

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL – MPV**

**DAIANA BAMPI**

**RESISTÊNCIA GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO DE *Stenocarpella macrospora* DO  
MILHO**

**LAGES – SC**

**2012**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL – MPV**

**DAIANA BAMPI**

**RESISTÊNCIA GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO DE *Stenocarpella macrospora* DO  
MILHO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Trezzi Casa  
Co-orientador: Prof. Ph.D. Luís Sangoi  
Profa. Dra. Marta Maria Casa Blum  
Pesquisador Dr. João Américo Wordell Filho

**LAGES – SC**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Bampi, Daiana

Resistência genética e controle químico de *Stenocarpella macrospora*  
do milho / Daiana Bampi ; orientador: Ricardo Trezzi Casa . – Lages,  
2012.  
63f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /  
UDESC.

1. Mancha-de-macrospora. 2. Resistência genética. 3. Fungitoxicidade.
4. *Zea mays*. I. Título.

CDD – 633.15

**DAIANA BAMPI****RESISTÊNCIA GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO DE *Stenocarpella macrospora* DO MILHO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Aprovado em: / /2012

Homologado em: / /2012

**Banca Examinadora:**

---

**Orientador/presidente:** Dr. Ricardo Trezzi Casa (UDESC/Lages - SC)

---

Dr. Leo Rufato  
Coordenador Técnico do Curso de Mestrado em Produção Vegetal e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – UDESC/Lages – SC

---

**Membro:** PhD. Luis Sangoi (UDESC/Lages – SC)

---

Dr. Cleimon Eduardo do Amaral Dias  
Diretor Geral do Centro de Ciências Agroveterinárias – UDESC/ Lages - SC

---

**Membro:** Dr. João Américo Wordell Filho (Epagri/Chapecó - SC)

---

**Membro:** Dra. Marta Maria Casa Blum (Uri/Erechim - RS)

Lages, Santa Catarina  
07 de Fevereiro de 2012

*Aos meus queridos pais Arlindo e Clecy, pelo  
carinho, educação e incentivo para realização deste  
trabalho, e que apesar da distância sempre  
estiveram ao meu lado.  
Ofereço e dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado nessa importante caminhada.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, educação, dedicação e incentivo na realização deste trabalho. Meus eternos agradecimentos.

Ao meu orientador Ricardo Trezzi Casa, por ter me aceitado como orientada, pela paciência, amizade, pelo exemplo de profissionalismo e pelos enormes conhecimentos transmitidos. Muito obrigado!

Aos co-orientadores PhD. Luis Sangoi, Dr. João Américo Wordell Filho e Dra. Marta Maria Casa Blum pelo apoio, amizade, sugestões e ensinamentos.

Aos colegas da pós-graduação: Lenita, Rosiane, Francine, Giovani, Cristiano e Meyrielle pelo companheirismo.

Aos meus amigos: Gisele, Gilmar, Joana, Daniellé e Vanessa que em algum momento desta caminhada foram importantes para que eu chegasse até aqui.

A todos que colaboraram na realização do trabalho de Laboratório, Casa de Vegetação e campo, em especial a Meyrielle, Paula, Cleber, Cristiano, Juan, Clodoaldo e Francisco, pois sem essa equipe não teríamos conseguido realizar o trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal.

A UDESC pelo ensino gratuito e de qualidade.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade.

Muito obrigado!

## RESUMO

BAMPI, Daiana. RESISTÊNCIA GENÉTICA E CONTROLE QUÍMICO DE *Stenocarpella macrospora* DO MILHO. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Área: Fitopatologia) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2012.

A mancha-de-macrospora, causada pelo fungo *Stenocarpella macrospora*, tem se tornado uma das doenças mais importantes na cultura do milho nos últimos anos no Brasil. Os objetivos do trabalho foram: a) avaliar a resistência de híbridos de milho a mancha-de-macrospora; b) determinar a sensibilidade de *S. macrospora* a fungicidas pela inibição do crescimento do micélio e germinação de conídios; c) avaliar o controle protetor e curativo da doença em plantas jovens de milho; d) quantificar o efeito de fungicidas na expansão da mancha-de-macrospora. Quanto a resistência foram avaliados 52 híbridos e dois isolados do fungo. A inoculação foi feita no estágio fenológico V2, depositando em cada planta 0,2 mL da suspensão de  $7 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ . A severidade da doença foi avaliada aos 14 dias após a inoculação. Quanto à sensibilidade de *S. macrospora in vitro* foram avaliados 12 fungicidas, seis concentrações e dois isolados do fungo. A porcentagem de inibição do crescimento micelial e germinação de conídios foi calculada em relação à testemunha, estimando-se valores de concentração inibitória de 50% ( $\text{CI}_{50}$ ). A eficiência de fungicidas no controle protetor e curativo foi determinada em casa-de-vegetação, com o isolado de SC e o híbrido AS1565. Foram avaliados 16 fungicidas, aplicados no estágio V2. No controle preventivo a inoculação de 0,2 mL da suspensão de  $7 \times 10^4$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  foi realizada 48 horas depois da aplicação. No controle curativo a inoculação foi realizada 48 horas antes da aplicação. A severidade da doença foi determinada 21 dias após a inoculação. No controle da expansão da mancha-de-macrospora foram avaliados sete fungicidas aplicados diretamente em folhas de milho AS 1565 com lesões foliares. As lesões foram mensuradas a cada três dias por um período de 27 dias. Em cada lesão também foram quantificados o número de picnídios  $\text{cm}^{-2}$ . Houve diferença significativa na severidade entre os híbridos. Não houve efeito significativo dos isolados do fungo sobre a severidade da doença. Não foi encontrado nenhum híbrido resistente. A severidade da doença variou de 8,88% para o híbrido 30A30HX a 17,76% para o AO 1050. Foi constatado que os fungicidas testados foram eficazes na inibição do crescimento do micélio, sendo que a  $\text{CI}_{50}$  foi menor que 1 ppm para todos os fungicidas, não havendo diferença entre isolados. Na inibição da germinação de conídios as estrobilurinas apresentaram maior fungitoxicidade, pois a  $\text{CI}_{50}$  ficou entre 0,0035 e 0,03 ppm, sendo que o isolado de SC mostrou maior sensibilidade aos fungicidas. Na aplicação preventiva todos os fungicidas diferiram da testemunha, reduzindo em média 85% à severidade da mancha-de-macrospora em relação à testemunha. No controle curativo todos os fungicidas diferiram da testemunha, contudo as misturas de triazóis + estrobilurinas mostraram maior eficácia, reduzindo em média 75% a severidade da doença, enquanto que os produtos isolados como as estrobilurinas reduziram 62%, benzimidazóis 55% e triazóis 38%. O fungicida tebuconazole e as misturas de triazóis + estrobilurinas, reduziram em média 68% a expansão da mancha-de-macrospora, e 58,7% a formação de picnídio  $\text{cm}^{-2}$ . Foi constatado que apesar de não haver híbridos resistentes existe variabilidade genética entre os híbridos testados e que a aplicação de fungicidas reduz significativamente a severidade da mancha-de-macrospora.

**Palavras-chave:** Mancha-de-macrospora. Resistência Genética. Fungitoxicidade. *Zea mays*.



## ABSTRACT

BAMPI, Daiana. GENETICS RESISTANCE AND CHEMICAL CONTROL OF *Stenocarpella macrospora* OF MAIZE. 2012. 63 f. Dissertation (Mestrado em Produção Vegetal – Área: Fitopatologia) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2012.

The macrospora spot, caused by the fungus *Stenocarpella macrospora*, has become one of the most important maize diseases in Brazil in recent years. The objectives of the study were: a) evaluate the resistance of maize hybrids macrospora spot b) determine the sensitivity of *S. macrospora* to fungicides by inhibition of mycelial growth and conidial germination c) evaluate the protective and curative control of the disease in young corn plants d) quantify the effect of fungicides on control the expansion macrospora spot. The resistance was evaluated on 52 hybrids and two isolates of the fungus. The inoculation was made at the V2 developmental stage, placing each plant in 0.2 mL of the suspension of  $7 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup>. Disease severity was evaluated 14 days after inoculation. The sensitivity of *S. macrospora* in vitro were evaluated 12 fungicides, six concentrations and two isolates of the fungus. The percentage of inhibition of mycelial growth and conidial germination was calculated in comparison with control, estimation of 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). The efficiency of fungicides to control protective and curative was determined in a greenhouse, with the isolated SC and the hybrid AS1565. We evaluated 16 fungicides, applied at V2. Preventive control the inoculation was made depositing 0.2 mL of the suspension of  $7 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup> 48 hours after application. In the curative control the inoculation was made 48 hours before application. Disease severity was determined 21 days after inoculation. In control the expansion of macrospora spot seven fungicides were evaluated, applied directly to leaves of maize with leaf lesions with hybrid AS 1565. The lesions were measured every three days for a period of 27 days. In each lesion was also quantified the number of pycnidia cm<sup>2-1</sup>. There was significant difference in severity leaf among the hybrids. There was no significant effect of isolates of the fungus on the severity of the disease. Resistant hybrids were not found. The disease severity ranged from 8.88% for hybrid 30A30HX to 17.76% for the AO 1050. The fungicides tested were effective in inhibiting the growth of the mycelium, and the IC<sub>50</sub> was less than 1 ppm for all fungicides. There was no difference between isolates. The strobilurins had higher fungitoxicity in inhibition of germination of the conidia, and the IC<sub>50</sub> was between 0.0035 and 0.03 ppm, and the isolated SC showed a higher sensitivity to the fungicides. In preventive application, all fungicides differed from the control, reducing the average 85% the severity macrospora spot compared to control. In the curative control all fungicides differed from the control, but mixtures of triazole + strobilurin showed greater efficiency, reducing an average of 75% disease severity, whereas the isolated products as the strobilurins reduced 62%, benzimidazoles 55% and triazoles 38% . The fungicide tebuconazole, and mixtures of triazoles + strobilurins, reduced on average 68% expansion of the macrospora spot, and 58.7% the formation of pycnidia cm<sup>2-1</sup>. It although no resistant hybrid was found genetic variability exists among the hybrids tested and that the application of fungicides significantly reduced the severity of the macrospora spot.

**Key-words:** Macrospora spot. Genetic resistance. Fungitoxicity. *Zea mays*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Híbridos de milho submetidos à avaliação de resistência à mancha-de-macrospora. Lages, SC, 2011.....	25
Tabela 2 - Severidade da mancha-de-macrospora em 52 híbridos de milho, considerando a média de dois isolados do fungo em estágio V4 (quatro folhas totalmente expandidas). Lages, SC, 2011.....	27
Tabela 3 - Resistência a mancha-de-macrospora considerando híbridos transgênicos e convencional. Lages, SC, 2011.....	28
Tabela 4 - Fungicidas, isolado, equação de regressão e intervalo da concentração inibitória de 50 % (CI <sub>50</sub> ) e 100 % (CI <sub>100</sub> ) do crescimento micelial de <i>Stenocarpella macrospora</i> . Isolado SC (Lages, SC) e MT (Lucas do Rio Verde, MT). Lages, SC, 2011.....	43
Tabela 5 - Fungicidas, isolado, equação de regressão e intervalo da concentração inibitória de 50 % (CI <sub>50</sub> ) e 100 % (CI <sub>100</sub> ) da germinação de conídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> . Isolado SC (Lages, SC) e MT (Lucas do Rio Verde, MT). Lages, SC, 2011.....	48
Tabela 6 - Ação preventiva de fungicidas na severidade da mancha-de-macrospora em plantas jovens do milho híbrido AS 1565. Lages, SC, 2011.....	51
Tabela 7 - Ação curativa de fungicidas na severidade da mancha-de-macrospora em plantas jovens do milho híbrido AS 1565. Lages, SC, 2011.....	52
Tabela 8 - Tamanho médio de lesões da mancha-de-macrospora em folhas de plantas do híbrido AS1565 em função da aplicação de fungicidas. Lages, SC, 2011.....	54
Tabela 9 - Número médio de pínidios por cm <sup>2</sup> nas lesões de mancha-de-macrospora e inibição da formação de picnídio (%) em relação à testemunha, em folhas de plantas do híbrido AS 1565, 27 dias após a aplicação de fungicidas. Lages, SC, 2011.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mancha-de-macrospora: lesões iniciais (A); lesões necróticas com tecido dilacerado (B); formação de picnídio do fungo nas lesões (C); liberação do cirro de conídios do picnídio (D). Fotos: Casa, R.T. Lages, SC, 2011.....	16
Figura 2 - Crescimento micelial de <i>Stenocarpella macrospora</i> em função da concentração dos fungicidas metconazole (A) e tiabendazole (B). Lages, SC, 2011.....	36
Figura 3 - Conídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> não germinados (A) e conídios germinados (B). Lages, SC, 2011.....	38
Figura 4 - Inibição do crescimento micelial de <i>Stenocarpella macrospora</i> em função da concentração de fungicidas (triazóis). Dados linearizados. Lages, SC, 2011....	45
Figura 5 - Inibição do crescimento micelial de <i>Stenocarpella macrospora</i> em função da concentração de fungicidas (benzimidazóis e estrobilurinas). Dados linearizados. Lages, SC, 2011.....	46
Figura 6 - Inibição da germinação de conídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> em função da concentração de fungicidas (triazóis). Dados linearizados. Lages, SC, 2011.....	49
Figura 7 - Inibição da germinação de conídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> em função da concentração de fungicidas (benzimidazóis e estrobilurinas). Dados linearizados. Lages, SC, 2011.....	50
Figura 8 - Expansão de lesões da mancha-de-macrospora (mm) em função da aplicação de fungicidas no híbrido de milho AS 1565. Lages, SC, 2011.....	54

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 RESISTÊNCIA DE HÍBRIDOS DE MILHO À MANCHA-DE-MACROSPORA.....	21
2.1 RESUMO.....	21
2.2 ABSTRACT.....	22
2.3 INTRODUÇÃO.....	23
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	26
2.6 CONCLUSÕES.....	30
3 EFICÁCIA DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DE <i>Stenocarpella macrospora</i> .....	31
3.1 RESUMO.....	31
3.2 ABSTRACT.....	32
3.3 INTRODUÇÃO.....	33
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.4.1 Sensibilidade micelial de <i>Stenocarpella macrospora</i> a fungicidas <i>in vitro</i> .....	34
3.4.2 Sensibilidade de conídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> a fungicidas <i>in vitro</i> .....	36
3.4.3 Controle preventivo e curativo da mancha-de-macrospora milho.....	38
3.4.4 Ação de fungicidas no controle da expansão da mancha-de-macrospora e formação de picnídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> .....	40
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.5.1 Sensibilidade micelial de <i>Stenocarpella macrospora</i> a fungicidas <i>in vitro</i> .....	41
3.5.2. Sensibilidade de conídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> a fungicidas <i>in vitro</i> .....	46
3.5.3 Controle preventivo e curativo da mancha-de-macrospora.....	51
3.5.4 Ação de fungicidas no controle da expansão da mancha-de-macrospora e formação de picnídios de <i>Stenocarpella macrospora</i> .....	53
3.6 CONCLUSÕES.....	56
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo. Os Estados Unidos são considerados os maiores produtores de milho, a China é o segundo País com maior produção e o Brasil está em terceiro lugar (USDA, 2011). Sua relevância se deve a multiplicidade de seus usos, o qual inclui o consumo humano e animal e diversas aplicações industriais. Sendo de importância não só por seu papel econômico, como também pelo fator social, gerando oportunidades de trabalho e renda em toda a cadeia produtiva com destaque para a indústria alimentar.

