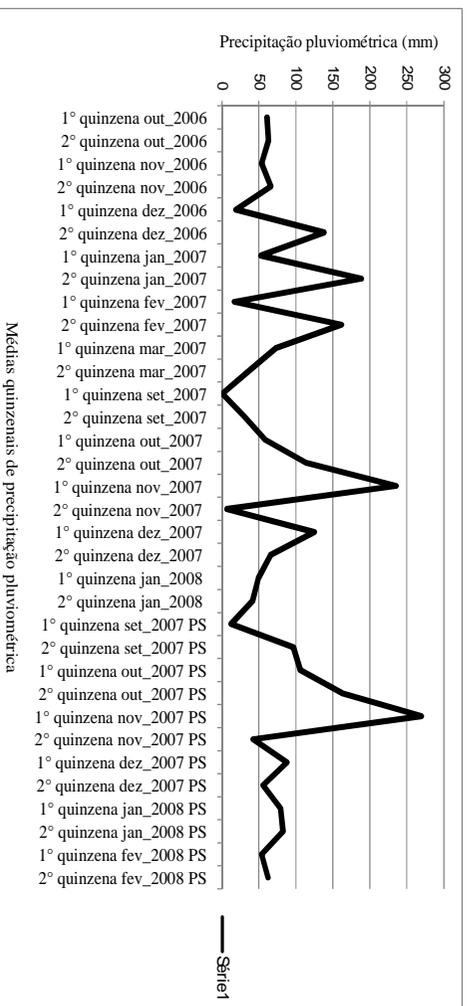


Figura 03 - Médias quinzenais de precipitação pluviométrica (mm) dos períodos e nos dois anos de cultivo, dos municípios de Pato Branco – PR e Palma Sola – SC.

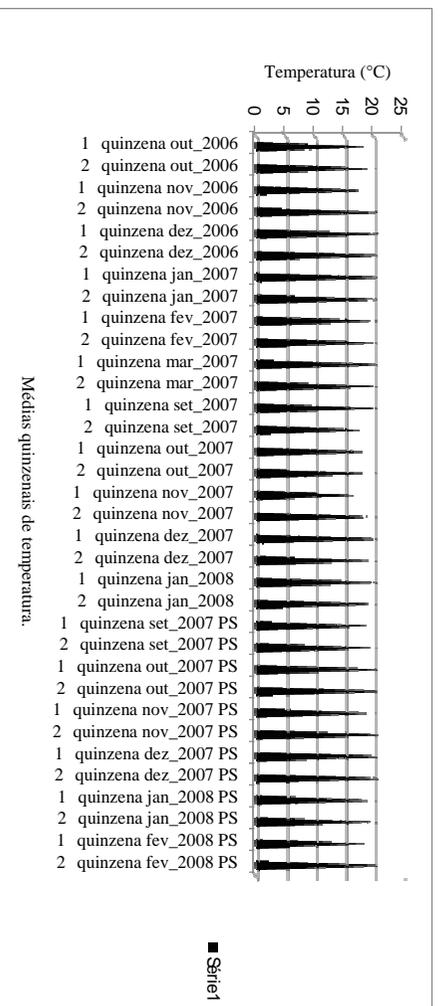


Figura 04 - Médias quinzenais de temperatura (T°C), nos dois anos de cultivo, dos municípios de Pato Branco – PR e Palma Sola – SC (PS).

2.3.4 Respostas bioquímicas das plantas de milho à *K. zeae*

2.3.4.1 Coleta de material e local de execução

As análises de respostas bioquímicas em tecidos foliares de proteínas totais, fenóis totais, açúcares redutores e atividade de peroxidases foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Dois Vizinhos. Foram selecionados dois híbridos de milho que apresentaram menor severidade da doença (DKB 234 e AS 1565) e dois com maior severidade (SPRINT e AG 9020).

O experimento foi composto de 2 tratamentos (com inoculação-CI e sem inoculação-SI) e 3 repetições. Sementes de milho foram semeadas em gerbóx com areia autoclavada, e mantidas em casa de vegetação à temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 75%. No 11º dia após a semeadura realizou-se a inoculação, somente no tratamento Com Inoculação, e o tratamento Sem Inoculação recebeu apenas pulverização com água. A inoculação foi realizada com o isolado de *K. zeae* KPR 18 (CI). No 14º dia as plântulas foram cortadas logo acima da região de contato com a areia, com auxílio de bisturi, lavadas com água destilada, cortadas em pequenos pedaços e acondicionadas em nitrogênio líquido até o momento das avaliações (Figura 05).

Os valores dos compostos bioquímicos foram submetidos à análise da variância e comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

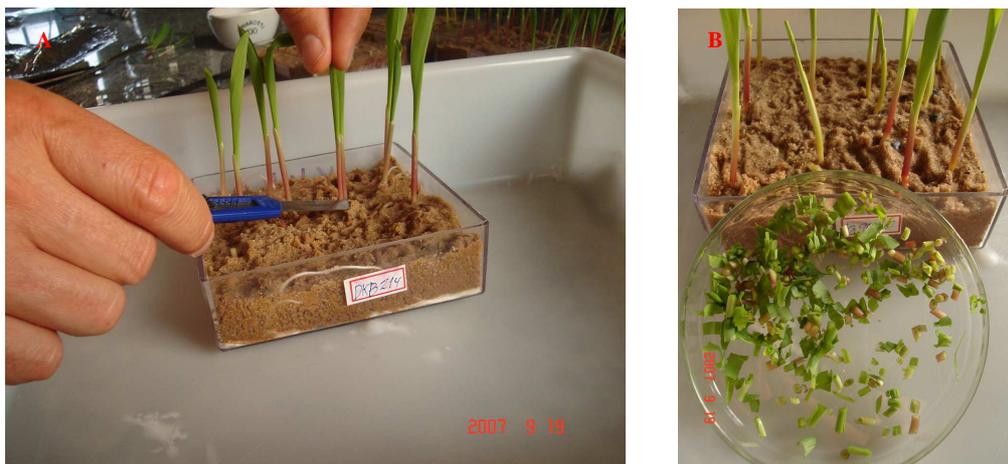


Figura 05 - Cortes das plântulas de milho com 14 dias após a semeadura (A) e pedaços de plântulas de milho de 0,5 cm (B) para acondicionamento em nitrogênio líquido.

2.3.4.2 Quantificação de compostos bioquímicos

Para quantificação de proteínas totais, as amostras de tecido foliar foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (molar) (pH 7,5). Em seguida, centrifugou-se o material (14.000 g/10 min a 4°C) e o sobrenadante foi coletado. Para quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras será empregado o teste de Bradford (1976).

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em duas fases, seguindo o método adaptado de Bialeski e Turner (1966).

A primeira compreendeu a extração dos fenóis totais, realizada a partir da adição de 4 mL da solução metanol, clorofórmio e água (MCA), na relação 6:2,5:1,5 v:v:v, respectivamente, no material vegetal, com trituração em almofariz à temperatura ambiente, de 28 °C, seguida de uma centrifugação a 6.000 g por 20 min, sendo coletado o sobrenadante. Posteriormente foi realizada nova extração do resíduo remanescente, adicionando-se 4 mL de MCA, centrifugando novamente a 6000 g por 20 min e o sobrenadante sendo adicionado ao primeiro, obtendo-se assim o extrato MCA. A esse extrato foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, procedendo-se uma nova centrifugação a 6.000 g por 15 min para separação das fases.

A segunda fase compreendeu a determinação de fenóis totais realizada pelo método adaptado de Jennings (1991), nas seguintes etapas: Preparação de curva

padrão, utilizando quantidades conhecidas de tirosina (na faixa de 0 a 100 mg), a partir de uma solução padrão com 100 mg de tirosina/mL. Procedeu-se então a leitura das amostras em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 760 nm. As amostras foram preparadas a partir da retirada de uma alíquota de 0,5 mL da parte superior do tubo de extrações dos fenóis (extrato MCA). A seguir, adicionaram-se 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 15 min, foram adicionados 5 ml do reagente alcalino "A" preparado com carbonato de sódio 2 % em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N, que permaneceu durante 50 minutos até a leitura da absorbância em 760 nm, em espectrofotômetro. No controle negativo, foi usada água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. O resultado foi expresso em mg.g⁻¹ de tecido fresco.

As concentrações de açúcares solúveis totais foram determinadas pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956). As amostras foram maceradas em almofariz contendo 5 mL de tampão fosfato 0,2M, (pH 7,5), centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Utilizaram-se 2 mL do extrato com adição de 0,5 mL de fenol a 5,0% e 2,5 mL ácido sulfúrico. A leitura das amostras dos padrões foi realizada colorimetricamente a 490 nm. A curva padrão foi obtida com solução de glicose (100µg.mL⁻¹). A quantificação da atividade da enzima peroxidase foi determinada de acordo com a técnica descrita por Matsuno e Uritani (1972), padronizada no Laboratório de Bioquímica e fitossanidade da UTFPR, – Dois Vizinhos. As amostras compostas por 4 discos foliares de 2 cm de diâmetro com peso médio total de 0,260 g foram maceradas em nitrogênio líquido e então adicionaram-se 5 ml de solução extratora tampão fosfato 0,05 M pH 7. e 2 mg de polivinilpirrolidona (PVP 100, marca Sigma) e o extrato foi centrifugado por 20 min a 4.000 g em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro recipiente e utilizado como extrato enzimático.

A análise de atividade da enzima peroxidase adicionando-se em um tubo de ensaio 5 mL de solução tampão de citrato (pH 5,0), 0,5 mL de água oxigenada 3 %, 0,5 mL de guaiacol 0,5 % e 3 mL da amostra extraída da solução tampão (pH 7). Esta mistura foi levada para incubação em banho-maria por 15 min a 30 °C. Após a incubação, os tubos voltaram para gelo e após 5 min, adicionou-se 0,5 mL de bissulfito de sódio, que foi usado para paralisar a reação. Para o cálculo da atividade das peroxidases, as leituras foram realizadas após 10 min de repouso, em espectrofotômetro, modelo NT – 805 NOVATECNICA, em comprimento de onda de

450 nm. Para o cálculo da atividade enzimática, foi considerado uma unidade de enzima o correspondente a um aumento na absorvância de 0,001 unidade ótica/minuto. O controle negativo incluiu o meio de reação com todos os reagentes, apenas substituindo-se o extrato vegetal por 3,0 mL de solução tampão (Figura 06).



Figura 06 - Análises bioquímicas. Maceração das plântulas em cadinho (A), centrifugação da solução(B) e banho-maria (C).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 VARIABILIDADE DE COLÔNIAS DE *Kabatiella zae* EM MEIOS DE CULTURA E MORFOLOGIA DE CONÍDIOS E ISOLADOS DO FUNGO

Houve variação quanto ao aspecto e coloração das colônias (Tabela 3). As colônias produziram conídios hialinos não septados, longos e curvos e com dimensões variando de 3-4 x 27-33 μm (Figura 07). Esta característica confere com os resultados encontrados por Arny et al. (1971), que em estudos sobre a mancha ocular do milho, no norte da America, descreveram dimensões semelhantes de conídios, que variaram de 3-4 x 18-33 μm , e ainda afirmam que o tamanho dos conídios pode variar em função do tipo de substrato utilizado.

Todas as colônias no meio de cultura BSA apresentaram-se com aspecto coriáceo, enrugado e algumas ainda, com halos concêntricos. A coloração variou de branco a salmão, aos 5 dias de desenvolvimento, e rosa, aos dez dias.

Os isolados KPR 1, KPR3, KPR5, KPR6, KPR7, KPR11, KPR17, KPR18, KPR19, KPR20, KPR25, KPR26, KPR27, KPR28, KPR30, KPR33, KSC34, KPR35, KSC36, e KPR39 apresentaram aspecto coreáceo e aveludado da colônia, e os demais, aspecto coreáceo com halos concêntricos.

Tabela 3 - Dimensões de conídios, aspecto e coloração de colônias de *Kabatiella zaeae*, em meio de cultura BSA.

Isolados	Dimensões médias de conídios (µm) (comprimento x largura)		Aspecto da colônia	Coloração*	
	5 dias	10 dias			
KPR 1	31	3	Coriáceo	AC	Rc
KPR 2	31	3	Coriáceo c/ halos	AC	Rc
KPR 3	31	3	Coriáceo	S	Rc
KPR 4	30	3	Coriáceo c/ halos	C	ReBb
KPR 5	28	3	Coriáceo	C	Rc
KPR 6	30	3	Coriáceo	B	Rc
KPR 7	32	3	Coriáceo	B	Rc
KPR 11	30	3	Coriáceo	C	Rc
KPR 12	31	3	Coriáceo c/ halos	B	Rc
KPR 13	30	3	Coriáceo c/ halos	S	Rc
KPR 14	30	3	Coriáceo c/ halos	A	RcBb
KPR 15	29	3	Coriáceo c/ halos	B	Rc
KPR 16	31	3	Coriáceo c/ halos	S	Rc
KPR 17	31	3	Coriáceo	C	ReBo
KPR 18	29	3	Coriáceo	S	Rc
KPR 19	29	3	Coriáceo	B	Rc
KPR 20	29	3	Coriáceo	BO	Rc
KPR 21	31	3	Coriáceo c/ halos	B	Rc
KPR 22	29	3	Coriáceo c/ halos	B	Rc
KPR 23	30	3	Coriáceo c/ halos	B	Rc
KPR 24	28	3	Coriáceo c/ halos	S	S
KPR 25	27	4	Coriáceo	S	Rcmo
KPR 26	29	3	Coriáceo	B	S
KPR 27	31	3	Coriáceo	B	S
KPR 28	33	3	Coriáceo	B	Ocp
KPR 29	31	4	Coriáceo c/ halos	S	RcBb
KPR 30	28	3	Coriáceo	S	Rc
KPR 31	30	3	Coriáceo c/ halos	S	Rc
KSC 32	27	3	Coriáceo c/ halos	C	Rc
KSC 33	32	3	Coriáceo	B	Re
KSC 34	32	3	Coriáceo	B	Re
KSC 35	30	3	Coriáceo	B	Rc
KSC 36	32	3	Coriáceo	C	RemoBb
KSC 37	30	3	Coriáceo c/ halos	C	Rc
KPR 39	30	3	Coriáceo	C	Rc

*AC-amarelo claro; S-salmão; C-creme; B-branco; Re-rosa escuro; Rc-rosa claro; ReBb-rosa escuro centro e bordas branca; RcBb-rosa claro centro e borda branca; ReBo-rosa escuro no centro borda oliva; Rcmo-rosa claro com manchas oliva; OcRe-oliva no centro e rosa escuro; RcBb-rosa claro com borda branca; RemoBb- rosa escuro no centro com manchas oliva e borda branca.

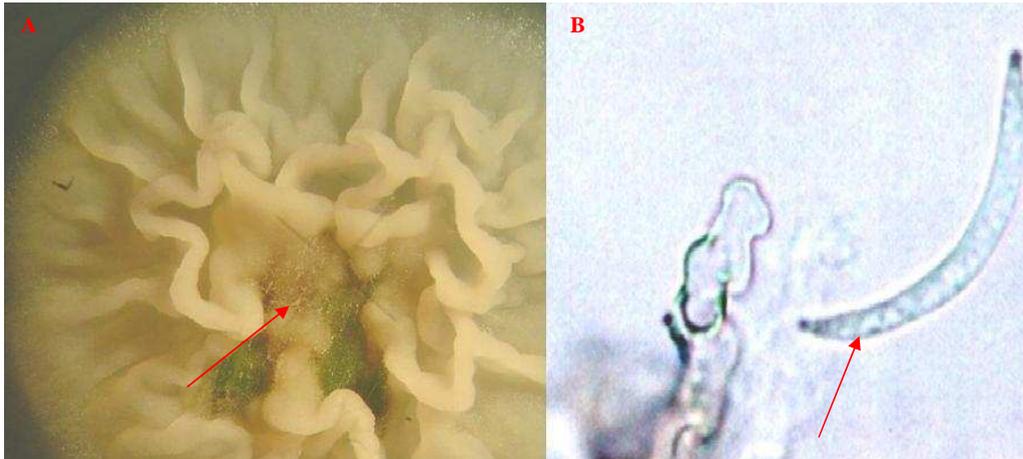


Figura 07 – Cultura pura de *K. zeae*, crescida por 10 dias em meio de cultura BSA com esporulação no centro (A) fotomicrografia de *K. zeae* - conídio (B).



Figura 08 - Aspecto e coloração de colônias de isolados de *Kabatiella zeae*, isolados de diferentes materiais genéticos de milho, aos 10 dias de incubação em BSA.

A coloração rosa claro, aos 10 dias de desenvolvimento predominou em 80% dos isolados (Figura 08). Após as avaliações as placas foram mantidas nas mesmas condições de crescimento, e a maioria das colônias adquiriu coloração negra aos 20 dias.

Levic & Pencic (1990), em estudos com fontes de carbono, nitrogênio e compostos sulfurosos, para o crescimento de *K. zeaе*, concluíram que com diferentes compostos nitrogenados a maioria das colônias apresentou micélio compacto, coriáceo e dobrado, e algumas com halos concêntricos.

Os isolados KPR17 e KPR28 apresentaram uma coloração manchada em relação aos outros, mas as colônias são de *K. zeaе* sendo que a confirmação foi realizada através da observação dos conídios.

Houve diferença significativa para o crescimento radial em todos os meios de cultura utilizados. Comparando-se apenas os 4 meios de cultura, observa-se que dos 40% dos isolados que apresentaram maior crescimento radial geral, 9 pertencem ao meio MA, 3 ao BSA, 1 ao FA e 1 ao AV, não diferindo entre si estatisticamente. Ou seja, o MA proporcionou melhor crescimento radial a um número de isolados, em relação aos outros meios (Tabela 4).

Para descrever a diferença de crescimento radial entre os isolados, para cada meio de cultura, foram separados 3 grupos, sendo alto, médio e baixo crescimento. No meio de cultura BSA não houve diferença significativa entre os isolados, exceto para o isolado KPR19, que diferiu dos demais. A variação no crescimento radial foi de de 1,9 a 4,3 cm, e 1,7 para o isolado KPR19.

Em relação ao meio FA, o maior crescimento foi observado para o isolado 25, com 2,7 cm. No grupo de crescimento radial médio, estão 18 dos isolados que não diferiram entre si estatisticamente. O restante dos isolados permanecem no grupo de baixo crescimento, com variação de 0,5 a 1,1 cm.

O meio de cultura AV proporcionou melhor crescimento radial para 14 isolados. Os isolados classificados de crescimento médio formaram o maior grupo, 19 isolados, variando de 1,5 a 2,0 cm, e o restante, classificados de crescimento baixo, 0,5 cm.

O melhor crescimento radial observado no meio MA foi para os isolados KPR11 e KPR22, com 2,3 cm, não diferindo entre si estatisticamente. O grupo de crescimento médio foi composto pela maioria dos isolados, 18 isolados, variando de

1,7 a 2,2 cm. O restante dos isolados foi classificado de crescimento baixo para este meio de cultura.

Pereira, Silva e Ribeiro (2006), em estudos sobre características fisiológicas e culturais de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* Pat. concluíram que alguns fungos podem utilizar a energia unicamente para o crescimento, enquanto outros utilizam para a esporulação. Isso pode justificar o maior ou menor crescimento micelial de *k. zaeae* nos diferentes meios de cultura testados neste estudo, apesar deste fungo apresentar crescimento lento em comparação com outros fungos.

Altas taxas de crescimento foram observadas em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e V-8 em estudos sobre variabilidade cultural e morfológica de *K. zaeae*, de 1,4 a 2,6 mm por dia em média, sugerindo que a variação existente entre os isolados, em taxas de crescimento, deveriam ser utilizadas para classificação das espécies (REIFSCHNEIDER; ARNY, 1980). Todavia, na década de 80 ainda não era utilizada a biologia molecular, atualmente a diferenciação de raças e espécies com o uso de técnicas moleculares tornou-se uma ferramenta importante e segura.

A caracterização molecular dos isolados seria de grande valia para comprovar se existem raças intraespecíficas e se estas estão relacionadas à severidade da mancha ocular. Portanto novos estudos devem ser conduzidos para avaliar este quesito.

Levic & Pencic (1990) em outros estudos, mostram que diferentes tipos de nutrientes expressam os tipos de colônia e que o crescimento das colônias em diferentes fontes de carbono é mais intenso depois de 10 dias, muitas vezes por haver supressão nutricional e produção de toxinas pelo fungo.

Tabela 4 - Médias de crescimento radial (raio da colônia) de *Kabatiella zeae* em diferentes meios de cultura, com 10 dias de incubação.