Há indicações de que sua origem tenha sido no México, América Central. É uma das culturas mais antigas do mundo. Possui em sua composição riquezas em carboidratos (60%), principalmente na forma de amido, assim como em proteínas (10%), lipídios (4%), além de minerais e vitaminas (FANCELLI e LIMA, 1982).

O uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo deste cereal (cerca de 70% no mundo). Nos Estados Unidos, cerca de 50% da produção é destinada a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo do ano agrícola (DUARTE et al., 2006).

A produção mundial de milho na safra 2010/2011 foi de 828,29 milhões de toneladas conforme dados do “*United States Department of Agriculture*” (USDA, 2011). De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011), o Brasil contribuiu, na safra agrícola de 2010/11, com 57,5 milhões de toneladas numa área cultivada de 14,2 milhões de hectares, com uma produtividade média de 4,15 t/ha, sendo que a maior produção encontra-se concentrada na região Sul e Centro-Oeste do Brasil. O estado de Santa Catarina foi o quinto maior produtor brasileiro de milho na safra 2010/11. O estado produziu 3,5 milhões de toneladas em 548,2 mil hectares (CONAB, 2011). No entanto, Santa Catarina é considerado estado importador de milho, pois a cultura é fundamental para sustentabilidade da agroindústria de frangos e suínos.

A produção no Brasil vêm aumentando nas últimas décadas (CONAB, 2011), porém a produtividade brasileira é considerada baixa se comparada ao potencial produtivo da cultura. A baixa produtividade brasileira pode ser ocasionada por fatores abióticos, como as condições climáticas desfavoráveis de algumas regiões e por práticas de manejo inadequadas, ou por fatores bióticos, dos quais se destacam os fungos patogênicos que causam podridões de colmo e da espiga e as manchas foliares.

O milho é uma cultura que apresenta grande habilidade fisiológica de conversão de CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos e elevado potencial produtivo. A translocação destes compostos orgânicos para os grãos pode ser alterada pelas condições desfavoráveis que ocasionam estresse a cultura (TOLLENAAR, 1977), assim a redução de área foliar fotossintetizante ocasionada pelas doenças foliares pode afetar o potencial produtivo desta cultura. Além disso, esta cultura apresenta acentuada sensibilidade aos fatores bióticos e abióticos, pequena plasticidade foliar, reduzida prolificidade e limitada capacidade de compensação de espaços (SANGOI et al., 2007). Por isto é necessário um manejo adequado para que a cultura possa manifestar sua capacidade produtiva.

A expansão da área cultivada em semeadura direta proporcionou uma alteração no microclima e na biologia do agroecossistema, com reflexos nas populações dos agentes causais das doenças do milho. A presença dos restos culturais sobre a superfície do solo beneficia a sobrevivência de muitos fitopatógenos (REIS et al., 2004).

A manifestação de determinados patógenos em cada safra agrícola é dependente das condições ambientais para o seu desenvolvimento e da fonte de inóculo presente na lavoura. Na região Sul do Brasil na safra agrícola de 2009/10 foi observado elevada incidência de cercosporiose e ferrugem comum. Já na safra 2010/11 houve predominância da mancha-de-macrospora, o que ocasionou elevada incidência de podridão branca da espiga e grãos ardidos. Foi constatado que lesões foliares da mancha-de-macrospora na folha da espiga tem relação positiva com incidência de podridão de espigas e consequente incidência de grãos ardidos e redução da produtividade. Bampi et al. (2011) constatou redução de produtividade de 2.802 kg ha<sup>-1</sup> em plantas que apresentavam mancha-de-macrospora na folha da espiga e aumento de 22% na incidência de podridão de espiga e 11% de acréscimo na incidência de grãos ardidos.

O fungo *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle] apresenta no campo, em seu ciclo biológico, somente a forma anamórfica (imperfeita ou assexuada). *S. macrospora* apresenta picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados, com coloração marrom-escuro a preta, paredes grossas, diâmetro de 150-300 µm e um ostíolo protuberante papilado. Os conidióforos são normalmente ausentes. Apresentam células conidiogênicas enteroblásticas, fialídicas, cilíndricas, formadas nas células internas da parede do picnídio. Os conídios são de coloração pardos-oliva a pardos, cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, medindo 44-82 x 7,5-11,5 µm, bicelulados e comumente com 1-2 septos (1-3) (SUTTON e WATERSTON, 1966; SUTTON, 1980).

Em meio de cultura de batata-sacarose-ágar (BSA), o fungo apresenta crescimento do micélio rápido, aéreo e cotonoso, cobrindo a placa de Petri de 90 mm de diâmetro em 5 a 6

dias. Com 10 dias as colônias apresentam cor branca (REIS et al., 2004; CASA et al., 2006). Em papel filtro (“Blotter Test”), as colônias de *S. macrospora* permanecem brancas à bege 15 dias após a incubação das sementes (MÁRIO e REIS, 2001).

A formação de picnídios ocorre sobre os grãos em teste de patologia de sementes pelo método de “Blotter Test” ou em meios de cultura agarizados (BSA, farinha de milho e farinha de aveia) e em pedaços de folha de milho superficialmente embebidos nestes meios agarizados (LATTERELL e ROSSI, 1983; CASA et al., 1998). Na literatura não há relato da presença de raças de *S. macrospora*. No entanto, sabe-se da existência de variação no grau de agressividade entre diferentes isolados do patógeno (CASA et al., 2006).

A espécie *S. macrospora* foi relatada pela primeira vez sobre colmos de milho no ano de 1896, em Auburn, Alabama, Estados Unidos (EARLE, 1897). Na África do Sul, o fungo *S. macrospora* foi relatado pela primeira vez por Marasas e Van Der Westhuizen (1979) causando mancha foliar e podridão da espiga. Em 1980, *S. macrospora* foi relatado pela primeira vez na Nicarágua causando mancha foliar (LLANO e SCHIEBER, 1980). No Brasil, a ocorrência de *S. macrospora* foi relatada pela primeira vez por Johann (1935), no Estado de São Paulo, causando podridão em sementes. Porém, os sintomas de mancha foliar somente foram relatados em 1973 na Bahia, após realizado teste de patogenicidade e a descrição morfológica do fungo (RAM et al., 1973). A espécie *S. macrospora* também tem sido encontrada causando mancha foliar em lavouras de milho em todas as regiões do Brasil, porém, não devidamente identificada, pois é confundida com a helmintosporiose comum (CASA et al., 2010).

Na Região Sul do Brasil, *S. macrospora* está relacionada com a germinação de sementes, emergência e estabelecimento de plântulas, podridões do colmo e da espiga e mancha foliar (CASA et al., 2000; REIS e CASA, 2001).

As manchas foliares iniciais são pequenas áreas do limbo foliar com aspecto de tecido encharcado. O tecido infectado torna-se necrosado, de cor parda, com manchas de forma irregular que medem normalmente 1 a 3 cm de comprimento e 0,5 a 1,0 cm de largura, com bordo amarelo, avermelhado ou arroxeadado (Figura 1A), que podem apresentar anéis concêntricos mais escuros a partir do ponto inicial de infecção. As lesões aumentam de tamanho estendendo-se no sentido longitudinal da folha, podendo dilacerar o tecido vegetal infectado (Figura 1B). No tecido necrosado ocorre formação dos picnídios do fungo, na forma de pequenos pontos negros (Figura 1C), subepidérmicos, isolados ou agrupados, sob os quais podem ser observados a extrusão dos cirros de conídios de cor preta (Figura 1D) (CASA et al., 2010). A doença torna-se mais agressiva em virtude da grande produção de inóculo sobre



lesões, que contribui para o aumento do potencial de inóculo disponível para a infecção do colmo e da espiga.

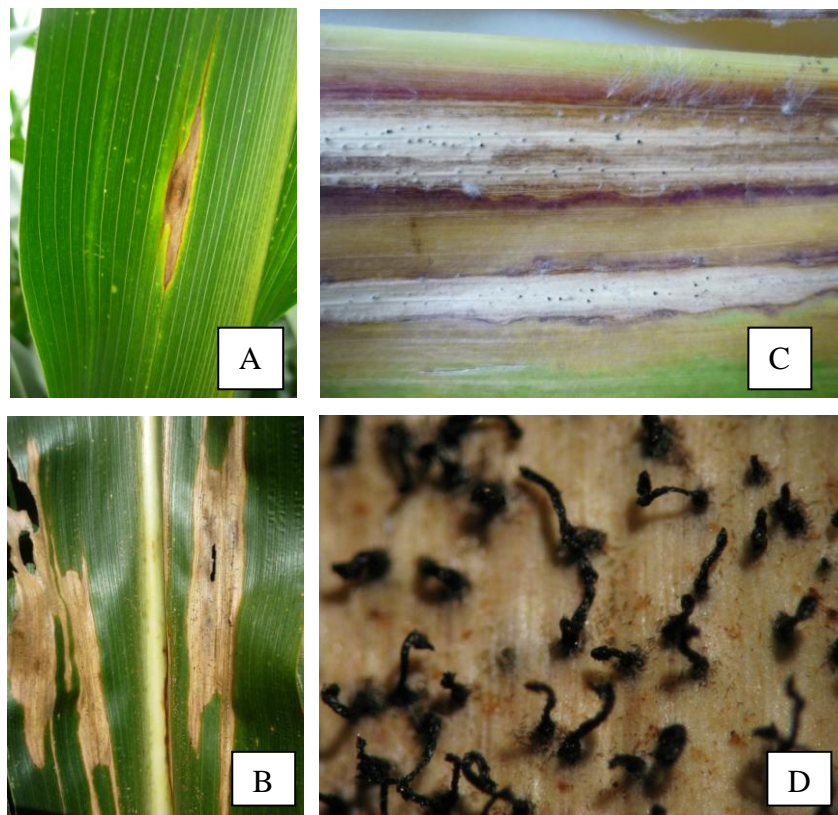


Figura 1 - Mancha-de-macrospora: lesões iniciais (A); lesões necróticas com tecido dilacerado (B); formação de picnídio do fungo nas lesões (C); liberação do cirro de conídios do picnídio (D). Fotos: Casa, R.T. Lages, SC, 2011.

O fungo *S. macrospora* parasita plantas de milho (SUTTON e WATERSTON, 1966; WHITE, 1999). É um patógeno necrotrófico que apresenta fase parasitária na planta viva e fase saprofítica em restos culturais do milho. Na literatura nacional, a maior parte dos trabalhos não menciona os hospedeiros para *S. macrospora*, assumindo que o milho é considerado o único hospedeiro (COSTA NETO, 1976; PINTO et al., 1997; REIS et al., 2004; PEREIRA et al., 2005; CASA et al., 2006).

O fungo sobrevive como micélio no endosperma e no embrião das sementes (MCGEE, 1988; RHEEDER et al., 1990; CASA et al., 1998). O armazenamento da semente infectada garante a sobrevivência do patógeno até o momento da semeadura, quando recebe os estímulos do ambiente para iniciar o processo de germinação (CASA et al., 2006). Casa et al. (1998) relatam frequência média de 18,5% e 21,4% em sementes de milho produzidas no sul e sudeste do Brasil, safras 94/95 e 95/96, respectivamente, tratadas comercialmente com fungicidas. A semente infectada é um dos principais veículos de disseminação de *S.*

*macrospora* sendo responsável pela introdução do fungo em novas áreas de cultivo (MCGEE, 1988; CASA et al., 2006).

Na palha, o fungo sobrevive formando picnídios, produzindo e liberando cirros de conídios, que constituem o inóculo primário para as plantas do novo cultivo (CASA et al., 2003). No sistema semeadura direta, os restos culturais do milho são deixados sobre a superfície do solo. O posicionamento da palha sobre o solo torna a decomposição mais lenta, o que aumenta o período de sobrevivência dos patógenos necrotróficos durante a fase saprofítica (CASA et al., 2003). Desta forma, o inóculo encontra-se num posicionamento ideal para esporulação, liberação e dispersão. Por isso, a intensidade de diplodia no sistema semeadura direta é maior sob monocultura (MORA e MORENO, 1984; FLETT e WEHNER, 1991). Esses autores verificaram 11 meses após a colheita a produção de 90,6 e 37,9 picnídios/cm<sup>2</sup> de palha e 39,5 e 24,3% de esporos germinados, respectivamente, para os restos culturais remanescentes na superfície do solo e enterrados. Casa et al. (2003) detectaram viabilidade de *S. macrospora* superior a 90% em colmos de milho mantidos na superfície do solo até 320 dias de exposição no campo.

Em relação à dispersão vertical e horizontal dos conídios de *S. macrospora*, a partir dos restos culturais naturalmente infectados sob a superfície do solo, foi constatado que 60% dos conídios do fungo são capturados até altura de 25 cm acima da palha infectada (CASA et al., 2004). Com altura superior a 50 cm há redução na captura de mais de 50%. Possivelmente, o tamanho e o peso dos conídios e/ou do cirro inteiro liberado do picnídio e/ou a altura do respingo do impacto da gotícula d'água sobre o picnídio, não permite que o inóculo seja dispersado abundantemente a alturas superiores a 25 cm da fonte de inóculo. Os conídios capturados acima de 50 cm de altura possivelmente são responsáveis por uma das vias de inoculação do fungo na espiga e folha da espiga. Na dispersão horizontal, os conídios do fungo foram capturados até distância de 120 m da fonte de inóculo. Apesar de ter-se capturado esporos distantes 120 m da palha infectada, dificilmente esse inóculo é suficiente para causar epidemia em áreas de rotação de culturas. Por outro lado, em regiões de monocultivo de milho a disponibilidade de inóculo é maior (CASA et al., 2004).

Nos tecidos da folha os conídios de *S. macrospora* germinam entre 12 e 15 h após sua deposição e sob temperatura entre 28 e 32 °C (BRUNELLI et al., 2005). Temperaturas entre 25 e 32 °C (EDDINS, 1930) com umidade relativa do ar acima de 50% (LATTERELL e ROSSI, 1983), são condições ideais para germinação dos conídios.

Em condições controladas, a faixa de temperatura entre 23 e 28 °C proporciona maior crescimento do micélio e entre 26 a 29 °C a maior porcentagem de germinação dos conídios de *S. macrospora* (CASA et al., 2007).

A liberação do cirro de conídio através do ostíolo do picnídio, em pedaços de colmos de milho, é maior na faixa térmica de 30 a 35 °C, sob luz contínua (CASA et al., 2007).

A infecção natural em espigas ocorre, principalmente, no período de duas a três semanas após a polinização do milho, com clima úmido (molhamento) e temperatura de 28 à 30 °C (SHURTLEFF, 1992). A infecção da espiga causada por *S. macrospora* pode ter origem com inóculo produzido sobre as lesões foliares. O fungo pode penetrar na espiga e colonizar os grãos pela germinação dos conídios que foram removidos dos picnídios e transportados pela água até a base da espiga (REIS et al., 2004; BAMPI et al., 2011).

O fato de *S. macrospora* infectar exclusivamente plantas de milho, não formar estrutura de repouso e apresentar conídios dispersados a curtas distâncias, constitui característica biológica do patógeno, que propicia manejar a doença reduzindo ou eliminando a fonte de inóculo primário (CASA et al., 2006). Desta forma, as principais estratégias de controle de *S. macrospora* são uso de sementes saudáveis, tratamento de sementes com fungicida eficiente, rotação de culturas, evitar alta densidade de plantas e manter equilíbrio de nutrientes principalmente N e K (REIS et al., 2004; CASA et al., 2006).

A necessidade constante da alta produção de milho no Estado de Santa Catarina para o consumo animal vem dificultando o manejo das doenças através de práticas culturais, principalmente a rotação de culturas.