Isolados	Crescimento radial (cm)*			
	Meios de cultura			
	BSA	FA	AvA	MA
KPR 1	3,3 aD	1,4 cC	2,0 bC	2,0 bB
KPR 2	4,2 aA	1,6 bB	2,1 aC	2,0 bB
KPR 3	2,5 aF	0,7 dE	2,1 aC	1,8 bB
KPR 4	2,6 aF	1,5 bC	1,8 bD	1,8 bB
KPR 5	3,7 aC	1,6 bC	1,5 bE	1,6 cC
KPR 6	4,3 aA	1,7 bB	1,8 bD	2,0 bB
KPR 7	3,4 aD	1,5 bC	1,7 bD	1,7 bC
KPR 11	2,3 aG	1,5 bC	2,0 bC	2,3 aA
KPR 12	2,9 aE	1,6 bC	1,9 bD	1,9 bB
KPR 13	1,9 aH	1,5 bC	1,5 bE	2,0 bB
KPR 14	4,3 aA	1,4 cC	1,8 bD	1,5 cC
KPR 15	3,8 aC	1,8 bB	2,0 bC	2,2 bA
KPR 16	3,8 aC	0,9 bD	2,2 aB	2,2 bA
KPR 17	3,3 aD	0,8 bD	0,5 cF	0,8 cD
KPR 18	2,6 aF	0,5 dE	1,9 bC	2,0 bB
KPR 19	1,7 bH	1,7 bB	2,8 aA	1,4 cC
KPR 20	2,6 aF	0,5 dE	0,5 cF	1,6 cC
KPR 21	3,4 aD	0,5 dE	2,0 bC	2,2 bA
KPR 22	2,0 aH	1,0 cD	2,1 aC	2,3 aA
KPR 23	2,1 aH	0,8 cD	2,1 aC	1,6 cC
KPR 24	3,0 aE	1,7 bB	2,2 aB	2,2 bA
KPR 25	2,7 aF	2,7 aA	2,3 aB	1,5 cC
KPR 26	3,5 aD	1,8 bB	2,1 aC	1,5 cC
KPR 27	3,3 aD	1,0 cD	1,9 bC	2,2 bA
KPR 28	2,9 aE	1,5 bC	2,0 bC	2,2 bA
KPR 29	3,0 aE	1,4 cC	2,1 aC	2,1 bB
KPR 30	2,2 aG	1,1 cD	1,8 bD	1,6 cC
KPR 31	2,7 aF	1,5 bC	2,0 bC	1,3 cC
KSC 32	3,9 aB	1,4 cC	2,2 aB	2,0 bB
KSC 33	2,6 aF	0,8 dD	2,1 aC	2,2 bA
KSC 34	3,7 aC	0,6 dE	2,0 bC	1,0 dD
KSC 35	2,1 aH	1,1 bD	2,4 aB	1,1 cD
KSC 36	2,3 aG	0,5 dE	2,4 aB	1,3 cC
KSC 37	3,9 aB	1,9 bB	1,8 bD	1,1 cD
KPR 39	2,5 aF	1,7 bB	2,0 bC	1,1 cd
Média	3	1,6	1,6	1,9
CV%	9,18			

BSA: batata sacarose ágar; FA: fubá de milho ágar; AvA: flocos de aveia ágar; MA: malte ágar.

*As médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

3.2 ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA MANCHA OCULAR EM MILHO

A escala diagramática elaborada neste trabalho, apresentou sete níveis de severidade 0,9; 2,0; 4,0; 9,0; 18,0; 32,0 e 51,0% (Figura 09), e observou a “Lei do estímulo de Weber-Fechner”, conforme descrita em trabalhos anteriores de elaboração de escalas (HORSFALL & COWLING, 1978; RODRIGUES et al., 2002; GOMES et al., 2004; MAZARO et al., 2006), pode ser observada na.

Na validação da escala diagramática, os avaliadores se mostraram com boa acurácia, pois os valores estimados de severidade ficaram próximos dos valores da severidade real, o que é observado quando são comparadas as linhas de regressão entre severidade real e estimada, sem escala (A-J e A*-J*) e com escala (K-T e K*-T*) (Figuras 10, 11, 12 e 13). Mesmo com o uso da escala, ainda ocorreram pequenas tendências de subestimação ou superestimação, no entanto, de forma aceitável, pois estudos demonstram que não só a boa qualidade de uma escala diagramática, mas também as estimativas dependem da percepção visual e da experiência de cada indivíduo na avaliação de doenças (SPÓSITO et al., 2004).

A precisão é um fator a ser considerado na validação de uma escala diagramática e é definida como a exatidão de uma operação na qual há rigor ou refinamento na medida. A precisão pode ser avaliada por meio do coeficiente de determinação da regressão, que deve ser próximo de 100%, e pela variação dos erros absolutos (diferença entre severidade estimada e real). Com a utilização da escala diagramática proposta para mancha ocular em milho, os avaliadores apresentaram boa precisão, sendo que para os dois grupos de avaliadores (com experiência e sem experiência) ocorreu aumento do coeficiente de determinação de regressão quando se fez uso da escala (Figuras 10, 11, 12 e 13), indicando que, com o uso da escala, as estimativas foram sistematicamente relacionadas com o valor real.

Além do coeficiente de determinação, a boa precisão dos avaliadores pode ser observada com a determinação do erro absoluto ou do resíduo, ou seja, a diferença entre a severidade estimada e a real. Os valores obtidos para resíduos podem ser considerados adequados, pois, na maior parte, permaneceram dentro dos valores aceitáveis de -10 a +10 (Figuras 14 e 15), segundo critérios adotados

por programas de computadores para treinamento na quantificação de doenças como o Distrain (TOMERLIN; HOWELL, 1988) e o Disease Pro (NUTTER JR.; WORAWITLIKIT, 1989). Quando foram comparados os grupos de avaliadores (sem escala e com escala), percebe-se que, de modo geral, o erro diminuiu para todos os avaliadores.

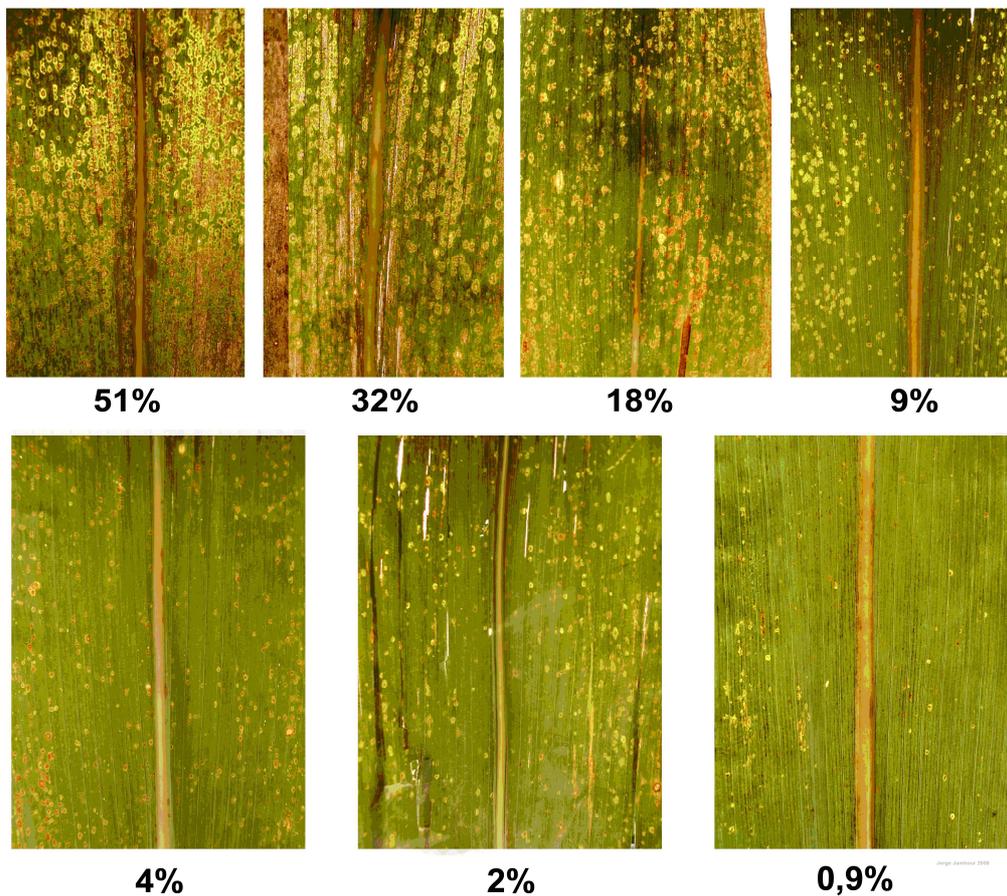


Figura 09 - Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha ocular em milho UTFPR – Campus Pato Branco, 2007.

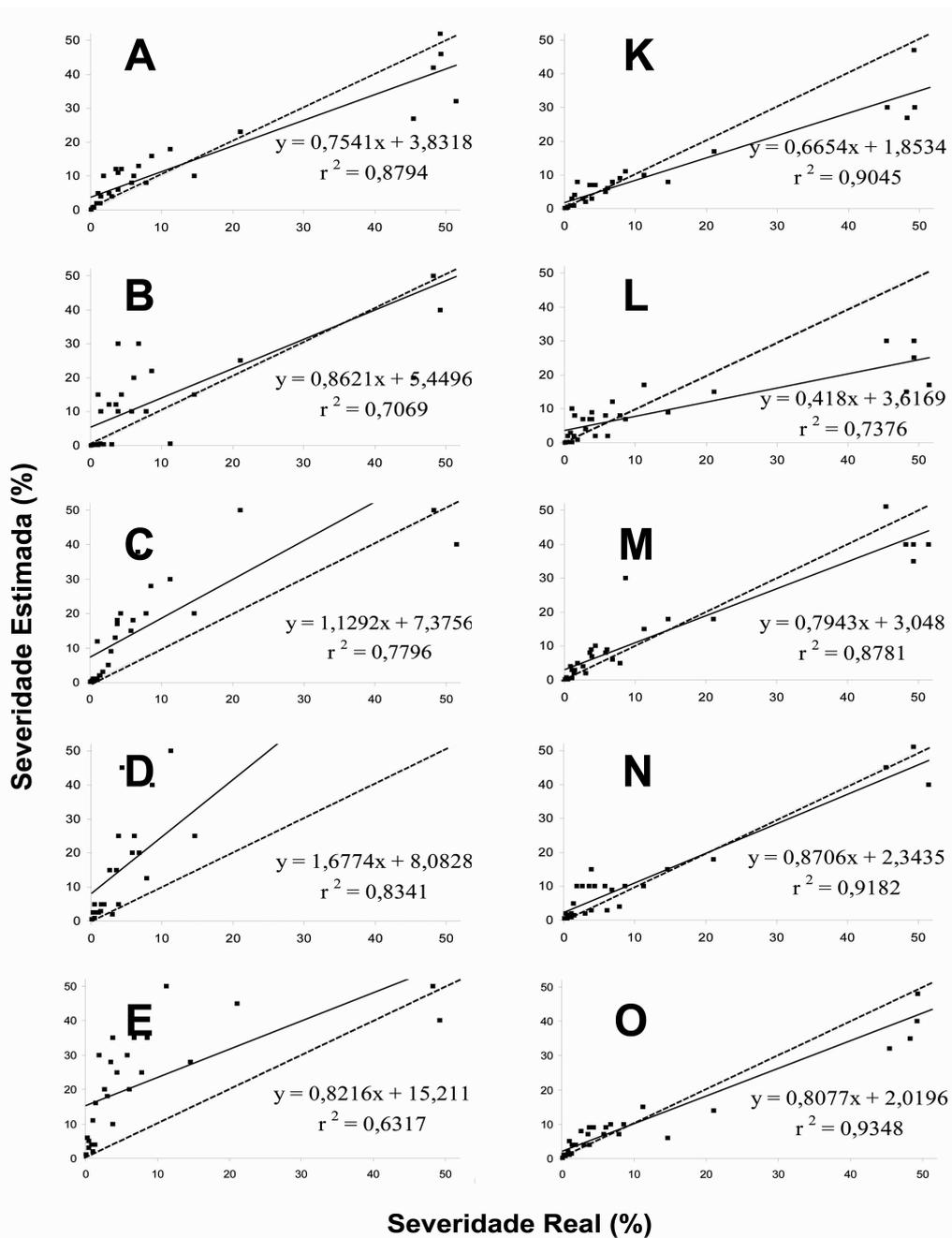


Figura 10 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores com experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A;K); 2 (B;L); 3 (C;M); 4 (D;N); 5 (E;O), sem auxílio (A-E) e com auxílio (K-O) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007.

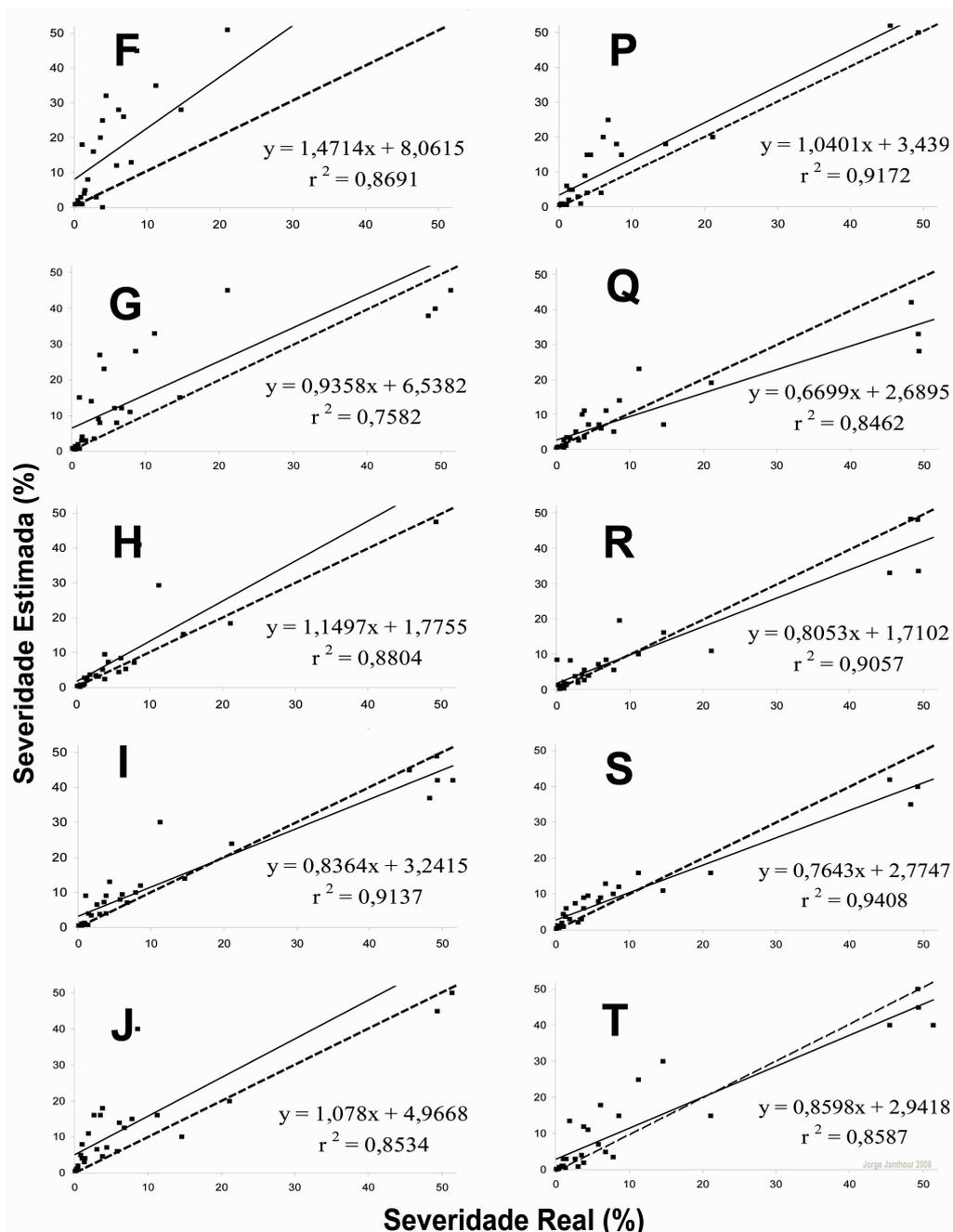


Figura 11 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores com experiência em avaliação de doenças: avaliador 6 (F;P); 7 (G;Q); 8 (H;R); 9 (I;S); 10 (J;T), sem auxílio (F-J) e com auxílio (P-T) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007.

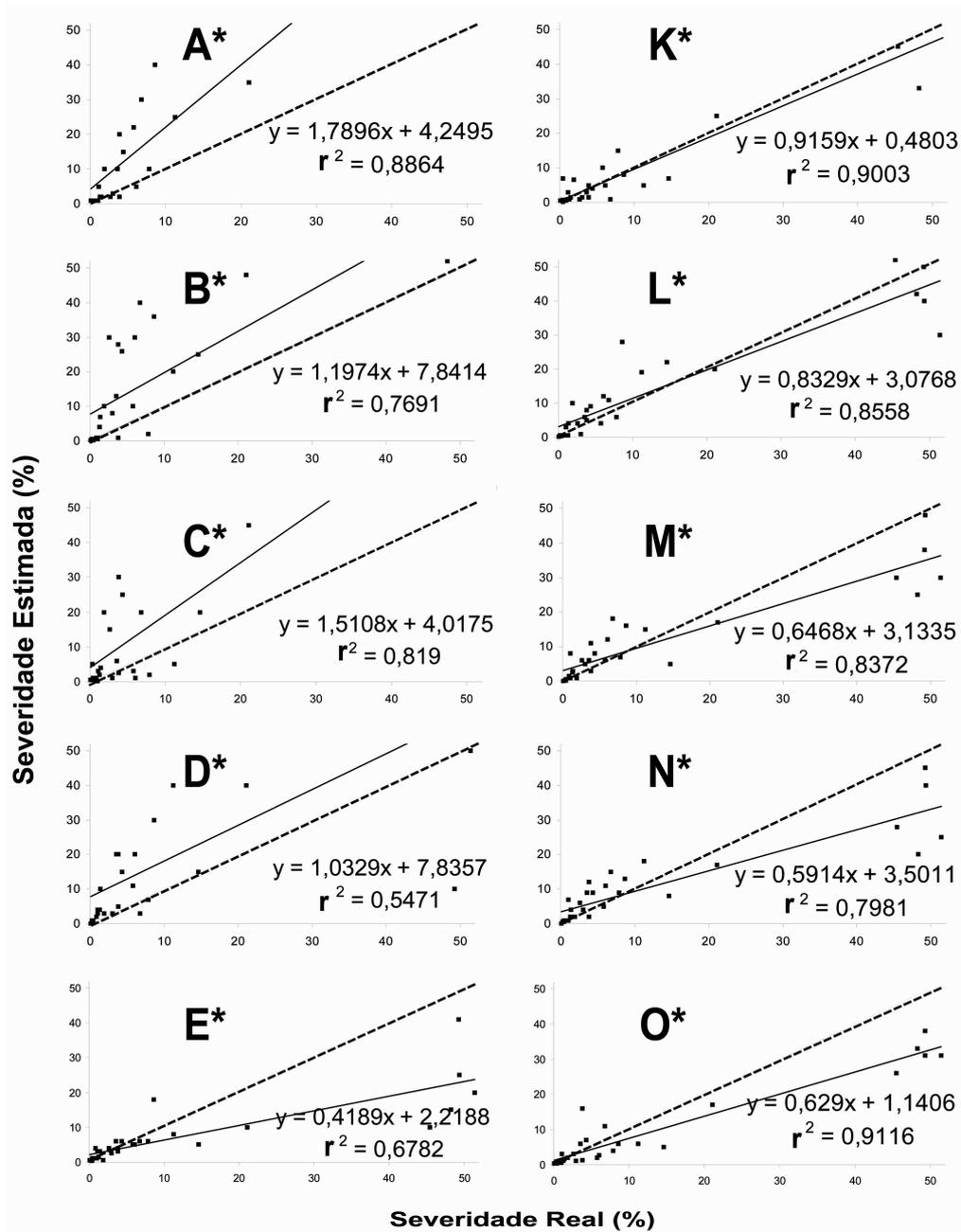


Figura 12 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores sem experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A*;K*); 2 (B*;L*); 3 (C*;M*); 4 (D*;N*); 5 (E*;O*), sem auxílio (A*-E*) e com auxílio (K*-O*) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007.