A resistência genética de plantas é um dos métodos mais eficientes e econômicos no controle de doenças, porém não há ou são escassas e imprecisas informações sobre a resistência genética de híbridos de milho para mancha foliar causada por *S. macrospora* (OLANTINO et al., 1999b; CRUZ et al., 2010). No entanto, a utilização de cultivares resistentes é uma ótima estratégia de manejo de doenças, uma vez que, não causa nenhum tipo de impacto negativo ao meio ambiente, é perfeitamente compatível com outras alternativas de controle e é, muitas vezes, suficiente para o controle da doença (COSTA et al., 2009).

No caso do controle químico da mancha-de-macrospora não existe registro no Ministério da Agricultura (MAPA) de fungicida indicado específico para a doença (MAPA, 2011). Entre os fungicidas disponíveis no mercado brasileiro para o controle de outras doenças do milho, os sistêmicos, pertencentes aos grupos químicos dos triazóis e das estrobilurinas, são os mais utilizados isoladamente ou em misturas pré-fabricadas. Os benzimidazóis também são utilizados na cultura do milho, porém, com menor intensidade.

As moléculas de fungicidas pertencentes ao grupo químico das estrobilurinas atuam na inibição da respiração mitocondrial dos fungos, pelo bloqueio da transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo  $c_1$  no sítio  $Q_e$ , interferindo na produção de ATP (FRAC, 2000), sendo mais efetivas nas fases iniciais do seu ciclo de vida, ou seja, na germinação dos esporos e nos processos iniciais de infecção (COSTA e COTA, 2009). Os fungicidas triazóis, atuam na inibição da biossíntese do ergosterol ou outros esteróis - ISE (componentes funcionais na manutenção da integridade da membrana plasmática dos fungos), danificando as membranas celulares do fungo e alterando sua permeabilidade, resultando na perda de seus elementos intracelulares. Esses fungicidas não inibem a germinação de esporos, pois utilizam nessa fase os esteróis armazenados e, podem, assim germinar na ausência de sua biossíntese (FRAC, 2000). Podem promover o controle de patógenos fúngicos em fases mais avançadas do seu ciclo, como a colonização (crescimento micelial) e a pré-esporulação. Portanto, as aplicações de produtos pertencentes a esses grupos químicos apresentam maior eficiência quando são realizadas nos sintomas iniciais das doenças no campo (COSTA e COTA, 2009), no entanto, os autores não definem o que é início de doença. Os fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis interferem na mitose durante a divisão da metáfase, o fuso mitótico é destruído e os núcleos filhos fracassam em separar-se, resultando na morte das células (FRAC, 2000).

A utilização de misturas com fungicidas de modo de ação diferentes aumenta o espectro de controle de fungos, o período residual das aplicações e contribuem para evitar o desenvolvimento da redução da sensibilidade de fungos aos fungicidas (REIS et al., 2010).

O controle químico das doenças foliares em milho é uma prática que vem sendo muito utilizada na agricultura. A aplicação de fungicidas tem proporcionado aumento de produtividade pela redução da intensidade de doença. Esses resultados têm sido visualizados, normalmente, como incremento de produtividade em relação a áreas não pulverizadas (PINTO et al., 2004). Costa e Cota (2009), relataram que essa proteção é conferida durante parte do período de enchimento dos grãos, estágio mais importante do ciclo da cultura.

Por outro lado, a aplicação de fungicidas de modo indevido, como o uso repetido de fungicidas com mesmo modo de ação, aplicação em excesso sem necessidade e/ou aplicação de doses menores do recomendado tem proporcionado alguns problemas de perda de sensibilidade dos patógenos. No entanto, os fungicidas podem perder sua toxicidade a alguns gêneros de fungos com o passar do tempo (REIS et al., 2010).

A fungitoxicidade de fungicidas é uma propriedade inerente a uma substância química e se caracteriza pela toxicidade aos fungos em baixas concentrações (REIS et al., 2010).

Parâmetros como  $CE_{50}$  (concentração efetiva ou eficaz, que promove a inibição de 50% do desenvolvimento dos microorganismos),  $DE_{50}$  (dose efetiva),  $DL_{50}$  (dose letal),  $CL_{50}$  (concentração letal),  $CE_{50}$  (concentração efetiva),  $CI_{50}$  (concentração inibitória) ou CMI (concentração mínima inibitória) definem a fungitoxicidade de uma substância química (EDGINGTON et al., 1971; BLUM, 2009). De acordo com os critérios propostos por Edgington et al. (1971), compostos químicos que apresentam  $CI_{50}$  menor que 1 ppm são considerados altamente fungitóxicos, com  $CI_{50}$  entre 1 e 50 ppm moderadamente fungitóxicos e com  $CI_{50}$  maior que 1 ppm não tóxicos.

Estudos visando o controle de *S. macrospora*, como a avaliação da resistência genética e eficiência de fungicidas devem ser explorados, principalmente em condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da doença e em regiões onde há predominância de monocultivo de milho.

Este trabalho teve como objetivos: a) avaliar a resistência de híbridos de milho a mancha-de-macrospora; b) determinar a fungitoxicidade de alguns fungicidas na inibição do crescimento do micélio e germinação de conídios de *S. macrospora in vitro* c) avaliar o controle protetor e curativo da doença em plantas jovens de milho; d) quantificar o efeito de fungicidas na expansão da mancha-de-macrospora.

## 2 RESISTÊNCIA DE HÍBRIDOS DE MILHO À MANCHA-DE-MACROSPORA

### 2.1 RESUMO

A mancha-de-macrospora, causada pelo fungo *Stenocarpella macrospora*, tem se mostrado frequente e importante na cultura do milho no Brasil. A resistência genética é uma das principais estratégias de controle das doenças foliares do milho. No Brasil, são escassas e subjetivas as informações sobre resistência de híbridos à *S. macrospora*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de 52 híbridos de milho à mancha-de-macrospora. O experimento foi realizado em casa-de-vegetação, na Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, em 2011, sob condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com cinco plantas. A inoculação foi feita no estágio fenológico V2 (duas folhas totalmente expandidas), depositando em cada planta 0,2 mL da suspensão de  $7 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup>. Nas testemunhas depositou-se 0,2 mL de água esterilizada. Foram utilizados dois isolados do fungo, obtidos de lavoura de milho dos municípios de Lages, SC, e Campinas do Sul, RS. A severidade da doença foi avaliada aos 14 dias após a inoculação, quando as plantas estavam no estágio V4 (4 folhas totalmente expandidas). Não houve efeito significativo dos isolados do fungo sobre a severidade da doença. Houve diferença significativa na severidade foliar entre os híbridos. Não foi encontrado nenhum híbrido resistente. A severidade da doença variou de 8,88 % para o 30A30HX a 17,76 % para o AO 1050. Isto indica que existe variabilidade genética para semear híbridos menos suscetíveis à mancha-de-macrospora em regiões onde a doença ocorre com frequência.

**Palavras-chaves:** Diplodia. Resistência genética. *Stenocarpella macrospora*. *Zea mays*.

## 2.2 ABSTRACT

The macrospora spot, caused by fungus *Stenocarpella macrospora*, has been frequent and important to maize production in Brazil. Genetic resistance is one of the main strategies to control maize foliar diseases. However, there is little information on hybrid resistance to this pathogen in Brazil. The objective of this study was to evaluate the resistance of 52 maize hybrids to macrospora spot. A greenhouse experiment was carried out at Santa Catarina State University, in the city of Lages, Southern Brazil, during 2011, under controlled conditions of temperature and relative humidity. The experimental design was completely randomized with four replications. Each replication consisted of a pot with five plants. The inoculation was made at the V2 growth stage (two completely expanded leaves) of each plant by depositing 0.2 mL of the suspension of  $7 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup>. It was also deposited 0.2 mL of sterile water in the control. Two isolates of fungus were used. They were obtained from maize crop in the county of Lages, SC, and Campinas do Sul, RS. Disease severity was evaluated 14 days after inoculation, when plants were at the V4 growth stage (four completely expanded leaves). There was no significant effects of the isolates on macrospora severity. There were significant differences in leaf severity among hybrids. Resistant hybrids were not found. The disease severity ranged from 8.88% for 30A30 HX to 17.76% for AO 1050. This indicates that there is genetic variability to sow hybrids less susceptible to macrospora spot in regions where this disease is a major problem

**Key-words:** Diplodia. Genetic resistance. *Stenocarpella macrospora*. *Zea mays*.

### 2.3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é uma das principais culturas agrícolas comercializadas no Brasil. A importância da cultura é caracterizada pela sua utilização na alimentação humana e animal. A produção vêm aumentando nas últimas décadas, porém a produtividade brasileira é considerada baixa se comparada ao potencial produtivo da cultura (CONAB, 2011).

As doenças foliares afetam a produtividade do milho (FERNANDES e OLIVEIRA, 1997). A mancha-de-macrospora, causada pelo fungo necrotrófico *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *Diplodia macrospora* Earle], tem se mostrado frequente e importante na cultura do milho nos últimos anos no Brasil (CASA et al., 2010). Além de mancha foliar, o fungo pode provocar podridão do colmo, podridão da espiga e grãos ardidos (REIS et al., 2004). Em híbridos de milho suscetíveis, este patógeno causa lesões foliares diminuindo a área fotossintetizante da planta (LATTERELL e ROSSI, 1983), podendo servir como fonte de inóculo para infecções de espiga, o que afeta a produtividade e a sanidade do grão (KOEHLER, 1942; BAMPI et al., 2011).

A sobrevivência saprofítica de *S. macrospora* nos restos culturais infectados de milho têm tornado a doença frequente devido às extensas áreas semeadas no sistema semeadura direta e monocultura, pois a palha infectada permanente na superfície do solo, garante a sobrevivência e viabilidade do fungo (CASA et al., 2006).

A disseminação do fungo ocorre via semente infectada, sendo este mecanismo responsável pela introdução do patógeno em novas áreas de cultivo (SHURTLEFF, 1992), ou por respingo de chuva e/ou pelo vento a curtas distâncias pela remoção e dispersão dos conídios presentes nos restos culturais (CASA et al., 2004).

Temperaturas entre 25 e 32 °C (EDDINS, 1930), com umidade relativa do ar acima de 50% (LATTERELL e ROSSI, 1983) são condições ideais para germinação dos conídios do fungo. Os conídios de *S. macrospora* germinam no tecido da folha entre 12 e 15 h após sua deposição, sob temperatura de 28 °C (BRUNELLI et al., 2005).

O fato de *S. macrospora* infectar exclusivamente plantas de milho, não formar estrutura de sobrevivência e apresentar conídios dispersados a curtas distâncias, são características biológicas do patógeno que propiciam manejá-lo com a rotação de culturas e o uso de sementes saudáveis e/ou tratadas com fungicidas eficientes (CASA et al., 2006). O uso do controle químico, apesar de ser eficiente para o controle de algumas doenças foliares, aumenta o custo de produção e apresenta riscos de contaminação ao ambiente (WORDELL, 2010).



A resistência genética de plantas é um dos métodos mais eficientes e econômicos no controle de doenças (PATERNIANI et al., 2000). Contudo, quando aliada a outras práticas como o controle cultural ou químico, fornece maior sustentabilidade a cultura.

A utilização de cultivares geneticamente resistente é uma ótima estratégia de manejo de doenças, uma vez que o seu uso, não causa nenhum tipo de impacto negativo ao meio ambiente, é perfeitamente compatível com outras alternativas de controle e é, muitas vezes, suficiente para o controle da doença (COSTA et al., 2009).

No Brasil as informações sobre resistência de híbridos a mancha-de-macrospora são escassas. O conhecimento do nível de resistência dos genótipos é uma ferramenta importante para indicação do cultivo em regiões com epidemias frequentes da doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de híbridos de milho ao fungo *S. macropora* e identificar se existem diferenças entre híbridos transgênicos e convencionais quanto a severidade da doença.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa do ar aproximada de 70%.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com cinco plantas, totalizando 20 plantas por tratamento. Foram avaliados 52 híbridos (Tabela 1), obtidos de cooperativas do estado catarinense. Em cada híbrido foram inoculados dois isolados do fungo. O primeiro foi obtido de colmos infectados do híbrido AS 1565 da região de Lages, SC (altitude: 904m, latitude:  $27^{\circ}48'58''$  S , longitude:  $50^{\circ}19'34''$  W, tipo de solo: cambissolo húmico alumínico léptico franco argiloso-siltoso e clima subtropical). O segundo foi obtido de colmos do híbrido P32R48 HX, coletado no município de Campinas do Sul, RS (altitude: 583m, latitude:  $27^{\circ}42'57''$ , longitude:  $52^{\circ}37'39''$  tipo de solo: latossolo vermelho aluminicoférricos típicos e clima subtropical temperado úmido). O mesmo número de repetições foi utilizado para a testemunha.

Tabela 1 - Híbridos de milho submetidos à avaliação de resistência à mancha-de-macrospora. Lages, SC, 2011.

Híbrido	Tipo <sup>1</sup>	Ciclo <sup>2</sup>	Híbrido	Tipo <sup>1</sup>	Ciclo <sup>2</sup>
1. AS1565	HS	P	28. PREMIUM FLEX TL	HS	P
2. AS 1578 YG	HS	P	29. MAXIMUS TL	HS	P
3. AS 1555 YG	HS	P	30. MAXIMUS	HS	P
4. AS 32	HD	P	31. STATUS TL	HS	P
5. AS 1575	HS	P	32. TRAKTOR	HD	P
6. AG 5011	HT	P	33. PENTA TL	HS	P
7. AG 8022 YG	HS	P	34. PREMIUM FLEX	HS	P
8. AG 8025	HS	P	35. TORK	HS	P
9. AG 8041 YG	HS	P	36. SPRINT	HS	HP
10. AO 1052	SI	SI	37. SPRINT TL	HS	HP
11. 20A55 Hx	HT	P	38. CELERON TL	HS	SP
12. 30A30 Hx	HS	HP	39. ATTACK TL	HSM	P
13. AGN 2012	HD	P	40. P 30P34	HT	P
14. BG7051 H	HT	SP	41. P 30F36 H	HS	P
15. BG 7060 Y	HT	P	42. P 30B30	HT	P
16. CD 304	HT	SP	43. P 30K75 Y	HSM	P
17. CD 397YG	HT	P	44. P 30F53	HS	P
18. CD 308	HD	P	45. P 1630	HS	SP
19. 2B688 Hx	HT	P	46. P 30B39 HX	HS	P
20. 2A106	HS	HP	47. P 30F53 H	HS	P
21. DKB 330	HS	SP	48. P 32R48	HS	SP
22. DKB 240 YG	HS	P	49. P 32R48 H	HS	SP
23. DKB 979	HD	P	50. P 32R22 H	HS	SP
24. DKB 245	HS	P	51. P 1630 Y	HS	SP
25. DKB 350 YG	HT	P	52. P 30R50 H	HS	P
26. DKB 615	HD	SP			
27. SHS 4060	SI	P			

<sup>(1)</sup>HS = Híbrido simples; HD = Híbrido duplo; HT = Híbrido triplo.

<sup>(2)</sup>P = precoce; SP = superprecoce; HP = hiperprecoce, SI = Sem informação. Fonte: (CRUZ et al., 2010).

As sementes de cada híbrido de milho foram semeadas em vasos plásticos com capacidade 1,5 litros, contendo uma mistura homogênea de substrato (40%), solo esterilizado (30%) e vermiculita (20%). Foram semeadas oito sementes por vaso. As sementes foram cobertas com aproximadamente 2,5 cm de substrato. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação e irrigados de acordo com as necessidades hídricas da cultura. No estágio fenológico V2 (duas folhas totalmente expandidas) foi realizado o desbaste, deixando-se cinco plantas por vaso.