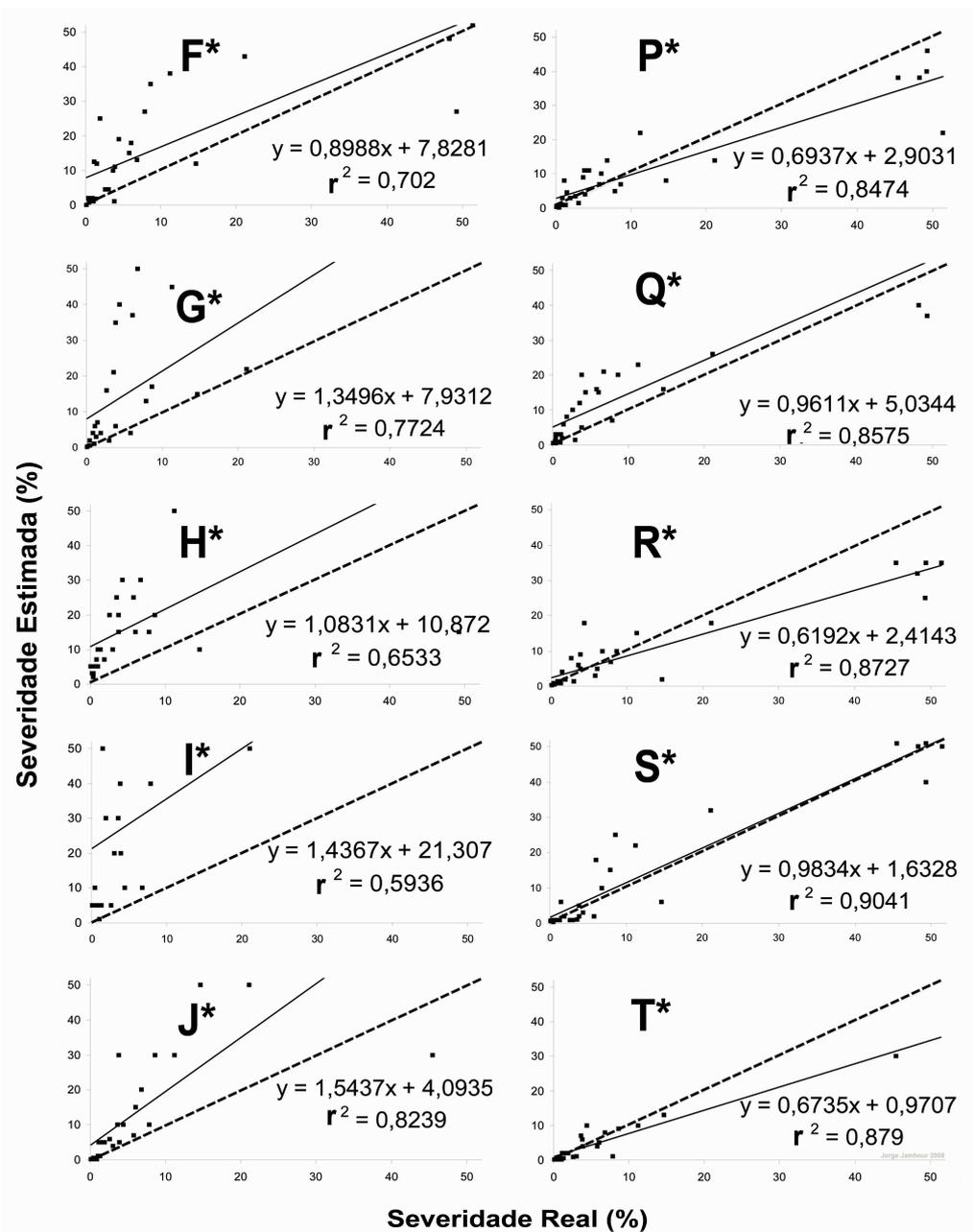


Figura 13 - Severidade estimada (pontos) por cinco avaliadores sem experiência em avaliação de doenças: avaliador 6 (F*;P*); 7 (G*;Q*); 8 (H*;R*); 9 (I*;S*); 10 (J*;T*), sem auxílio (F*-J*) e com auxílio (P*-T*) da escala diagramática e linhas de regressão obtidas entre severidades reais (linha pontilhada) e estimadas (linhas cheias). UTFPR – Campus Pato Branco, 2007.

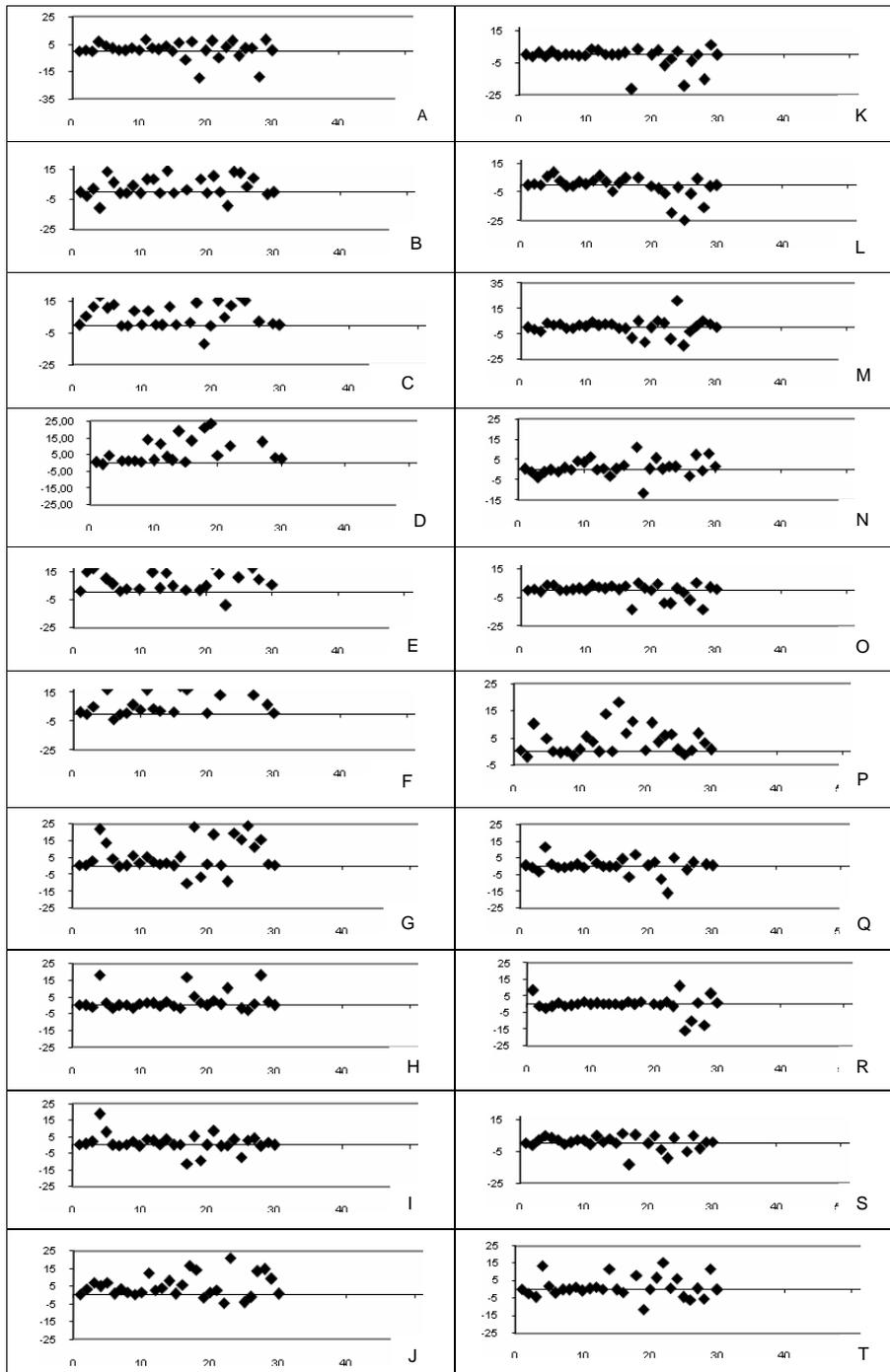


Figura 14 - Erros absolutos (diferenças entre severidades estimada e real) dos avaliadores com experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A;K); 2 (B;L); 3 (C;M); 4 (D;N); 5 (E;O); 6 (F;P); 7 (G;Q); 8 (H;R); 9 (I;S) e 10 (J;T), sem auxílio (A-J) e com auxílio (K-T) da escala diagramática.