Para o preparo da suspensão de inóculo, os colmos infectados foram desinfestados com hipoclorito 50% e submetidos à câmara úmida sob temperatura de 30°C por um período de 48 horas até a extrusão do cirro de conídios. Após, foi realizado raspagem dos colmos com pincel para remoção dos cirros com água destilada e esterilizada com duas gotas por litro do surfactante Tween 20. A suspensão foi filtrada com duas camadas de gaze para eliminar os fragmentos de material vegetal. Foi realizado o ajuste da concentração da suspensão em câmara de Neubauer. A suspensão de  $7 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup> foi aplicada diretamente nas plantas no estágio fenológico V2, com pipetador automático, pela deposição de 0,2 mL por planta.

Nas testemunhas foi depositado 0,2 mL de água esterilizada. Durante 48 horas após a inoculação as plantas foram mantidas sob umidade relativa do ar em torno de 100% por meio de pulverização de água a cada 6 horas. Após 14 dias da inoculação, quando o milho estava no estágio fenológico V4 (quatro folhas totalmente expandidas) a quarta folha expandida de cada planta foi coletada e levada ao Laboratório de Fitopatologia da UDESC para avaliação da severidade da doença, pela porcentagem visual de área foliar afetada (necrose e clorose).

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância através do teste F. As comparações entre médias dos tratamentos foram procedidas por meio do teste de Scott-Knott, utilizando o software R (R Development Core Team, 2008), considerando o nível mínimo de significância de 5%.

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os dois isolados do fungo, demonstrando que ambos apresentam níveis de agressividade semelhantes para todos os híbridos avaliados. O equilíbrio entre a resistência do genótipo e a agressividade do isolado pode ser importante na discriminação de genótipos resistentes ou suscetíveis em programas de melhoramento genético (MAXWELL e THOMPSON, 1974). Os isolados geralmente são mais agressivos em seus locais de origem. Contudo, diferenças de agressividade podem ser observadas em alguns anos, devido às condições ambientais e a concentração de inóculo no ambiente (KAPPELMAN et al., 1965). Nesse trabalho, o efeito não significativo pode ser explicado pela condução do experimento em condições ambientais controladas e utilização da mesma concentração da suspensão de conídios. Também não se evidenciou efeito significativo da interação híbrido *versus* isolado.

Diferenças significativas foram constatadas somente entre híbridos, sendo que a severidade da mancha-de-macrospora variou de 8,88% a 17,76%, respectivamente, para 30A30 HX e AO 1052, na média dos dois isolados (Tabela 2).

Tabela 2 - Severidade da mancha-de-macrospora em 52 híbridos de milho, considerando a média de dois isolados do fungo em estágio V4 (4 folhas totalmente expandidas). Lages, SC, 2011.

Híbrido	Severidade	Híbrido	Severidade
AO 1052	17,76 a	SPRINT TL	13,26 b
AS 1565	17,18 a	P 30F53 H	13,23 b
AS 1578 YG	16,71 a	MAXIMUS	13,00 b
PENTA TL	16,56 a	STATUS TL	12,36 c
DKB 240 YG	16,51 a	P 30B30	12,30 c
DKB 350 YG	16,33 a	DKB 615	11,70 c
AG 5011	16,15 a	CELERON TL	11,63 c
AS 1575	16,13 a	CD 304	11,60 c
P 30B39 HX	15,70 a	TRAKTOR	11,51 c
AG 8022 YG	15,67 a	P 30F53	11,28 c
20A55 Hx	15,65 a	CD 308	11,10 c
AG 8025	15,45 a	P 32R22 H	11,06 c
AG 8041 YG	15,29 a	P 30K75 Y	11,00 c
BG 7060 Y	15,26 a	P 30P34	10,83 c
MAXIMUS TL	15,20 a	2B688 Hx	10,83 c
ATTACK TL	14,83 b	BG7051 H	10,61 c
DKB 245	14,76 b	P 32R48	10,18 d
PREMIUM FLEX	14,50 b	CD 397 YG	9,73 d
2A106	14,23 b	DKB 330	9,63 d
SPRINT	14,23 b	P 1630	9,56 d
TORK	14,12 b	SHS 4060	9,30 d
P 30F36 H	13,86 b	AS 1555 YG	9,25 d
P 1630 Y	13,83 b	P 32R48 H	8,94 d
AS 32	13,80 b	PREMIUM FLEX TL	8,91 d
DKB 979	13,80 b	30A30 Hx	8,88 d
AGN 2012	13,56 b		
P 30R50 H	13,28 b		
<b>C.V (%)</b>		<b>17,25</b>	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste Scott Knott a 5%.

A análise das médias deu origem a quatro grupos distintos quanto à severidade foliar, sendo que os genótipos AO 1052, AS 1565, AS 1578 YG, PENTA TL, DKB 240 YG, DKB 350 YG, AG 5011, AS1575, P30B39 HX, AG 8022 YG, 20A55 Hx, AG 8025, AG 8041 YG, BG7060 Y e MAXIMUS TL apresentaram maiores médias de severidade da doença (17,76% a 15,20% de área foliar afetada), demonstrando maior suscetibilidade à mancha-de-macrospora. Enquanto os genótipos P 32R48, CD 397 YG, DKB 330, P 1630, SHS 4060, AS 1555 YG, P 32R48 H, PENTA FLEX TL e 30A30HX apresentaram menores médias de área foliar afetada (10,18% a 8,88%), revelando menor suscetibilidade à doença. No intervalo entre esses dois grupos localizam-se os grupos de híbridos com resistência intermediária, contudo diferentes entre si segundo o teste de comparação de médias.

No Brasil vem ocorrendo um aumento do cultivo de híbridos geneticamente modificados, mas poucas são as informações de estudos de campo para avaliar a eficácia dessa tecnologia, comparando híbridos convencionais e transgênicos. Estima-se que aproximadamente 35% dos híbridos comerciais são transgênicos (CRUZ et al., 2010). Entre os 52 híbridos avaliados, 27 híbridos são transgênicos e 25 são híbridos convencionais (Tabela 3). Neste caso não foi observado diferença significativa, sendo que a média de severidade dos híbridos transgênicos foi 13,12% e convencionais 13,11 %.

Tabela 3 – Resistência a mancha-de-macrospora considerando híbridos transgênicos e convencional. Lages, SC, 2011.

Híbrido transgênico	Severidade	Híbrido convencional	Severidade
AS 1578 YG	16,71	AO 1052	17,73
PENTA TL	16,56	AS 1565	17,18
DKB 240 YG	16,51	AG 5011	16,15
DKB 350 YG	16,33	AS 1575	16,13
P 30B39 HX	15,70	AG 8025	15,45
AG 8022 YG	15,67	DKB 245	14,76
20A55 Hx	15,65	PREMIUM FLEX	14,50
AG 8041 YG	15,29	2A106	14,23
BG 7060 Y	15,26	SPRINT	14,12
MAXIMUS TL	15,20	TORK	13,80
ATTACK TL	14,83	AS 32	13,80
P 30F36 H	13,86	DKB 979	13,56
P 1630 Y	13,83	AGN 2012	13,00
P 30R50 H	13,28	MAXIMUS	12,30
SPRINT TL	13,26	P 30B30	11,70
P 30F53 H	13,23	DKB 615	11,60
STATUS TL	12,36	CD 304	11,51
CELERON TL	11,63	TRAKTOR	11,28
P 32R22 H	11,06	P 30F53	11,10
P 30K75 Y	11,00	CD 308	10,83
2B688 Hx	11,83	P 30P34	10,18
BG7051 H	10,61	P 32R48	9,63
CD 397 YG	9,73	DKB 330	9,56
AS 1555 YG	9,25	P 1630	9,30
P 32R48 H	8,94	SHS 4060	9,30
PREMIUM FLEX TL	8,91		
30A30 Hx	8,80		
<b>Média</b>	<b>13,12 ns</b>		<b>13,11</b>
<b>CV (%)</b>		<b>19,54</b>	

Em relação ao ciclo, 71,1% dos híbridos avaliados são considerados de ciclo precoce, 19,2% superprecoce e 7,7% hiperprecoce. Destes, 61,5% são híbridos simples, 19,2% híbridos triplos, 11,5% híbridos duplos e 3,8% híbridos simples modificados. Os 15 híbridos mais suscetíveis a mancha-de-macrospora são todos de ciclo precoce, sendo destes, dez híbridos simples e quatro híbridos triplos. Entre os nove híbridos com maior resistência quatro

são de ciclo superprecoce, um hiperprecoce e quatro precoces, destes, sete são considerados híbrido simples e um híbrido triplo (Tabela 1).

Nos últimos anos tem havido um aumento na utilização de híbridos de desenvolvimento fenológico mais rápido, classificados como precoces, superprecoces e hiperprecoces (SANGOI et al., 2010). Esta classificação é feita considerando o número de unidades de calor (UC) que cada cultivar requer para florescer (SANGOI, 1993). Quanto mais precoce um híbrido, mais rapidamente o meristema apical é transformado num primórdio floral e maior é a velocidade de desenvolvimento das inflorescências masculina e feminina (SANGOI et al., 2007).

Os híbridos hiper e super-precoces, são normalmente mais exigentes em condições edáficas e climáticas favoráveis para expressarem o seu potencial produtivo (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000). Em regiões quentes e úmidas, eles podem apresentar maiores problemas com doenças foliares, pois possuem maior quantidade de gens de linhagens de clima temperado (BLUM et al., 2003). Esta tendência não foi observada neste trabalho, pois os híbridos com maiores índices de severidade de mancha-de-macrospora foram os de ciclo precoce. Possivelmente o fato de o trabalho ter sido conduzido em casa-de-vegetação, sob condições controladas de temperatura e umidade, e de a avaliação da severidade da doença ter sido feita numa fase inicial do ciclo da cultura justificam esta divergência.

Todos os genótipos avaliados apresentaram resistência parcial à mancha-de-macrospora no estágio V4, com variação no grau de severidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Sutoyo (2010) em avaliação de 37 cultivares de milho no estágio de plântula em casa-de-vegetação com inoculação de  $2 \times 10^5$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , onde constatou diferença significativa entre cultivares, sendo que a severidade da mancha-de-macrospora variou de 4,79% a 30% aos 35 dias após a avaliação. Nesse mesmo trabalho, também foram observadas diferenças no aparecimento dos primeiros sintomas, onde o período de incubação se manifestou entre 48 a 72 horas após a inoculação.

Em avaliações de oito linhagens a campo, Olatinwo et al. (1999a), constataram resistência à mancha-de-macrospora somente na linhagem 9233-9. Pascual et al. (2002), avaliando 60 híbridos de milho no estágio de grão farináceo com inoculação 40 dias após a semeadura, observaram híbridos resistentes a altamente suscetíveis à mancha-de-macrospora, com severidade variando de 1% a 100%. No entanto o autor considera resistência parcial de 1 a 10% como plantas resistentes. Quanto à reação a podridão da espiga (Diplodia), os mesmos autores, verificaram suscetibilidade em 100% dos genótipos, onde a severidade variou de 11 a 100%. Por outro lado, resultados obtidos por Olatinwo et al. (1999b) em cruzamentos de

linhagens durante seis gerações para estudo da herança da resistência à *S. macrospora* encontraram genótipos altamente resistentes, contudo linhas puras totalmente resistentes ou totalmente suscetíveis não foram obtidas.

A resistência quantitativa a doenças em plantas é expressa, principalmente, por infecção reduzida, maior período de latência e esporulação reduzida. No entanto, o desenvolvimento desta forma de resistência requer informações genéticas adicionais, até então inexistentes ou pouco conhecidas para o patossistema *S. macrospora* (RINGER e GRYBAUSKAS, 1995).

O desenvolvimento da resistência de forma duradoura é importante para um manejo complexo de patógenos, pois essa forma de resistência é baseada na interação de muitos genes. Assim, os patógenos têm maior dificuldade para superar essa resistência, uma vez que requer várias alterações na estrutura molecular da planta (OLATINWO et al., 1999b).

Estudos da variabilidade genética de híbridos à reação da mancha-de-macrospora são importantes para identificar genótipos mais promissores que podem ser usados em futuros estudos em programas de melhoramento de milho, buscando minimizar os danos causados por *S. macrospora*. No entanto, a identificação de genótipos com menor suscetibilidade pode ser uma opção imediata para uso naquelas regiões com ocorrência generalizada da mancha-de-macrospora.

## 2.6 CONCLUSÕES

Entre os materiais avaliados não houve híbridos resistentes à mancha-de-macrospora. Porém, existem diferentes níveis de suscetibilidade entre os híbridos.

Os híbridos transgênicos e convencionais apresentam comportamento semelhante quanto a severidade de mancha-de-macrospora quando avaliados sob condições controladas em estágio V4.

### 3 EFICÁCIA DE FUNGICIDAS NO CONTROLE DE *Stenocarpella macrospora*

#### 3.1 RESUMO

A mancha-de-macrospora, causada pelo fungo *Stenocarpella macrospora*, tem se tornado uma das doenças mais importantes na cultura do milho nos últimos anos no Brasil. O objetivo do trabalho foi determinar a sensibilidade de *S. macrospora* a fungicidas pela inibição do crescimento do micélio e germinação de conídios e o efeito de fungicidas no controle protetor, curativo e na expansão de lesões da mancha-de-macrospora. Quanto à sensibilidade de *S. macrospora in vitro* foram avaliados 12 fungicidas, seis concentrações e dois isolados do fungo. Os fungicidas foram diluídos em água destilada e esterilizada e adicionados ao meio de cultura após a esterilização. A porcentagem de inibição do crescimento micelial e germinação de conídios foi calculada em relação à testemunha, estimando-se valores de concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>). A eficiência de fungicidas no controle protetor e curativo foi determinada em casa-de-vegetação, com o isolado SC e o híbrido AS 1565. Foram avaliados 16 fungicidas, aplicados no estágio V2. No controle preventivo a inoculação de 0,2 mL da suspensão de  $7 \times 10^4$  conídios mL<sup>-1</sup> foi realizada 48 horas depois da aplicação. No controle curativo a inoculação foi realizada 48 horas antes da aplicação. A severidade da doença foi determinada 21 dias após a inoculação. No controle da expansão da lesão de mancha-de-macrospora foram avaliados sete fungicidas aplicados diretamente em folhas de milho híbrido AS 1565 com lesões foliares. As lesões foram mensuradas a cada três dias por um período de 27 dias. Em cada lesão também foram quantificados o número de picnídios cm<sup>2</sup><sup>-1</sup>. Constatou-se que os fungicidas testados foram eficazes na inibição do crescimento do micélio, sendo que a CI<sub>50</sub> foi menor que 1ppm para todos os fungicidas, não havendo diferença entre isolados. Na inibição da germinação de conídios, as estrobilurinas apresentaram maior fungitoxicidade, pois a CI<sub>50</sub> ficou entre 0,0035 e 0,03 ppm, sendo que o isolado SC mostrou maior sensibilidade aos fungicidas. Na aplicação preventiva todos os fungicidas diferiram da testemunha, reduzindo em média 85% a severidade da mancha-de-macrospora em relação à testemunha. No controle curativo, todos os fungicidas diferiram da testemunha, contudo as misturas de triazóis + estrobilurinas mostraram maior eficácia, reduzindo em média 75% a severidade da doença, enquanto que os produtos isolados como as estrobilurinas reduziram 62%, benzimidazóis 55% e triazóis 38%. O fungicida tebuconazole e as misturas de triazóis + estrobilurinas, reduziram em média 68% a expansão de lesões da mancha-de-macrospora, e 58,7% a formação de picnídio cm<sup>2</sup><sup>-1</sup>. Apesar de não haver fungicida específico indicado para mancha-de-macrospora em milho no Brasil, foi possível concluir que existem produtos eficazes para o controle de *S. macrospora*.