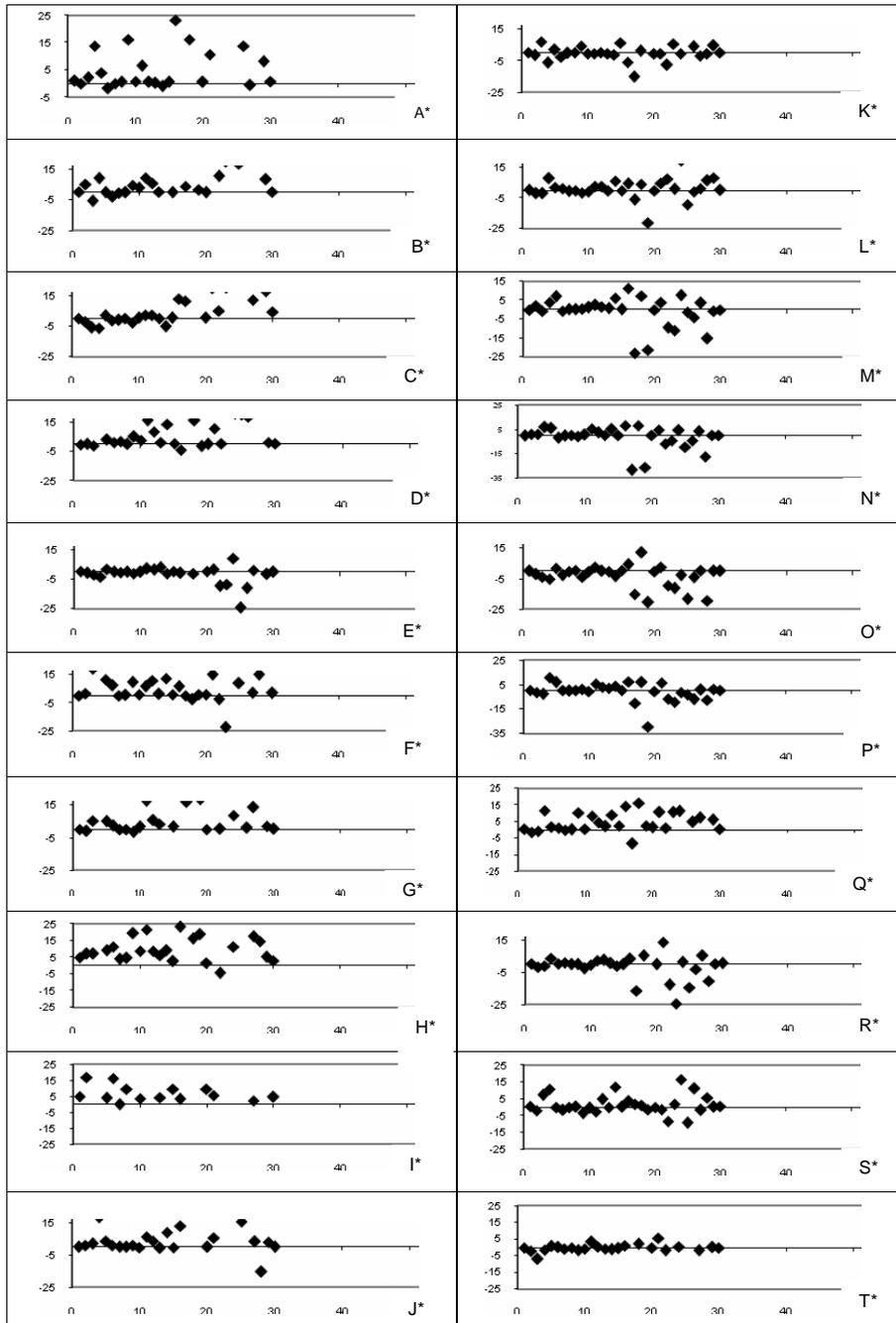


Figura 15 - Erros absolutos (diferenças entre severidades estimada e real) dos avaliadores sem experiência em avaliação de doenças: avaliador 1 (A*;K*); 2 (B*;L*); 3 (C*;M*); 4 (D*;N*); 5 (E*;O*); 6 (F*;P*); 7 (G*;Q*); 8 (H*;R*); 9 (I*;S*) e 10 (J*;T*), sem auxílio (A*-J*) e com auxílio (K*-T*) da escala diagramática.

3.3 REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE MILHO À MANCHA OCULAR

Nenhum genótipo de milho testado neste trabalho foi imune à doença. No entanto, na primeira época da safra 2006/2007, sob alta pressão da doença, a diferença entre os genótipos foi mais evidente, separando grupos distintos de ocorrência da doença (Tabela 5). Estes resultados foram confirmados nos demais experimentos. A maior pressão da doença na referida época, se deve provavelmente as condições climáticas mais propícias à doença, com chuvas mais regulares e um acumulado de 181 mm e 23,1 °C de temperatura média, nos quinze dias que antecederam as avaliações de severidade (Figuras 03 e 04). Nesta mesma época, foram observados os primeiros sintomas da doença aos 37 (d.a.s.) (Estádio 2) (Figura 16). Este fato reforça o aumento de importância da doença em condições propícias e genótipos suscetíveis.



Figura 16 - Folha de milho com as primeiras lesões de mancha ocular, 9 dias após a semeadura.

Os materiais mais suscetíveis à doença foram SPRINT, AG 9020 e SG 150 e os mais resistentes foram o AGN 30A06, CARGO, ATTACK, P30R50, P30F53 e AS1565. Nos materiais mais afetados pela doença, em ordem de apresentação, a severidade variou de 15,82 a 17,18%, enquanto nos que apresentaram menor severidade, a variação foi de 6,2 a 7,49%. Portanto dos 33 materiais testados na primeira época da safra 2006/2007, 9% foram considerados suscetíveis, 18% pouco suscetíveis e os demais com sensibilidade intermediária e severidade variando de

8,43 a 13,80%, sendo os três grupos estatisticamente diferenciados. Estes resultados mostram que a doença vem ganhando importância devido à ocorrência epidêmica e por se manifestar em vários híbridos de milho, e em alguns com alta severidade.

Na segunda época de cultivo, os híbridos AG9020 e SPRINT foram confirmados como os materiais com maior suscetibilidade à mancha ocular e entre os de menor suscetibilidade destacaram-se os híbridos P30R50, P30F53 e AS1565, complementados pelos híbridos AS 1560, AG 8021, BD 7912, 32R21, DKB 214, AX 892 e DKB 234. Os primeiros sintomas foram observados aos 35 dias após o plantio, no entanto, a pressão de doença ao longo do cultivo e no momento da avaliação foi 40% em média menor do que na primeira época. Este fato contribuiu para aumentar o número de genótipos que se diferenciou entre os mais resistentes. A severidade da doença, avaliada no estágio 5, foi próximo a 7% para os híbridos mais suscetíveis e 2,23% para os mais resistentes. As condições climáticas foram caracterizadas por uma precipitação de 52,5 mm e 21,2 °C de temperatura média, nos quinze dias que antecederam a avaliação de severidade (Figuras 03 e 04). O fator preponderante que determinou a menor intensidade da doença na segunda época foi o menor índice de pluviosidade e sua distribuição irregular, em relação à primeira época.

Observou-se no campo que a doença, embora tenha iniciado ainda no estágio 2, para as duas épocas de cultivo, progrediu lentamente no início da epidemia, principalmente nas folhas jovens da parte superior. A severidade começou a se intensificar no início do florescimento, nas folhas do terço médio das plantas de milho de todos os híbridos.

Tabela 5 – Severidade da mancha ocular (%) em genótipos de milho avaliados na safra 2006/2007, em 2 épocas de semeadura, 13/10/2006 e 27/12/2006, no município de Pato Branco.

Genótipos	Época 1* (110 d.a.s)	Genótipos	Época 2* (75 d.a.s)
SPRINT	17,18 a	AG 9020	7,12 a
AG 9020	16,87 a	SPRINT	6,99 a
SG 150	15,82 a	CARGO	5,20 b
AX 890	13,80 b	DKB 566	5,18 b
DKB 566	13,74 b	AS 32	4,93 b
DKB 234	13,74 b	AX 890	4,79 b
AX 892	12,48 b	DKB 979	4,70 b
AX 895	12,28 b	PENTA	4,53 b
SG 6418	11,87 b	PREMIUM FLEX	4,33 b
AS 3466	10,93 c	ATTACK	4,18 b
PENTA	10,83 c	AGN 35A42	3,99 b
AGN 2012	10,83 c	AGN 2012	3,96 b
AS 1545	10,62 c	DKB 950	3,95 b
BD 7912	10,41 c	AG 2020	3,95 b
AGN 35A42	10,20 c	SG 6418	3,85 b
AG 2020	10,10 c	AS 3466	3,78 b
BALU 761	9,89 c	AS 1570	3,73 b
P32R21	9,68 c	AX 895	3,62 c
DKB 950	9,58 c	AS 1545	3,53 c
DKB 979	9,57 c	BALU 184	3,37 c
AS 1570	8,95 c	AGN 30A06	3,33 c
AS 1560	8,95 c	BALU 761	3,33 c
BALU 184	8,85 c	SG 150	3,11 c
AG 8021	8,85 c	AS 1560	2,72 d
PREMIUM FLEX	8,64 c	AG 8021	2,62 d
AS 32	8,64 c	P30F53	2,56 d
DKB 214	8,43 c	BD 7912	2,39 d
AGN 30A06	7,49 d	P32R21	2,32 d
CARGO	6,56 d	AS 1565	2,24 d
ATTACK	6,45 d	DKB 214	2,20 d
P30R50	6,45 d	AX 892	1,95 d
P30F53	6,29 d	DKB 234	1,88 d
AS 1565	6,20 d	P30R50	1,33 d
CV %	14,83		23,23

*As médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de significância.
d.a.s.: dias após a semeadura.

Este resultado corrobora com os estudos realizados por Arny et al (1971), sobre a mancha ocular do milho afirmando que folhas maduras são mais suscetíveis à doença do que as folhas jovens.

Um grande número de lesões nas folhas pode vir a causar redução no rendimento de grãos, pois, segundo Dourado Neto e Fancelli (2000), 50 e 30% dos carboidratos transportados para o grão são oriundos das folhas da porção superior e do terço médio, respectivamente. Para que estas taxas sejam mantidas, torna-se importante que as folhas se mantenham saudáveis para que haja bom desempenho

fotossintético. Todavia, novas pesquisas devem ser conduzidas no Brasil, para relacionar a doença com o potencial de rendimento de cada híbrido.

Na safra 2007/2008, com menor intensidade da doença, observou-se o mesmo comportamento do híbrido AG 9020 como mais suscetível à mancha ocular, na primeira e segunda épocas de semeadura em Pato Branco. Houve a confirmação dos híbridos AS 1565, DKB 234 e P30F53, na primeira época, como sendo mais resistentes à doença (Tabela 6).

Os primeiros sintomas foram observados aos 16 dias após o plantio, na primeira época, contudo, a pressão da doença, durante o período de cultivo até o momento da avaliação de severidade, foi menor do que na primeira época da primeira safra. A severidade da doença, avaliada no Estádio 5, foi de 3,60 e 0,83 a 1,83 para os híbridos mais suscetíveis e mais resistentes, respectivamente. Durante os quinze dias de cultivo, que antecederam a avaliação de severidade, as condições climáticas caracterizaram-se por uma precipitação acumulada de 94,30 mm e 21,6°C de temperatura média (Figuras 03 e 04). Esta característica climática, de baixa pluviosidade, em relação à primeira época do primeiro ano de cultivo, pode ter influenciado para a baixa intensidade da doença.

Tabela 6 - Severidade da mancha ocular (%) em genótipos de milho, avaliados na safra 2007/2008 em duas épocas de semeadura em Pato Branco – PR e numa época em Palma Sola - SC.