**Palavras-chave:** Controle químico. Mancha-de-macrospora. Fungitoxicidade. *Zea mays*.



### 3.2 ABSTRACT

The macrospora spot, caused by fungus *Stenocarpella macrospora*, has become one of the most important diseases in maize in Brazil in recent years. The objective of this study was to determine the sensitivity of *S. macrospora* to fungicides by inhibition of mycelial growth and conidial germination and the effect of fungicides to control protective, curative and the expansion of lesions the spot macrospora. The sensitivity of *S. macrospora in vitro* was evaluated 12 fungicides, six concentrations and two isolates of the fungus. The fungicides were dissolved in sterile distilled water and added to the culture medium after sterilization. The percentage of inhibition of mycelial grow and conidial germination was calculated in comparison with control, estimating of 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). The efficiency of fungicides to control protective and curative was determined in a greenhouse, with the isolated SC and the hybrid AS 1565. We evaluated 16 fungicides, applied at the V2 growth stage (two completely expanded leaves). The preventive control of the inoculation was made depositing 0.2 mL of the suspension of  $7 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup> 48 hours after fungicide application. In the curative control the inoculation was made 48 hours before fungicide application. Disease severity was determined 21 days after inoculation. In control the expansion of lesion the macrospora spot seven fungicides was applied directly to 10 maize leaf with lesions with hybrid AS 1565. The lesions were measured every three days for a period of 27 days. In each lesion were the number of pycnidia cm<sup>2-1</sup> was do quantify. The fungicides tested were effective in inhibiting the growth of the mycelium. The IC<sub>50</sub> was less than 1 ppm for all fungicides. There was no difference between isolates. The inhibition of germination of the conidia had higher fungitoxicity strobilurins, and the IC<sub>50</sub> was between 0.0035 and 0.03 ppm, and the isolated SC showed a higher sensitivity to the fungicides. In preventive application all fungicides differed from the control, reducing in average 85% the severity macrospora spot compared to control. In the curative action, all fungicides differed from the control, but mixtures of triazole + strobilurin showed greater efficiency, reducing an average of 75% disease severity, whereas the isolated products as the strobilurins reduced 62%, benzimidazoles 55% and triazoles 38%. The fungicide tebuconazole, and mixtures of triazoles + strobilurins, reduced on average 68% expansion of lesions the macrospora spot and 58.7% the formation of pycnidia cm<sup>2-1</sup>. Although there is no specific fungicide recommended for macrospora spot on maize in Brasil, this work showed that there were effective products to control *S. macrospora*.

**Key-words:** Chemical control. Macrospora spot. Fungitoxicity. *Zea mays*.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A mancha-de-macrospora, causada pelo fungo necrotrófico *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *Diplodia macrospora* Earle], tem se tornado uma das doenças mais importantes, na cultura do milho nos últimos anos no Brasil (CASA et al., 2010; WORDELL FILHO e CASA, 2010). Sob as lesões foliares pode haver produção de inóculo que pode infectar a base da espiga, reduzindo a produtividade e a sanidade de grão (KOEHLER, 1942; BAMPI et al., 2011). Além de mancha foliar, o patógeno pode provocar podridão do colmo, podridão da espiga e grãos ardidos (REIS et al., 2004).

Além da utilização de medidas culturais, tratamento de sementes e utilização de genótipos resistentes, grande ênfase tem sido dada ao controle de doenças foliares através da aplicação de fungicidas, com objetivo de alcançar maiores índices na produtividade (PINTO et al., 2004; AMORIM et al., 2011; WORDELL FILHO e CASA, 2010).

A fungitoxicidade de fungicidas é uma propriedade inerente a uma substância química e se caracteriza pela toxicidade aos fungos em baixas concentrações (REIS et al., 2010). Parâmetros como  $CE_{50}$  (concentração efetiva ou eficaz, que promove a inibição de 50% do desenvolvimento dos microorganismos),  $DE_{50}$  (dose efetiva),  $DL_{50}$  (dose letal),  $CL_{50}$  (concentração letal),  $CE_{50}$  (concentração efetiva),  $CI_{50}$  (concentração inibitória) ou CMI (concentração mínima inibitória) definem a fungitoxicidade de uma substância química (EDGINGTON et al., 1971; BLUM, 2009).

Uma substância é considerada fungicida quando atua em concentrações baixas. Assim um valor baixo da  $CI_{50}$  indica alta ação fungicida. A  $CI_{50}$  é específica para uma determinada substância química e um determinado patógeno, e pode ter seu valor alterado com o tempo de uso (REIS et al., 2010). Se um fungo for sensível a um fungicida este apresenta fungitoxicidade, caso contrario, é atóxico (BLUM, 2009; REIS et al., 2010).

Entre os fungicidas disponíveis no mercado brasileiro para o controle de doenças do milho, os sistêmicos, pertencentes aos grupos químicos dos triazóis (inibidores da síntese de esteróis) e das estrobilurinas (inibidores da respiração mitocondrial), são os mais utilizados isoladamente ou em misturas pré-fabricadas. Os benzimidazóis (inibidores da divisão celular) também são utilizados na cultura do milho, porém, com menor intensidade. Contudo a utilização de misturas com fungicidas de modo de ação diferentes aumenta o espectro de controle de fungos e o período residual das aplicações e contribui para evitar os problemas com insensibilidade de patógenos a fungicidas (REIS et al., 2010).

Os fungicidas podem ter três modos de ação na planta. Ação protetora, curativa e erradicativa. A ação preventiva de fungicidas é realizada no estágio de pré-infecção. Nesse caso o fungicida inibe a germinação ou impede a penetração do fungo nos tecidos do hospedeiro. A ação curativa tem ação pós-infecção e pré-sintoma. A ação erradicativa envolve o efeito dos fungicidas no estágio pós-sintoma (REIS et al., 2010).

O controle químico de doenças na cultura do milho é uma prática que vem sendo utilizada na agricultura e tem proporcionado efeitos positivos em relação a áreas não pulverizadas (PINTO, 2004). Costa e Cota (2009) sugerem que as aplicações de fungicidas, apresentam maior eficiência quando aplicados nos sintomas iniciais das doenças no campo. No entanto, não definem o que significa início de doença.

Por outro lado, a utilização de fungicidas de modo indevido tem proporcionado a insensibilidade de algumas espécies de fungos. Valores de  $CI_{50}$  para diferentes fungicidas específicos para *S. macrospora* não foram encontrados na literatura. Contudo, eles podem ser úteis no monitoramento da fungitoxicidade, principalmente em regiões onde a aplicação de fungicidas na cultura é intensa. De acordo com o Ministério da Agricultura são inexistentes informações de fungicidas indicados para o controle da mancha-de-macrospora (MAPA, 2011). Para tanto, trabalhos com controle químico visando o controle dessa doença devem ser explorados em diferentes híbridos e em diferentes condições de ambiente.

Com base no exposto, o objetivo desse trabalho foi determinar a sensibilidade de *S. macrospora* a fungicidas na inibição do crescimento do micélio e germinação de conídios *in vitro* e quantificar a eficiência de fungicidas no controle protetor e curativo em plantas jovens de híbrido suscetível e na expansão de lesões da mancha-de-macrospora.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1. Sensibilidade micelial de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas *in vitro*

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, (CAV/UDESC) no ano de 2010.

Para a avaliação da sensibilidade de *S. macrospora* a fungicidas *in vitro* foram utilizados dois isolados do fungo. Os isolados foram obtidos de folhas naturalmente infectadas do híbrido AS 1565, proveniente do município de Lages, SC, (altitude 904m, latitude: 27°48'58" S , longitude: 50°19'34" W, tipo de solo: cambissolo húmico alumínico léptico

franco argiloso-siltoso e clima subtropical) e do híbrido P32R48Hx, do município de Lucas do Rio Verde, MT (altitude: 390m, latitude: 13°03'01" S, longitude: 55°54'40" W, tipo de solo: Latossolo vermelho-amarelo distrófico, Clima de Savana).

As folhas com mancha-de-macrospora coletadas nestes dois municípios foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante três minutos e depois lavadas com água destilada e estéril. As folhas foram submetidas em câmara úmida para induzir a esporulação do fungo. Cirros de conídios do fungo, oriundos de picnídios do tecido necrosado, foram removidos com agulha histológica e colocados em erlenmeyer contendo água destilada e estéril com 2 gotas L<sup>-1</sup> do surfactante Twen 20. Uma suspensão de 0,5 mL foi pipetada em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água (AA). As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 26 °C e sob luz contínua por 12 horas. Com uma agulha histológica flambada, conídios individuais foram transferidos para uma placa de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram incubadas por sete dias nas mesmas condições descritas anteriormente visando obtenção de colônias puras. Após a incubação, foi escolhida uma das colônias desenvolvidas do fungo, com a qual trabalhou-se no transcurso do experimento. Os isolados foram repicados em tubo de ensaio com meio BDA e armazenados em geladeira.

Os fungicidas utilizados foram: azoxistrobina (Priori 250 SC), trifloxistrobina (Flint 500 WG), piraclostrobina (Comet 250 CE), tebuconazole (Folicur 200 EC), propiconazole (Tilt 250 CE), epoxiconazole (Opus 125 SC), tetraconazole (Domark 100 CE), metconazole (Caramba 90 CE), ciproconazole (Alto 100 CE), carbendazim (Derosal 500 SC), tiofanato metílico (Tiofanato metílico 800 WG) e tiabendazole (Tecto 484 SC).

Os fungicidas foram diluídos em água destilada e estéril e adicionados ao meio de cultura de BDA (fundente) após a esterilização, com temperatura em torno de 45 °C, obtendo-se distintas concentrações finais. Em seguida, o meio de cultura contendo as diferentes concentrações de fungicidas foi vertido em placas de Petri de 80 mm de diâmetro ( $\pm$  20 mL por placa). Após a solidificação as placas foram mantidas em refrigeração (4 °C), por 24h, até a condução dos trabalhos de incubação.

As concentrações iniciais testadas foram 0; 0,001; 0,1; 1,0; 10 e 100 ppm para todos os fungicidas. Posteriormente, as concentrações finais testadas foram ajustadas para obter concentrações mais próximas da CI<sub>50</sub>. Cada ingrediente ativo foi ajustado de acordo: azoxistrobina (0; 0,025; 0,05; 0,1; 1 e 10 ppm), piraclostrobina (0; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 1 ppm), trifloxistrobina (0; 0,005; 0,1, 10, 100 e 200 ppm), epoxiconazole, ciproconazole e tiabendazole (0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 1 ppm), tetraconazole e metconazole (0; 0,01; 0,05;

0,1; 1 e 10 ppm), propiconazole (0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,1 e 1 ppm), tebuconazole (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 10 ppm), tiofanato metílico (0; 0,05; 0,1; 0,125; 0,25; 0,5 ppm) e carbendazim (0; 0,005; 0,01; 0,025, 0,05 e 0,1 ppm). A concentração 0 ppm representou a testemunha do ensaio.

Após 24 horas, em cada placa de Petri contendo meio de cultura com a respectiva concentração de fungicida, foi colocado ao centro um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro com o micélio do fungo retirado de colônias puras, repicadas após 10 dias de crescimento. As placas foram incubadas em câmara incubadora tipo BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) com temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 12 horas. O crescimento miceliano foi avaliado diariamente com auxílio de um paquímetro digital até que o tratamento testemunha atingisse os bordos da placa, como exemplo demonstrado para os fungicidas metconazole e tiabendazole (Figura 2).

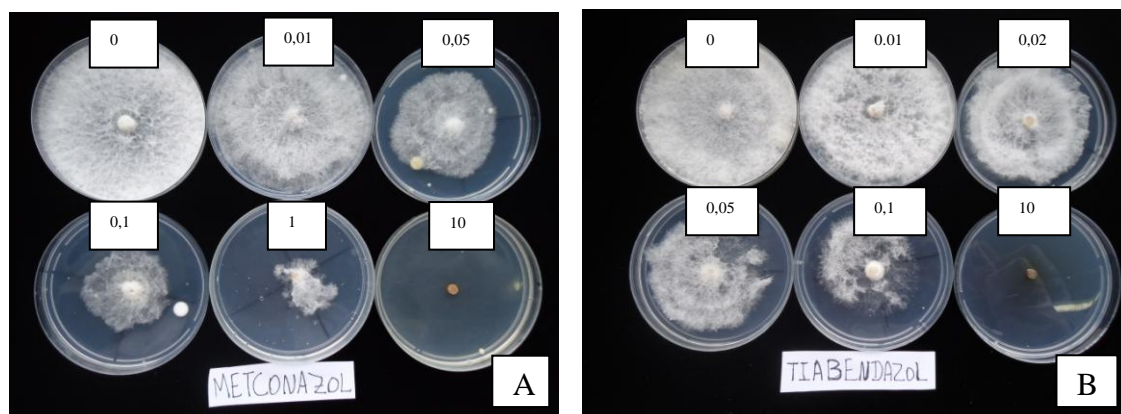


Figura 2 - Crescimento micelial de *Stenocarpella macrospora* em função da concentração dos fungicidas metconazole (A) e tiabendazole (B). Lages, SC, 2011.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída de uma placa de Petri. O procedimento foi realizado para os dois isolados do fungo (Lages, SC, e Lucas do Rio Verde, MT).

Com os dados obtidos calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento miceliano em relação à testemunha e foi realizada análise de regressão utilizando-se o programa estatístico SAS Versão 9.2. A  $CI_{50}$  foi calculada pela equação de regressão.

#### 3.4.2. Sensibilidade de conídios de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas *in vitro*

Este experimento foi conduzido nas mesmas condições descritas no experimento 3.4.1. Para a avaliação da sensibilidade de conídios de *S. macrospora* a fungicidas *in vitro* foram coletados colmos naturalmente infectados na safra 2009/2010 do híbrido AS 1565

provenientes do município de Lages, SC, e P32R48 do município de Lucas do Rio Verde, MT.

Os colmos infectados foram desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante três minutos e depois lavados com água destilada e estéril. Após foram submetidos à câmara úmida sob temperatura de 30 °C por um período de 48 horas até a extrusão do cirro de conídios. Vários cirros foram removidos através de raspagem com um pincel e colocados em copo Becker contendo água destilada e estéril com duas gotas por litro do surfactante Tween 20.

Os fungicidas testados foram os mesmos descritos no item 3.4.1. Os fungicidas foram diluídos em água destilada e estéril e adicionados ao meio de cultura ágar-água (fundente) após a esterilização, com temperatura em torno de 45 °C, obtendo-se distintas concentrações finais. Em seguida o meio de cultura contendo as diferentes concentrações de fungicidas foi vertido em placas de Petri de 60 mm de diâmetro (10 mL por placa). Após a solidificação as placas foram mantidas em refrigeração (4 °C), por 24 h, até a condução dos trabalhos de incubação.

As concentrações iniciais testadas foram 0; 0,001; 0,1; 1,0; 10 e 100 ppm para todos os fungicidas. Posteriormente, as concentrações finais testadas foram ajustadas para obter concentrações mais próximas da  $CI_{50}$ . Cada ingrediente ativo foi ajustado de acordo: azoxistrobina e piraclostrobina (0; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1 ppm), trifloxistrobina (0; 0,001; 0,0025; 0,005; 0,01 e 0,05 ppm), tetraconazole, ciproconazole, epoxiconazole, metconazole, propiconazole, tebuconazole, tiofanato metílico, carbendazim e tiabendazole (0; 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 ppm).

A suspensão de conídios utilizada foi ajustada para  $10^3$  conídios  $mL^{-1}$ , sendo depositado 0,5 mL desta suspensão por placa de Petri contendo o fungicida. A incubação foi conduzida em câmara incubadora com temperatura de 26 °C sob luz contínua por um período de 12 horas. Decorrido o tempo previsto para a incubação, a germinação dos conídios foi interrompida, adicionando-se 0,3 mL de uma solução de acetona (100%) com algumas gotas de corante azul de algodão, em cada placa de Petri, de acordo com metodologia utilizada por Blum (2009). Após as placas foram mantidas em refrigerador (4 °C) para posterior avaliação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada unidade experimental constituída por uma placa de Petri. Em cada placa de Petri foi quantificado a germinação de 100 conídios de *S. macrospora* com auxílio de microscópio ótico. O conídio foi considerado germinado quando apresentou tubo germinativo de comprimento maior ou igual ao menor diâmetro do esporo (Figura 3).

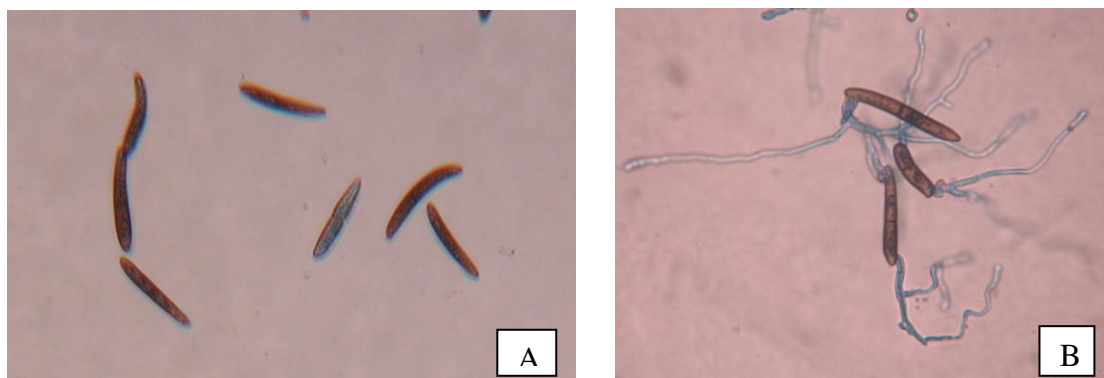


Figura 3 - Conídios de *Stenocarpella macrospora* não germinados (A) e conídios germinados (B). Lages, SC, 2011.

Com os dados obtidos foi calculada a porcentagem de inibição da germinação de conídios em relação a testemunha e foi realizado análise de regressão utilizando-se o programa estatístico SAS Versão 9.2. A  $CI_{50}$  foi calculada pela equação de regressão.

### 3.4.3. Controle preventivo e curativo da mancha-de-macrospora em plantas jovens de milho

#### 3.4.3.1. Controle Preventivo

O experimento foi conduzido em uma única vez, em casa-de-vegetação, no CAV/UEDESC, com temperatura de  $25\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  e umidade relativa do ar aproximada de 70%. Foi utilizado um isolado do fungo obtido de colmos naturalmente infectados do híbrido AS 1565 de Lages, SC. O teste de inoculação foi feito com o milho híbrido AS 1565.

Para o preparo da suspensão de inóculo, os colmos infectados foram desinfestados com hipoclorito 0,5% e submetidos à câmara úmida sob temperatura de  $30\text{ °C}$  por um período de 48 horas até a extrusão do cirro de conídios. Após, foi realizado raspagem dos colmos com pincel para remoção dos cirros com água destilada e esterilizada com duas gotas por litro do surfactante Tween 20.

Os fungicidas testados (g ou mL i.a.ha<sup>-1</sup>) foram: azoxistrobina (62,5) (Priori 250 SC), trifloxistrobina (125) (Flint 500 WG), piraclostrobina (150) (Comet 250 CE), tebuconazole (200) (Folicur 200 EC), propiconazole (100) (Tilt 250 CE), epoxiconazole (93,75) (Opus 125 SC), tetraconazole (50) (Domark 100 CE), metconazole (81,08) (Caramba 90 CE), ciproconazole (30) (Alto 100 CE), carbendazim (250) (Derosal 500 SC), tiofanato metílico (267,9) (Tiofanato metílico 800 WG), tiabendazole (247,8) (Tecto 484 SC), azoxistrobina + ciproconazole (60 + 24) (Priori Xtra 280 SC), piraclostrobina + epoxiconazole (100 + 37,5)

(Opera 283 SE), trifloxistrobina + tebuconazole (75 + 150) (Nativo 300 SC), picoxistrobina + ciproconazole (60 + 24) (Approach Prima 280 SC).

As sementes de milho foram semeadas em vasos plásticos com capacidade 1,5 litros, contendo uma mistura homogênea de substrato (80%) e vermiculita (20%). Foram semeadas oito sementes por vaso. As sementes foram cobertas com aproximadamente 2,5 cm de substrato. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação e irrigados de acordo com as necessidades hídricas da cultura. No estágio fenológico V2 (duas folhas totalmente expandidas) foi realizado o desbaste, deixando-se cinco plantas por vaso.

Os fungicidas foram aplicados de forma preventiva no estágio fenológico V2. Para aplicação os vasos foram removidos da casa-de-vegetação. A aplicação foi feita com CO<sub>2</sub> utilizando-se uma vazão de 200 L ha<sup>-1</sup> de calda. Nas testemunhas foi aplicado água destilada e esterilizada. Após 48 horas uma suspensão de 7x10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup> foi aplicado diretamente no cartucho das plantas, com pipetador automático, pela deposição de 0,2 mL por planta. Durante 48 horas após a inoculação as plantas foram mantidas sob umidade relativa do ar aproximada de 100% por meio de pulverização de água a cada 6 horas. Após 21 dias da inoculação, quando o milho estava no estágio fenológico V5 (cinco folhas totalmente expandidas) a quarta folha expandida de cada planta foi coletada e levada ao Laboratório de Fitopatologia da UDESC para avaliação da severidade da doença, pela porcentagem visual de área foliar afetada (necrose e clorose).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com cinco plantas, totalizando 30 plantas por tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variancia através do teste F. As comparações entre médias dos tratamentos foram procedidas por meio do teste de Scott-Knott, utilizando o software R (R Development Core Team, 2008), considerando o nível mínimo de significância de 5%.

#### 3.4.3.2. Controle Curativo

O experimento foi conduzido nas mesmas condições do item 3.4.3.1, também com o híbrido AS 1565 e o isolado de Lages, SC. No estágio fenológico V2 foram realizadas inoculações com suspensão de 7x10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup> de *S. macrospora* pela deposição de 0,2 mL desta suspensão diretamente no cartucho de cada planta. Os fungicidas descritos no item 3.4.3.1 foram aplicados 48 horas após a inoculação. Nas testemunhas foi aplicado água destilada e esterilizada. Durante 48 horas após a inoculação as plantas foram mantidas sob



umidade relativa do ar em torno de 100% por meio de pulverização de água a cada 6 horas. Após 21 dias da inoculação, quando o milho estava no estágio fenológico V5 a quarta folha expandida de cada planta foi coletada e levada ao Laboratório de Fitopatologia da UDESC para avaliação da severidade da doença. O delineamento experimental e análise estatística foram realizados conforme item 3.4.3.1.

#### 3.4.4 Ação de fungicidas no controle da expansão da mancha-de-macrospora e formação de picnídios de *Stenocarpella macrospora*

O experimento foi conduzido na área experimental do CAV/UDESC, em área de semeadura direta e monocultura de dois anos, com o híbrido de milho AS 1565.

Foram testados os fungicidas (g ou mL i.a.ha<sup>-1</sup>): carbendazim (250) (Derosal 500 SC), propiconazole (100) (Tilt 250 CE), tebuconazole (200) (Folicur 200 EC), piraclostrobina + epoxiconazole (100 + 37,5) (Opera 283 SE), azoxistrobina + ciproconazole (60 +24) (Priori Xtra 280 SC), trifloxistrobina + tebuconazole (75 + 150) (Nativo 300 SC), picoxistrobina + ciproconazole (60 + 24) (Approach Prima 280 SC).

Para cada tratamento foram marcadas 10 folhas de plantas apresentando mancha-de-macrospora (naturalmente infectadas). Procedeu-se a medida de cada lesão com paquímetro digital. Após a primeira leitura, os fungicidas foram aplicados diretamente sobre a folha apresentando mancha, com borrifador manual. Em cada folha foram realizadas duas borrifadas (2 mL). As avaliações da expansão das lesões foram realizadas a cada três dias durante 27 dias após a aplicação. Aos 27 dias, as folhas foram cortadas e levadas ao Laboratório de Fitopatologia, onde permaneceram em câmara úmida sob temperatura de 30 °C e luz contínua durante 48 horas para extrusão do cirro. Foram mensurados o número de picnídios por cm<sup>2</sup> de cada lesão. A severidade foi integralizada como área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), através da fórmula  $AACPD = \sum[(y_1+y_2)/2*(t_2-t_1)]$ , onde  $y_1$  e  $y_2$  são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos  $t_1$  e  $t_2$ , respectivamente.

Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias dos tratamentos foram procedidas pelo Teste Tukey a 5%. As taxas de expansão de lesões foram analisadas através de regressão por contrastes ortogonais. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico do SAS.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Sensibilidade micelial de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas *in vitro*

Na inibição do crescimento micelial não foi observado diferença significativa entre os isolados SC e MT de *S. macrospora* (Tabela 4).

Dentre os fungicidas inibidores da síntese de esteróis (triazóis), os fungicidas propiconazole, ciproconazole e epoxiconazole mostraram maior inibição do crescimento micelial com concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) entre 0,040 a 0,063 ppm. Porém, todos os fungicidas mostraram-se eficientes na inibição do crescimento do micélio, apresentando valores de CI<sub>50</sub> abaixo de 1 ppm que, segundo classificação de Edgington et al. (1971), classificam-se como altamente fungitóxicos. Para esse mesmo grupo os fungicidas propiconazole, ciproconazole e epoxiconazole a concentração de 1 ppm foi suficiente para inibir 100% do crescimento micelial (CI<sub>100</sub>). Já para os fungicidas metconazole, tetraconazole e tebuconazole foi necessária uma concentração de 10 ppm para atingir CI<sub>100</sub> (Tabela 4, Figura 4). Em algodoeiro, o fungo *Myrothecium roridum* Tode. apresentou alta sensibilidade (valores inferiores a 1ppm) no crescimento micelial aos fungicidas tebuconazole e metconazole, enquanto ciproconazole e tetraconazole foram classificados como ineficazes (valores acima de 50 ppm) (SILVA et al., 2006). Em isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) do mamoeiro foi observado alta fungitoxicidade aos fungicidas propiconazole e tebuconazole, onde a CI<sub>50</sub> foi inferior a 1 ppm (TAVARES e SOUZA 2005). Em trigo para isolados de *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. in Sorok.) Shoem. e *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker, foi observado valores inferiores a 1 ppm para os fungicidas ciproconazole, metconazole, propiconazole, epoxiconazole e tebuconazole (STOLTE, 2006). Resultados semelhantes também foram constatados para *Colletotrichum accutatum* Simmonds do morangueiro que apresentou sensibilidade aos fungicidas propiconazole e tebuconazole (KOSOSKI et al., 2001). A eficiência de propiconazole em reduzir o crescimento micelial de *C. accutatum* também foi demonstrada por Freeman et al. (1997).

Para os fungicidas inibidores da divisão celular (benzimidazóis), os isolados mostraram maior sensibilidade ao carbendazim (Tabela 4), onde a CI<sub>50</sub> foi 0,0047 para o isolado MT e 0,050 para o isolado SC sendo a CI<sub>100</sub> obtida a 0,1 ppm. Tiofanato metílico e tiabendazole também apresentaram CI<sub>50</sub> menor que 1 ppm, porém com CI<sub>100</sub> a 0,5 e 1ppm respectivamente (Tabela 4, Figura 5). Em algodoeiro, o fungo *M. roridum* demonstrou alta

sensibilidade no crescimento micelial aos fungicidas carbendazim e tiofanato metílico (SILVA et al., 2006).

Os fungicidas inibidores da respiração mitocondrial (estrobilurinas) mostraram-se altamente fungitóxicos (Tabela 4), com  $CI_{50}$  entre 0,005 ppm para trifloxistrobina a 0,16 ppm para azoxistrobina. As respectivas  $CI_{100}$  para trifloxistrobina, azoxistrobina e piraclostrobina foram 100 ppm, 10 ppm e 1 ppm (Tabela 4, Figura 5). Em trigo, para isolados de *D. tritici-repentis* foi constatado alta sensibilidade ao fungicida azoxistrobina, por outro lado para isolados de *B. sorokiniana* foram observados valores de  $CI_{50}$  superiores a 1ppm para esse fungicida (STOLTE, 2006).

De acordo com os critérios propostos por Edgington et al. (1971), compostos químicos que apresentam  $CI_{50}$  menor que 1 ppm são considerados altamente fungitóxicos, com  $CI_{50}$  entre 1 e 50 ppm moderadamente fungitóxicos e com  $CI_{50}$  maior que 50 ppm não tóxicos. Porém em pesquisas recentes esse critério vem sendo questionado, pois a diferença entre 1 e 50 ppm é muito elevada para se enquadrar em um único padrão. Blum (2009) sugere para *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd. que substâncias que apresentam  $CI_{50} < 0,1$ ppm sejam consideradas altamente fungitóxicas,  $CI_{50}$  entre 0,1 e 20 ppm fungitóxicas,  $CI_{50}$  entre 21 e 100 ppm, moderadamente fungitóxica e  $CI_{50} > 100$  ppm, substância não tóxica.

Todos os fungicidas testados na inibição do crescimento micelial podem ser considerados altamente fungitóxicos de acordo com os critérios propostos por Edgington et al. (1971), se considerarmos os critérios propostos por Blum (2009), os fungicidas também podem ser enquadrados como altamente fungitóxicos, com exceção de alguns fungicidas pertencentes ao grupo dos triazóis que se enquadram como fungitóxicos.

Tabela 4 - Fungicidas, isolado, equação de regressão e concentração inibitória de 50 % (CI<sub>50</sub>) e 100 % (CI<sub>100</sub>) do crescimento micelial de *Stenocarpella macrospora*. Isolado SC (Lages, SC) e MT (Lucas do Rio Verde, MT). Lages, SC, 2011.