Cultivares	Pato Branco - PR		Palma Sola - SC	
	1ª Época* (74 d.a.s.)	2ª Época* (74 d.a.s.)	Época única* (131 d.a.s.)	
SG 150	1,17 b	1,00 c	P30F53	1,34 c
SPRINT	1,83 b	2,50 b	DKB566	1,88 c
AS 1565	0,83 b	1,00 c	AG9020	11,13 a
DKB 234	0,67 b	1,00 c	AG8011	1,37 c
DOW 2A120	1,00 b	1,33 c	DKB234	2,08 c
AG 9020	3,60 a	3,83 a	AS1565	0,89 c
DKB 566	1,17 b	2,00 b	SPRINT	12,27 a
P30F53	1,00 b	1,00 c	SG150	6,82 b
DOW 2A106	1,00 b	1,17 c	-	-
AG 8011	1,33 b	1,83 b	-	-
CV%	12,08	11,36		

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na segunda época de cultivo o híbrido AG 9020 foi confirmado o mais suscetível à mancha ocular, e entre os mais resistentes estão o SG 150, AS 1565, DKB 234, DOW 2A120, 30F53 e DOW 2A106, com o mesmo comportamento observado na primeira época. Os primeiros sintomas foram observados aos 9 dias após a semeadura, nesta época. Isso pode ter sido influenciado pela alta precipitação durante esses 9 dias, de 102,2 mm e temperatura média neste período de 20°C (Figuras 03 e 04). Outra hipótese a ser considerada, seria de que o patógeno foi transmitido pela semente. Reifschneider e Arny (1979), estudando a possível transmissão de *K. zeae* pela semente, inocularam espigas de milho, 10 dias após a polinização, com esporos deste fungo para tentar o isolamento do mesmo, da semente. Relataram que o fungo *K. zeae* está localizado no embrião da semente e que alguns isolados obtidos foram usados em novas inoculações, em plântulas de milho e apresentaram comportamento patogênico. Todavia, apesar do rápido aparecimento dos sintomas, a doença progrediu lentamente, com baixa pressão durante o período de cultivo. A severidade observada, no Estádio 5 foi de 3,83 e 1 a 1,33% nos híbridos mais suscetíveis e menos suscetíveis, respectivamente. Durante os quinze dias que antecederam a avaliação de severidade, a precipitação acumulada foi de 47,8 mm e 22,1 °C de temperatura média (Figuras 03 e 04). Com relação aos dados meteorológicos, observa-se que nesta época, houve diminuição na precipitação acumulada e leve decréscimo na temperatura média em relação à primeira época do primeiro ano de cultivo, novamente influenciado no desenvolvimento da doença. Em estudos sobre o progresso da mancha ocular, Chinchila (1987), relatou que os sintomas da mancha ocular tornam-se muito pronunciados se houver condições ambientais favoráveis, como clima frio e úmido, e principalmente, quando as plantas se aproximam da maturidade, o patógeno se espalha rapidamente. Entretanto, inferir que com clima frio e úmido a doença ocorre com maior intensidade, não revela exatamente qual a amplitude das condições climáticas que beneficiam o estabelecimento do patógeno. Novos estudos devem ser conduzidos para determinar as condições ideais para o desenvolvimento da doença.

Como ocorrido nos outros experimentos, as avaliações realizadas no município de Palma Sola confirmaram os híbridos AG 9020 e SPRINT foram confirmados como os mais suscetíveis à mancha ocular e, entre os materiais que apresentaram menor severidade estão os híbridos P30F53, DKB 234 e AS 1565. Os

primeiros sintomas foram observados aos 38 dias após a semeadura, entretanto, ao longo do cultivo até a avaliação de severidade, a pressão da doença foi relativamente maior do que em Pato Branco, para o mesmo ano de cultivo. A severidade média foi de 11,7 e 1,5 para os híbridos mais suscetíveis e mais resistentes, respectivamente. Durante a quinzena anterior a avaliação de severidade, Estádio 6, as condições climáticas caracterizaram-se por uma precipitação acumulada de 97,3 mm e 20,5 °C de temperatura média (Figura 03 e 04). Em análise comparativa entre os dois locais de cultivo, no mesmo ano, observa-se que houve um aumento na precipitação acumulada em Palma Sola e diminuição da temperatura média, o que pode justificar a maior severidade da doença neste local.

Embora a doença tenha diminuído sua intensidade no segundo ano de cultivo, vale ressaltar que no primeiro ano de cultivo a semeadura foi realizada em área com monocultura de milho. Entretanto, no segundo ano, a área utilizada havia sido cultivada anteriormente em rotação com soja. Com isso, pode-se sugerir que o patógeno tenha sobrevivido nos restos culturais de milho, e desta forma, foi mantida a fonte de inóculo, causando a maior severidade da doença no primeiro ano de cultivo.

Em estudos sobre o desenvolvimento da mancha ocular com quatro tipos de preparo de solo, sob restos culturais de milho, Chinchila (1986), encontrou a maior severidade da doença nas parcelas onde não havia nenhum tipo de preparo, em relação à aquelas com aração. Em experimentos para avaliar rendimento em áreas com restos culturais de milho, com cultivo mínimo ou aração, foi observada uma redução no rendimento de 34 e 20%, respectivamente (REIFSCHNEIDER; ARNY, 1983). Outros autores revelam ainda que a severidade média de mancha ocular foi maior em campos com cultivos de milho em sucessão de milho do que em sucessão de soja, alfafa ou trigo (TENG et al., 1982).

O presente trabalho revela uma variabilidade quanto ao nível de resistência entre os híbridos testados, dependendo também da época e ano de semeadura.

Para o fator ambiente, observa-se que quanto maior a precipitação pluviométrica a mancha ocular teve melhor desenvolvimento, no entanto, novos estudos de amplitude climática, principalmente a correlação umidade e temperatura, para o desenvolvimento da doença devem ser conduzidos.

3.3.1 Respostas bioquímicas de plantas de milho à *K. zeae*

De acordo com os resultados das análises bioquímicas, percebe-se que não houve diferença significativa entre os híbridos para proteínas totais, fenóis totais e açúcares redutores, nos dois tratamentos (Tabela 7). Todavia, a atividade da enzima peroxidase foi maior para os híbridos AG 9020, AS 1565 e DKB 234, nos dois tratamentos. Este resultado mostra que o híbrido SPRINT apresenta menor atividade desta enzima em comparação aos outros híbridos, sendo que ela pode ter sido pronunciada para ativação de outras rotas de defesa nas quais, as mesmas, possuem envolvimento.

Comparando-se os dois tratamentos observa-se que após a inoculação houve aumento da atividade das peroxidases para os quatro híbridos estudados (Tabela 7). Pode-se sugerir que a inoculação induziu os híbridos à síntese destas enzimas. Entretanto, novos estudos devem ser conduzidos para analisar se as peroxidases estão realmente ligadas a respostas de defesa, principalmente nas plantas que apresentaram menor severidade da mancha ocular.

A alta atividade de peroxidases tem sido relacionada à resistência, e algumas vezes utilizada como marcador bioquímico de resistência em diversas culturas (LABANCA, 2002). Elas são glicoproteínas capazes de catalisar a produção de H_2O_2 , a formação de lignina, incorporação de glicoproteínas à parede celular, destruição peroxidativa do ácido indolilacético e de outros reguladores de crescimento. As peroxidases, bem como outras enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, atuam sobre as Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) de modo a livrar a célula de seu efeito deletério. As peroxidases não têm relação direta com a resistência das plantas, no entanto, a alteração de sua atividade é um indício de alteração do metabolismo da planta, como na formação da lignina pela polimerização de fenóis (LABANCA, 2002).

Em comparação aos dois tratamentos estudados, observa-se que os híbridos AS 1565 e DKB 234 apresentaram maior concentração de proteínas após a inoculação, não diferindo estatisticamente dos outros híbridos (Tabela 7). Todavia, esta concentração não foi suficientemente maior, nestes dois híbridos, para diferenciá-los dos outros nem para se poder inferir, que as proteínas estão ligadas à defesa nos híbridos que apresentaram menor severidade da doença. Novas análises de

proteínas devem ser realizadas para inferir se realmente, elas atuam de alguma forma, na defesa de plantas de milho contra mancha ocular.

Tabela 7 - Concentração de proteínas (mg.g. tecido), peroxidase (unid. enzimática.min.), fenóis totais (mg/g) e açúcares redutores (mg.g. tecido) presentes nos extratos foliares de plântulas de milho sem e com inoculação de 4 híbridos de milho com diferentes níveis de severidade de mancha ocular.

		Proteínas*	Atividade de Peroxidases*	Fenóis totais	Açúcares redutores
Sem inoculação	AG9020	1.300 aA	46.453 abB	3.093 ^{ns}	0.003 ^{ns}
	AS1565	0.370 aB	55.650 a B	2.683 ^{ns}	0.002 ^{ns}
	DKB 234	1.723 aB	55.603 a B	2.710 ^{ns}	0.002 ^{ns}
	SPRINT	2.123 aA	39.793 b B	2.946 ^{ns}	0.002 ^{ns}
Com inoculação	AG9020	1.876 aA	60.410 aA	2.586 ^{ns}	0.002 ^{ns}
	AS1565	3.986 aA	67.180 aA	2.493 ^{ns}	0.002 ^{ns}
	DKB 234	4.000 aA	58.796 aA	2.736 ^{ns}	0.002 ^{ns}
	SPRINT	1.743 aA	56.946 bA	2.510 ^{ns}	0.002 ^{ns}
	Média	2,14	55,10	2,72	0,002
	CV%	51,00	9,66	13,30	14,60

*Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, em cada genótipo, e maiúscula na coluna nos tratamentos com e sem inoculação, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

4 CONCLUSÕES

De acordo com as condições de desenvolvimento deste estudo, pode-se concluir que:

- Com 10 dias de incubação, 80% dos 35 isolados estudados, apresentaram coloração clara, e todos os isolados apresentaram aspecto coreáceo e enrugado;

- A maioria dos isolados obteve melhor crescimento micelial no meio MA em relação aos outros meios. Todavia, o maior grupo de alto crescimento micelial foi constatado em BSA.

- A utilização da escala diagramática para mancha ocular em milho permitiu quantificar os sintomas de forma acurada e precisa;

- Os híbridos AG 9020 e SPRINT apresentaram-se mais suscetíveis à mancha ocular, independente de épocas e local de cultivo, e os híbridos que apresentaram menor grau de suscetibilidade foram AS 1565, DKB 234 e P30F53;

- A maior atividade de peroxidases foi observada nos híbridos AG 9020, AS 1565 e DKB 234, após a inoculação.