Fungicidas	Isolado	Equação de regressão	R <sup>2</sup>	PPM	
				CI <sub>50</sub>	CI <sub>100</sub>
Ciproconazole	SC	$y = 18,02 + 910,5x^* - 828,6x^{2*}$	0,86	0,038	1
	MT	$y = 15,47 + 739,9x^* - 655,5x^{2*}$	0,86	0,050	1
Epoconazole	SC	$y = 15,99 + 974,8x^* - 890,9x^{2*}$	0,89	0,036	1
	MT	$y = 7,15 + 724,0x^* - 632,1x^{2*}$	0,94	0,063	1
Metconazole	SC	$y = 31,91 + 68,01x^* - 6,18x^{2*}$	0,73	0,30	10
	MT	$y = 26,26 + 63,4x^* - 5,60x^{2*}$	0,77	0,40	10
Propiconazole	SC	$y = 23,1 + 681x^* - 605x^{2*}$	0,83	0,040	1
	MT	$y = 19,05 + 580,1x^* - 499,7x^{2*}$	0,78	0,056	1
Tetraconazole	SC	$y = 19,01 + 88,99x^* - 8,08x^{2*}$	0,85	0,35	10
	MT	$y = 19,21 + 88,22x^* - 8,01x^{2*}$	0,87	0,35	10
Tebuconazole	SC	$y = 29,04 + 78,3x^* - 7,12x^{2*}$	0,74	0,27	10
	MT	$y = 25,4 + 66,23x^* - 5,87x^{2*}$	0,78	0,4	10
Carbendazim	SC	$y = 13,25 + 1119,8x^* - 72266,6x^{2*}$	0,77	0,05	0,1
	MT	$y = 10,79 + 847,6x^* - 230,31x^{2*}$	0,61	0,047	0,1
Tiofanato metílico	SC	$y = 0,25 + 554x^* - 710x^{2*}$	0,98	0,10	0,5
	MT	$y = -4,31 + 397,91x^* - 371,5x^{2*}$	0,95	0,16	0,5
Tiabendazol	SC	$y = 0,90 + 524,8x^* - 423x^{2*}$	0,98	0,10	1
	MT	$y = 3,51 + 543,8x^* - 447,2x^{2*}$	0,97	0,09	1
Azoxistrobina	SC	$y = 40,03 + 63,80x^* - 5,78x^{2*}$	0,58	0,16	10
	MT	$y = 45,08 + 61,19x^* - 5,57x^{2*}$	0,51	0,09	10
Piraclostrobina	SC	$y = 28,63 + 906,02x^* - 834,7x^{2*}$	0,77	0,025	1
	MT	$y = 32,84 + 797,61x^* - 730,5x^{2*}$	0,68	0,022	1
Trifloxistrobina	SC	$y = 52,77 + 0,77x^* - 0,002x^{2*}$	0,38	0,005	100
	MT	$y = 52,12 + 0,71x^* - 0,002x^{2*}$	0,36	0,005	100

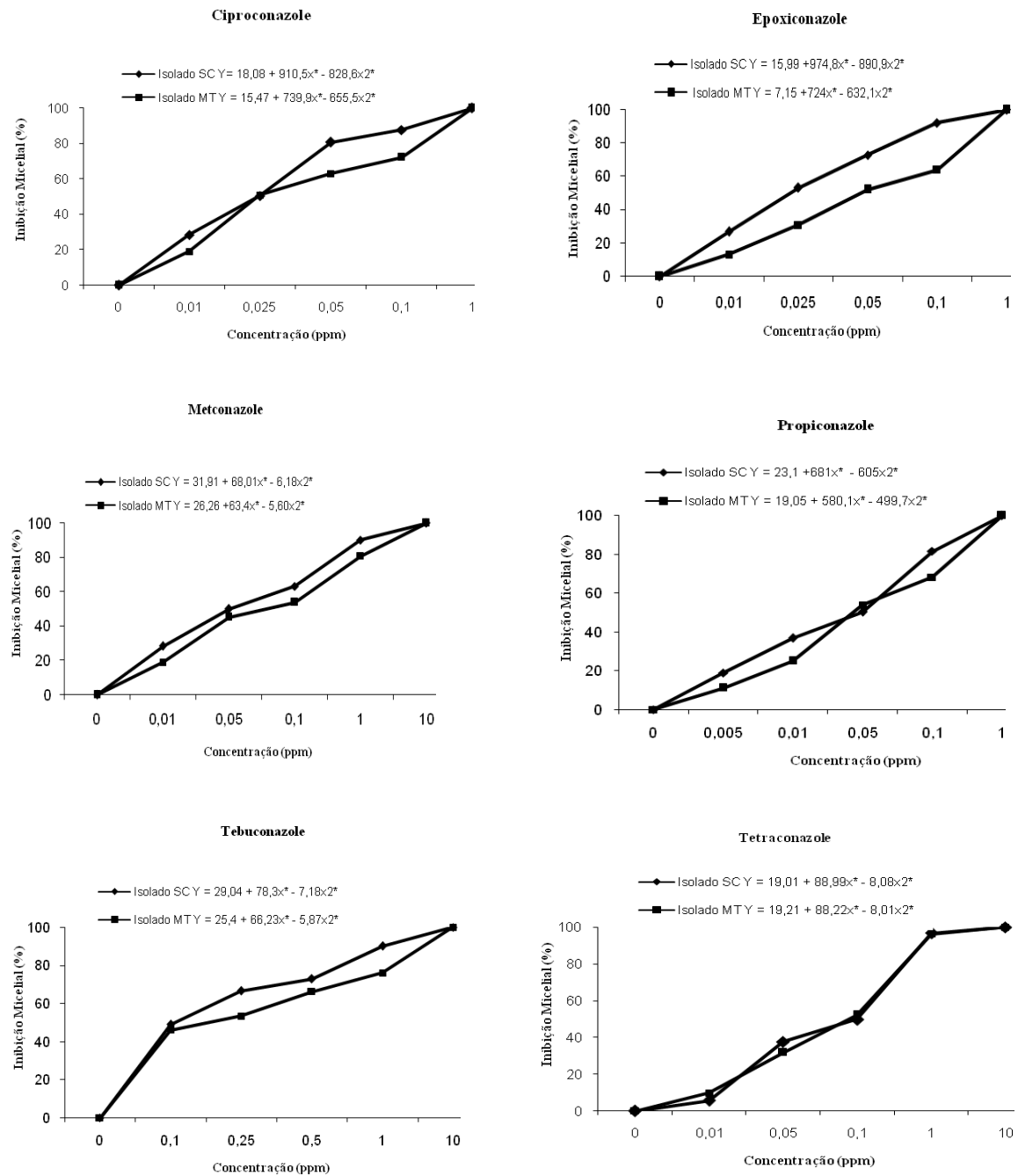


Figura 4 - Inibição do crescimento micelial de *Stenocarpella macrospora* em função da concentração de fungicidas (triazóis). Dados linearizados. Lages, SC, 2011.

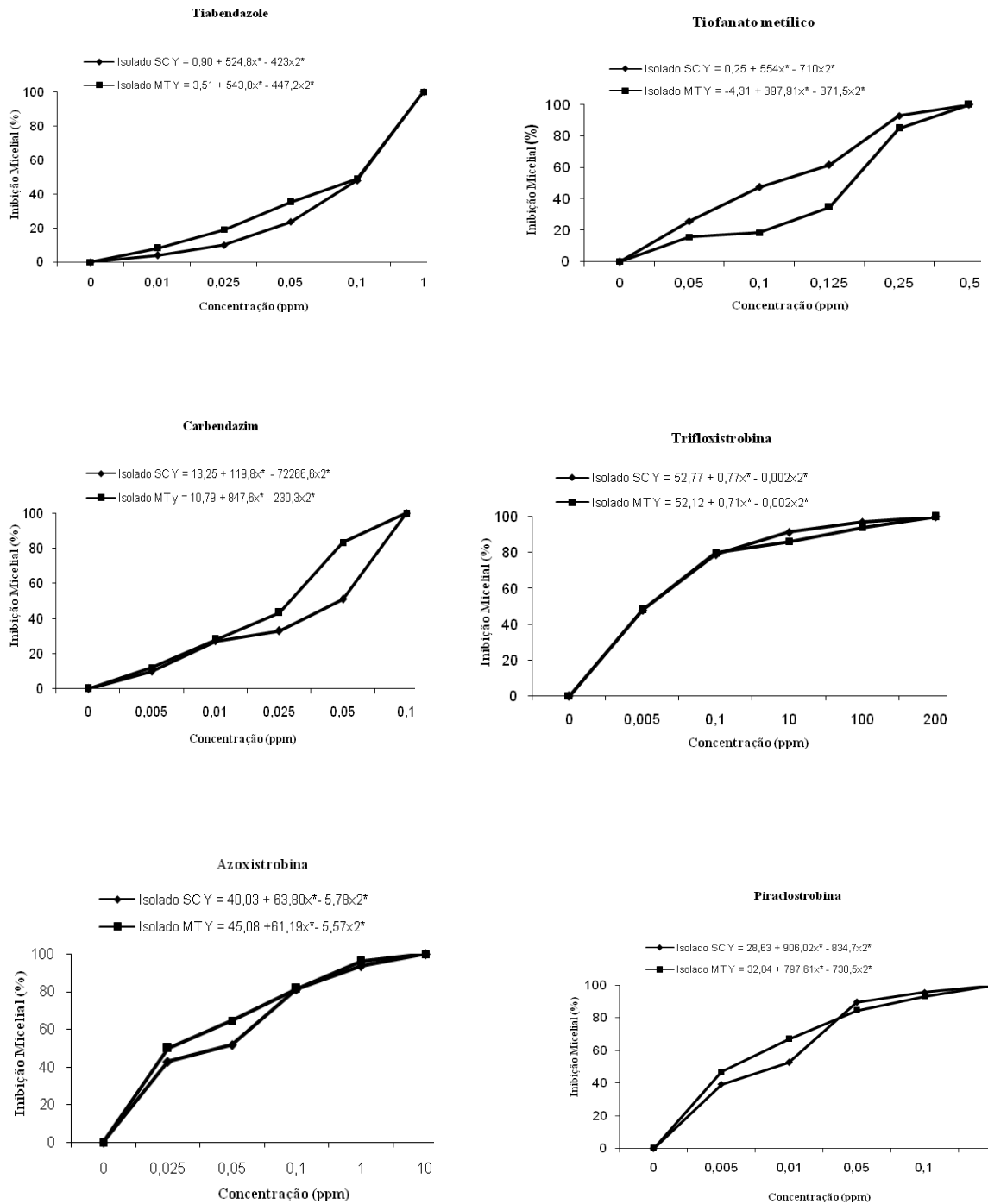


Figura 5 - Inibição do crescimento micelial de *Stenocarpella macrospora* em função da concentração de fungicidas (benzimidazóis e estrobilurinas). Dados linearizados. Lages, SC, 2011.

### 3.5.2. Sensibilidade de conídios de *Stenocarpella macrospora* a fungicidas *in vitro*

Na inibição da germinação de conídios foi observado diferença significativa entre os isolados SC e MT (Tabela 5). O isolado SC mostrou maior sensibilidade aos fungicidas avaliados em relação ao isolado MT.

As diferenças de fungitoxicidade de um mesmo produto sobre a inibição da germinação conidial dos isolados avaliados de *S. macrospora*, podem estar relacionadas à variabilidade genética do fungo e, em consequência, à maior ou menor sensibilidade desses isolados aos fungicidas testados. O fato dos isolados serem oriundos de regiões diferentes, com diferentes históricos de aplicações de fungicidas, corrobora essa hipótese, pois o isolado MT é oriundo de lavoura com uso intensivo de fungicidas. Diferença de sensibilidade de dois isolados de *B. sorokiniana* a fungicidas em avaliação da inibição da germinação de conídios também foram obtidos por Stole (2006).

Os fungicidas do grupo das estrobilurinas mostraram maior eficácia na inibição da germinação de conídios em relação aos grupos dos triazóis e benzimidazóis (Tabela 5).

Para ambos os isolados, valores de  $CI_{50}$  inferiores a 1 ppm (altamente sensíveis) foram observados somente para os fungicidas do grupo das estrobilurinas (azoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina).

Para o isolado SC valores de  $CI_{50}$  entre 1 e 10 ppm (moderadamente sensíveis) foram verificados aos fungicidas ciproconazole, metconazole, propiconazole, tetraconazole, tebuconazole, carbendazim, tiofanato metílico e tiabendazole e acima de 10 ppm somente para epoxiconazole (Tabela 5).

Para o isolado MT, valores de  $CI_{50}$  entre 1 e 10 ppm foram constatados aos fungicidas metconazole, tebuconazole, carbendazim e tiabendazole, e acima de 10 ppm para ciproconazole, epoxiconazole, propiconazole, tetraconazole e tiofanato metílico (Tabela 5).

Em avaliações da fungitoxicidade de fungicidas na germinação de conídios de *M. roridum* do algodoeiro, o fungicida ciproconazole foi classificado como ineficaz, enquanto que carbendazim e metconazole foram classificados como altamente eficazes (SILVA et al., 2006). Na inibição da germinação de conídios de *C. acutatum* do morangueiro foi relatada a não eficácia dos fungicidas tebuconazole e propiconazole em baixas concentrações (KOSOSKI et al., 2001). Para *Puccinia hemerocallidis* Thümen também não foi observado redução na germinação com o fungicida propiconazole (BUCK e WILLIAMS-WOODWARD, 2003). Em trigo para isolados de *B. sorokiniana* foram constatados valores de

DE<sub>50</sub> superiores a 100 ppm para ciproconazole, epoxiconazole, metconazole, propiconazole e tebuconazole (STOLTE, 2006).

Para os fungicidas do grupo das estrobilurinas, baixas concentrações também inibiram 100% a germinação de conídios, sendo que a concentração 0,05 ppm para trifloxistrobina e 0,1 ppm para piraclostrobina foi suficiente para obter CI<sub>100</sub> para o isolado SC. Enquanto que para os demais grupos a concentração de 100 ppm não foi suficiente para inibir 100% (Tabela 5, Figura 7).

Resultados semelhantes foram obtidos por Blum (2009) que constatou maior eficiência dos fungicidas do grupo das estrobilurinas (azoxistrobina, picoxistrobina, trifloxistrobina e piraclostrobina), em relação aos triazóis, (ciproconazole, epoxiconazole, metconazole, flutriafol, microbutanil e tetraconazole) na inibição da germinação de uredosporos de *P. pachyrhizi*. Esse fato sugere a possibilidade do uso de reservas do ergosterol durante o processo de germinação dos esporos, o que pode comprometer desta forma, a resposta observada em testes *in vitro* (BUCK e WILLIAMS-WOODWARD, 2003).

Na inibição da germinação de conídios somente as estrobilurinas podem ser consideradas como altamente fungitóxicas de acordo com Edgington et al. (1971) e Blum (2009). Os demais fungicidas podem ser considerados como fungitóxicos de acordo com Blum (2009) e/ou moderadamente fungitóxicos de acordo com Edgington et al. (1971).



Tabela 5 - Fungicidas, isolado, equação de regressão, e concentração inibitória de 50 % (CI<sub>50</sub>) e 100 % (CI<sub>100</sub>) da germinação de conídios de *Stenocarpella macrospora*. Isolado SC (Lages, SC) e MT (Lucas do Rio Verde, MT). Lages, SC, 2011.