- Em alta pluviosidade e temperaturas amenas pode ocorrer maior intensidade da mancha ocular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou uma grande variabilidade entre os isolados utilizados e seu crescimento radial em diferentes meios de cultura. Estes resultados podem justificar a escolha dos isolados para trabalhos futuros que visem o controle da mancha ocular. Além disso, novas pesquisas com outros meios de cultura podem ser conduzidas para avaliar outros meios que acelerem o crescimento de *Kabatiella zea*, tendo em vista que é um fungo de crescimento lento em relação a outros fungos. Torna-se necessário, em trabalhos futuros, a caracterização molecular destes isolados para saber se existem raças diferentes de *Kabatiella zea*, e caso existam, se estão diretamente relacionadas com a severidade da doença.

Excluído: encontrar

Outro aspecto de grande importância a ser estudado é a relação da mancha ocular com a produtividade do milho, caracterizar a porcentagem de danos que a doença causa, detectar quais os híbridos que apresentam menores níveis de danos e se existe algum híbrido que seja imune à doença. Paralelamente, deve-se fazer um estudo epidemiológico do fungo caracterizando sua forma de sobrevivência, disseminação, período de incubação e principalmente, caracterizar a amplitude climática favorável ao seu desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

AGROCERES. **Guia agrocere de sanidade**. São Paulo: Sementes Agrocere, 1996. 72p.

AMORIN, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 647-670.

ARAÚJO, J.R.G. et al. Alteração na atividade de peroxidase e concentração de fenóis em microtangerinas (*Citrus spp.*) infectadas por *Phytophthora parasitica*. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v.6, n.1, p. 1-5. 2008.

APPS. Associação Paulista de Produtores de Sementes e Mudanças. **Características agronômicas das cultivares de milho disponíveis no mercado na safra 2007/08**. [S.l.] Disponível em: http://www.apps.agr.br/upload/ax2_2703200842120900_tabela1.htm - Acesso em: 09 out. 2008.

ARNY, D.C. et al. Eyespot of mayze, a disease new to north America. **Phytopathology**, Saint Paul, v.6, n.1, p. 54-57. 1971.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996.

BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extratcts by thin-layer electrophoresis and chomatography. **Analitycal Biochemistry**. Orlando, v.17, p. 278-293. 1966.

BOGO, A. et al. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferente meios de cultura. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.3, p. 248-251. 2008.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência: noções básicas e perspectivas**. In: Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba, FEALQ, p. 11-27. 2005.

BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.72, p. 248-254. 1976.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. **Controle genético**. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de fitopatologia. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 729-758.

CAMOCHENA, R.C.; SANTOS, I.dos; MAZARO, S.M. Escala diagramática para avaliação da severidade da Mancha Ocular em milho causada por *Kabatiella zea*. **Ciência rural**. Santa Maria, v.38, n.8. p. 2124-2131. 2008.

CAMOCHENA, R.C. SANTOS, I. dos; MALAGI, G. Avaliação da sensibilidade de genótipos de milho à mancha ocular, causada por *Kabatiella zea*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 32, p. 225, 2007.

CANTARELLA, H. Calagem e adubação do milho. In: BULL, L.T. **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, POTAFOS, 1993. p.147-196.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medici and Hygiene**. Lisbon, v. 42; p. 225-226.1939.

CHIANG, M.S. HUDSON, M. Inheritance of resistance to *Kabatiella zea* eyespot of maize. **Phytoprotection**. Quebec, v.71, p.107-112. 1990.

CHINCHILA, C.M. Eyespot (*Kabatiella zea* Narita and Hiratsuka) disease progression curves in ten maize hybrids. **Turrialba**. Costa Rica, v. 37, n. 1, p. 37-43. 1987.

CHINCHILA, C.M. Efect of four tillage treatments on eyespot (*Kabatiella zea* Narita and Hiratsuka) development and grain yeld in maize. **Turrialba**. Costa Rica, v. 36, n. 4, p. 427-430. 1986.

CNA – Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil. **PIB confirma crescimento em 2007**. Disponível em <http://www.cna.org.br/> Acesso em: 21 nov., 2008.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Brasil conclui maior colheita de grãos da história**. Disponível em <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=755> Acesso em: 17 nov., 2008.

CUTRIM, F.A. et al. Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 32, n. 1, p. 85-88. 2006.

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

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.28, p.350-356. 1956.

ESTEVES, A. Incidência de doenças, sob condições de campo, em cultivares de milho (*Zea mays*), em Dourados. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9. p. 155-160. 1984.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Mancha de cercospora, antes um problema menor, começa a preocupar o produtor. **Cultivar**, Pelotas, v. 2, n. 17, p. 14-15. 2001.

GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. Botânica. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção de milho**. 2ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 41-70.

GODOY, C.V., AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 2, n. 26, p. 209-215. 2001.

GOMES, A.M.A. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. **Summa Phytopathologica**. Piracicaba, v. 30, p. 38-42. 2004.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidase. **Plant and Cell Physiology**. Tokio, v. 42, n. 5, p. 462-468. 2001.

HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. An advanced treatise-how disease develops in populations. **Plant disease**. v. 2, p.119-136. 1978.

HORSFALL, J.C.; BARRATT R. W. An improved grading system for measuring plant diseases. **Phytopathology**. Saint Paul, v.35, p.665. 1945.

JENNINGS, A.C. The determination al dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.118, p. 396-398. 1991.

JULIATTI, F.C. et al. Fungicidas na parte aérea do milho: evolução de doenças fúngicas, perdas, resposta de híbridos e melhoria da qualidade da produção. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 15, p. 277-334. 2007.

JULIATTI, F.C.; SOUZA, R. M. Efeito de épocas de plantio na severidade de doenças foliares e produtividade de híbridos de milho. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 103-112. 2005.

JULIATTI, F.C.; SANTOS, M.A. Métodos de avaliação de doenças de plantas induzidas por fungos e nematóides. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo. v.7, p. 407-454. 1999

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140f. Tese (Doutorado). ESALQ, Piracicaba, 2007.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino**

(*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 2002. 107p. Dissertação (Mestrado). ESALQ, Piracicaba, 2002.

LEITE, R.M.V.B.C.; AMORIM, L. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 28, p. 14-19. 2002.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S.F. Hospedeiro: Alterações fisiológicas induzidas por fitopatogenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.. **Manual de fitopatologia**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. p. 393-414.

LEVIC, J.; PENCIC, V. Utilization of carbon, nitrogen and sulfur compounds by *Kabatiella zae* Narita & Hiratsuka. **Phytopathology**, Saint Paul, v.128, n. 4, p. 321-332. 1990

MACHADO, A. A. **Esporulação de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. e variabilidade do método de inoculação de esporos em estudos de seleção de germoplasma resistente**. 1980. 75fp. Dissertação (Mestrado). ESALQ, Piracicaba. 1980.

MAGALHÃES, P. C. et al. Alterações nos níveis relativos de açúcares solúveis totais e de proteínas em plantas de milho infectadas por mollicutes. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. Minas Gerais, v.4, n.3, p. 335-343. 2005.

MARRIOTT, J.; BEEN, B.O.; PERKINS, C. The aethiology vascular streaking in cassava roots after harvest: association with water loss from wounds. **Plant Physiology**. Massachusetts, v. 44, p.38-42. 1978.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v.23, p.1091-1101. 1972.

MAZARO, S.M.; et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha-de-micosferela em morangueiro. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, n. 2, p. 648-652. 2006.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. Washington, v.31, p.426-428. 1959.

NARITA, T.; HIRATSUKA, Y. Studies on *Kabatiella zae* n. sp.; the causal fungus of a new leaf spot disease of corn. **Ann. Phytopathol. Soc.** Japan, v. 24, p. 147-153.

NOJOSA, G.B.A. et al. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 28, p.148-154. 2003

NUTTER JR., F.W. et al. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 8, p.806-812. 1993.

NUTTER JR., F.W.; WORAWITLIKIT, O. Disease Pro: a computer program for evaluating and improving a person's ability to assess disease proportion. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 1135. 1989.

PASCHOLATI, S F.; et al. Mecanismos de patogenicidade em fungos. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 6, p. 1-47. 1998.

LEITE, B; PASCHOLATI, S.F. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L.. **Manual de fitopatologia**. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. p. 417-452.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 491-552.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z. et al. Variabilidade genética de híbridos de milho para resistência genética à ferrugem tropical. **Revista Brasileira de milho e sorgo**. Minas Gerais, v.1, n. 1, p.63-69. 2002.

PEREIRA, L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia brasileira**. Brasília, v. 31, n. 6. 2006.

PINAZZA, L.A. Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. In: BULL, L.T., **Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 1-10.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; ARNY , D.C. Yield loss of maize caused by *Kabatiella zea*. **Phytopathology**. Saint Paul, v. 73, n. 4, p. 607-609. 1983.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; ARNY, D.C. Cultural and morphological variability of *Kabatiella zea*. **Transactions of the British Mycological Society**. London, v. 75, n. 2, p. 239-241. 1980.

REIFSCHNEIDER, F.J.B.; ARNY, D.C. Seed infection of maize (*Zea mays*) by *Kabatiella zea*. **Plant Disease Reporter**. Wisconsin, v. 63, n. 5, p. 352-354. 1979.

RESENDE, M.L.V. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra doenças. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 15, p. 133-184. 2008.

RODRIGUES, J. C. V. et al.. Elaboração e validação de escala diagramática para leprose dos citros. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 28, p. 192-196. 2002.

SANTOS, I. dos ; CAMOCHENA, R. ; MALAGI, G. Milho - Mancha ocular é nova ameaça. **Cultivar**. Grandes Culturas, Pelotas, v. 1, p. 20. 2007.

SANTOS, I. dos ; MALAGI, G., SILVA, A. Ocorrência de Mancha Ocular em Milho Causada por *Kabatiella Zeae* no Paraná e em Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 359. 2007.

SCHUELTER, A.R. et al. Controle genético da resistência do milho à mancha por *phaeosphaeria*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Minas Gerais, v. 2, n. 1, p.80-86. 2003.

SILVA, C.F.B. et al., Açúcares e a resistência das plantas às doenças. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v. 16, p. 337-364. 2008.

SILVA, R.G. et al. Controle genético da resistência genética aos enfezamentos do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.38, n.8, p.921-928. 2003.

SPÓSITO, M.B. et al. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 29, p. 81-85. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**; Tradução: SANTAREM et al., 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

TENG, P.S. et al. Eyespot, *Kabatiella zeae* prevalence and intensity in field corn and estimated 1981 losses in Minesota. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 7, p. 984. 1982.

TOMERLIN, Jr.; HOWELL, T.A. Distrain: a computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. **Plant Disease**, v. 72, p. 455-459. 1988.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v.55, p. 85-97. 1999.