Fungicidas	Isolado	Equação de regressão	R <sup>2</sup>	PPM	
				CI <sub>50</sub>	CI <sub>100</sub>
Ciproconazole	SC	$y = 21,75 + 3,9x^* - 0,03x^{2*}$	0,68	7,7	>100
	MT	$y = 10,26 + 2,43x^* - 0,018x^{2*}$	0,86	19,0	>100
Epoconazole	SC	$y = 11,59 + 3,29x^* - 0,02x^{2*}$	0,93	12,7	>100
	MT	$y = 12,25 + 3,67x^* - 0,02x^{2*}$	0,93	11,0	>100
Metconazole	SC	$y = 20,18 + 7,93x^* - 0,07x^{2*}$	0,79	4,0	>100
	MT	$y = 19,47 + 4,35x^* - 0,035x^{2*}$	0,89	7,5	100
Propiconazole	SC	$y = 39,1 + 4,52x^* - 0,004x^{2*}$	0,46	2,2	>100
	MT	$y = 6,47 + 1,78x^* - 0,010x^{2*}$	0,95	21,8	>100
Tetraconazole	SC	$y = 23,61 + 4,26x^* - 0,003x^{2*}$	0,76	6,2	>100
	MT	$y = 7,95 + 2,93x^* - 0,002x^{2*}$	0,94	14,5	>100
Tebuconazole	SC	$y = 15,98 + 5,36x^* - 0,04x^{2*}$	0,76	6,7	>100
	MT	$y = 18,64 + 5,68x^* - 0,04x^{2*}$	0,91	5,8	100
Carbendazim	SC	$y = 41,54 + 4,017x^* - 0,0035x^{2*}$	0,44	2,1	>100
	MT	$y = 7,42 + 5,11x^* - 0,004x^{2*}$	0,94	8,4	>100
Tiofanato metílico	SC	$y = 14,93 + 4,67x^* - 0,04x^{2*}$	0,86	8	>100
	MT	$y = 4,28 + 4,030x^* - 0,03x^{2*}$	0,98	12,5	>100
Tiabendazol	SC	$y = 39,88 + 4,83x^* - 0,04x^{2*}$	0,56	2	>100
	MT	$y = 10,45 + 7,39x^* - 0,006x^{2*}$	0,94	5,4	>100
Azoxistrobina	SC	$y = 18,15 + 1734,99x^* - 10031x^{2*}$	0,87	0,02	>0,1
	MT	$y = 6,44 + 1776,0x^* - 8081,1x^2$	0,97	0,03	>0,1
Piraclostrobina	SC	$y = 37,15 + 2111,5x^* - 15137,6x^{2*}$	0,60	0,006	0,1
	MT	$y = 14,29 + 1929,3x^* - 11104x^{2*}$	0,92	0,02	>0,1
Trifloxistrobina	SC	$y = 15,89 + 10563,5x^* - 177757x^{2*}$	0,87	0,0035	0,05
	MT	$y = -2,01 + 6658,1x^* - 95724x^{2*}$	0,98	0,009	>0,05

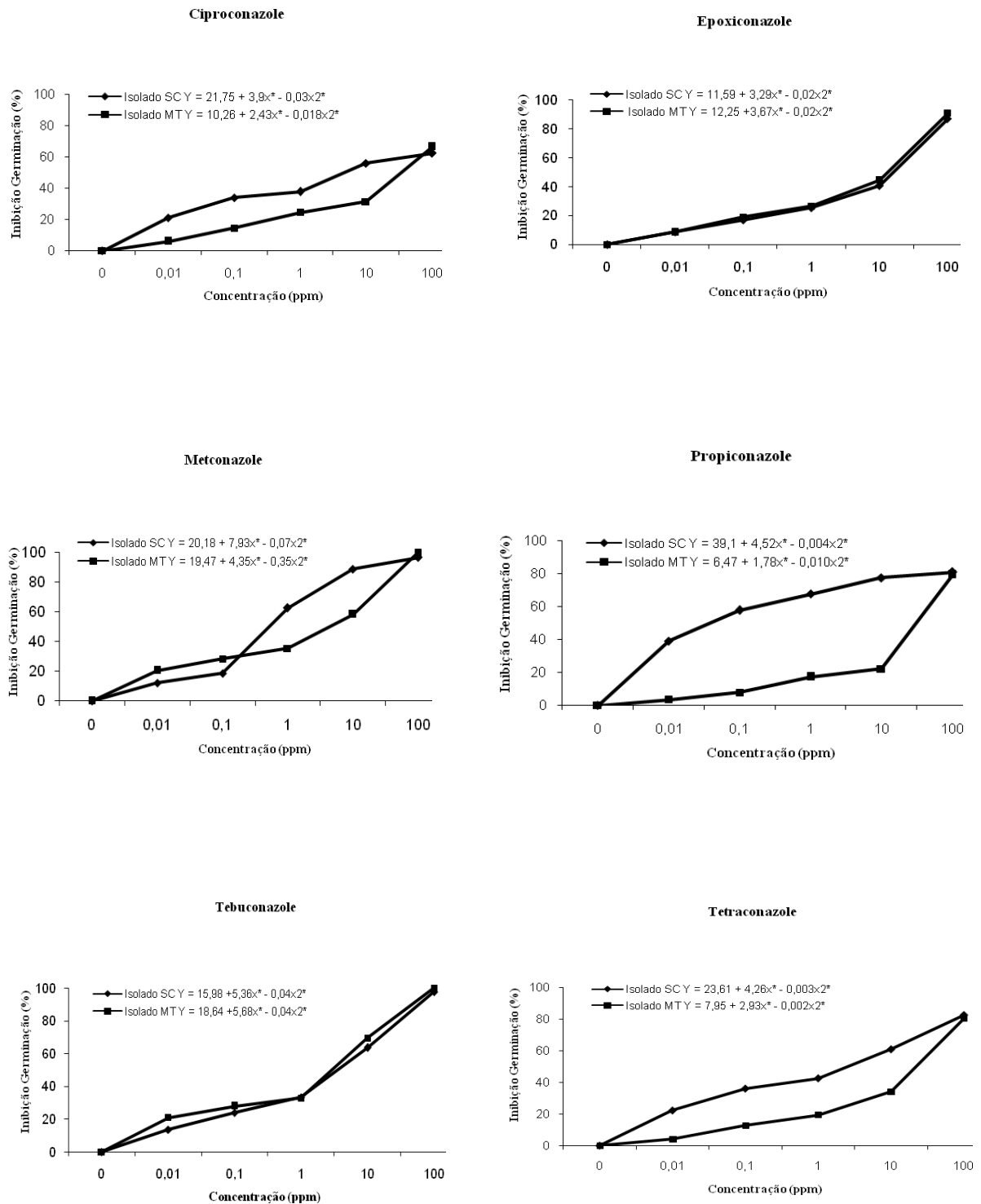


Figura 6 – Inibição da germinação de conídios de *Stenocarpella macrospora* em função da concentração de fungicidas (triazóis). Dados linearizados. Lages, SC, 2011.

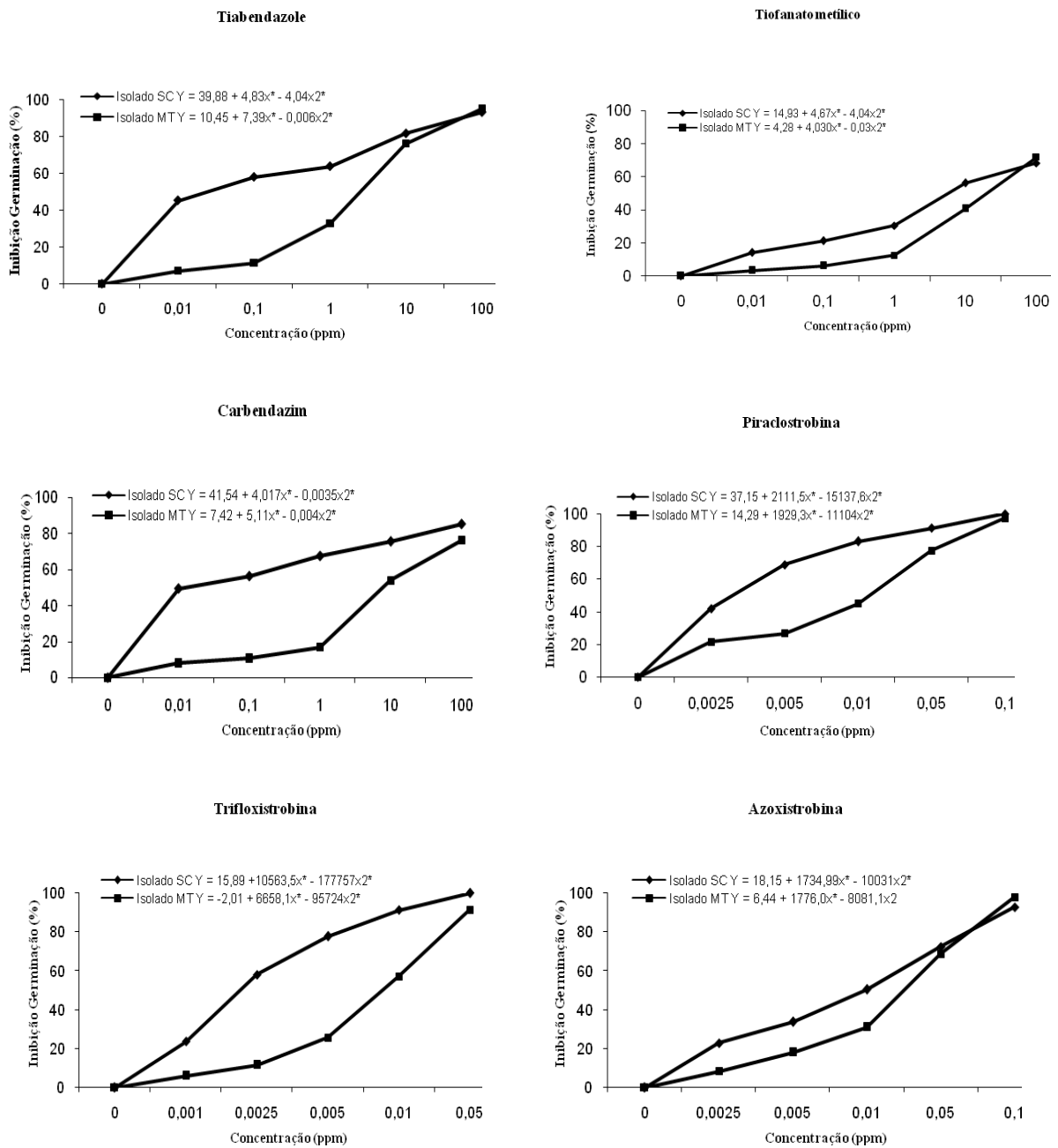


Figura 7 – Inibição da germinação de conídios de *Stenocarpella macrospora* em função da concentração de fungicidas (benzimidazóis e estrobilurinas). Dados linearizados. Lages, SC, 2011.

### 3.5.3. Controle preventivo e curativo da mancha-de-macrospora

Todos os fungicidas testados neste trabalho *in vitro* podem atuar como protetores, curativos ou erradicativos. No primeiro caso, a ação tóxica do produto é exercida sobre a germinação dos esporos, na formação do tubo germinativo e do apressório e, no segundo e terceiro, na inibição do crescimento micelial (SILVA et al., 2006).

Os fungicidas testados de forma preventiva reduziram significativamente a porcentagem de área foliar afetada (sintomas de clorose e necrose) da mancha-de-macrospora quando comparados a testemunha (Tabela 6). Não houve diferença significativa entre tratamentos com exceção do tetraconazole que apresentou severidade mais elevada em relação aos demais fungicidas (Tabela 6). A aplicação de fungicidas de forma preventiva reduziu em média 85% a severidade da mancha-de-macrospora em relação à testemunha.

Tabela 6 - Ação preventiva de fungicidas na severidade da mancha-de-macrospora em plantas jovens do milho híbrido AS 1565. Lages, SC, 2011.

Tratamentos	g i.a. ha <sup>-1</sup>	Severidade (%)	Controle (%)
Testemunha		11,18 a	
Tetraconazole	50	3,48 b	68,8
Tebuconazole	200	2,06 c	81,5
Metconazole	81,1	2,00 c	82,1
Trifloxistrobina + Tebuconazole	75 + 150	1,98 c	82,2
Azoxistrobina	62,5	1,85 c	83,4
Piraclostrobina + Epoxiconazole	100 + 37,5	1,76 c	84,2
Epoxiconazole	93,7	1,72 c	84,6
Piraclostrobina	150	1,69 c	84,8
Picoxistrobina + Ciproconazole	60 + 24	1,57 c	85,9
Ciproconazole	30	1,46 c	86,9
Trifloxistrobina	125	1,41 c	87,3
Propiconazole	100	1,41 c	87,3
Azoxistrobina + Ciproconazole	60 + 24	1,34 c	88,0
Tiabendazole	247,8	1,31 c	88,2
Tiofanato metílico	267,9	1,10 c	90,1
Carbendazim	250	0,99 c	91,1
<b>Média</b>			<b>85,0</b>
<b>CV (%)</b>		<b>28,26</b>	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scoot knott a 5%.

No controle curativo todos os fungicidas diferiram significativamente da testemunha reduzindo a área foliar afetada (Tabela 7). Os fungicidas mais eficientes na ação curativa

foram as misturas de estrobilurinas + triazóis (trifloxistrobina + tebuconazole, picoxistrobina + ciproconazole, azoxistrobina + ciproconazol e piraclostrobina + epoxiconazole) diferindo significativamente dos demais fungicidas testados. As misturas de estrobilurinas + triazóis reduziram em média 75% a severidade da mancha-de-macrospora em relação à testemunha, enquanto que os produtos isolados, como estrobilurinas reduziram 62%, benzimidazóis 55% e triazóis 38%.

A utilização de misturas com fungicidas de modo de ação diferentes apresentam melhor eficácia no controle curativo da mancha-de-macrospora, podendo atuar tanto nas fases iniciais do desenvolvimento do patógeno, inibindo a germinação dos conídios, como nas fases mais avançadas do ciclo de vida, impedindo o crescimento micelial. Além disso, pode aumentar o espectro de controle de outros fungos patogênicos em milho, o período residual das aplicações e contribuir para evitar os problemas com insensibilidade de patógenos a fungicidas (REIS et al., 2010).

Tabela 7 - Ação curativa de fungicidas na severidade da mancha-de-macrospora em plantas jovens do milho híbrido AS 1565. Lages, SC, 2011.

<b>Tratamentos</b>	<b>g.i.a. ha<sup>-1</sup></b>	<b>Severidade (%)</b>	<b>Controle (%)</b>
Testemunha		22,46 a	
Ciproconazole	30	16,06 b	28,5
Epoxiconazole	94	15,40 b	31,4
Tetraconazole	50	15,40 b	31,4
Metconazole	81	15,16 b	32,5
Tebuconazole	200	12,73 b	43,3
Tiabendazole	248	12,10 b	46,1
Piraclostrobina	150	10,41 c	53,6
Tiofanato metílico	268	9,78 c	56,4
Propiconazole	100	8,36 c	62,7
Carbendazim	250	8,33 c	62,9
Azoxistrobina	63	8,01 c	64,3
Trifloxistrobina	125	7,58 c	66,2
Trifloxistrobina + Tebuconazole	75 + 150	6,60 d	70,6
Picoxistrobina + Ciproconazole	60 + 24	6,31 d	72,1
Azoxistrobina + Ciproconazole	60 + 24	4,81 d	78,5
Piraclostrobina + Epoxiconazole	100 + 37,5	4,50 d	80,1
<b>Média</b>			<b>55,03</b>
<b>CV (%)</b>		<b>27,91</b>	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scoot knott a 5% .

Os fungicidas azoxistrobina, trifloxistrobina, piraclostrobina, tiofanato metílico, propiconazole e carbendazim apresentaram melhor eficácia quando aplicados isoladamente,

em relação aos demais fungicidas isolados (Tabela 7). Esses fungicidas foram classificados como altamente eficazes e moderadamente eficazes nos testes de inibição da germinação conidial e crescimento micelial *in vitro*, para este mesmo isolado.

A aplicação de fungicidas de forma preventiva, quando comparado à curativa, é mais eficaz no controle da mancha-de-macrospora, independentemente do produto utilizado. Neste estudo, a redução da área foliar afetada pelo patógeno foi mais acentuada quando se utilizaram os fungicidas preventivamente.

A menor porcentagem de área foliar lesionada nas plantas de milho tratadas de forma preventiva está, provavelmente, associada à redução da viabilidade dos esporos e, em consequência, do inóculo inicial do patógeno por esses fungicidas, inibindo ou retardando o progresso da doença. No tratamento curativo, houve desenvolvimento de infecção antes da aplicação de fungicidas, e esse fato contribuiu para maior severidade da doença. A proteção da planta pela aplicação do produto antes da deposição do patógeno, ou em baixa severidade da doença, além de retardar o início da epidemia, diminui a chance de um isolado resistente predominar nessas populações.

A estratégia de se utilizar fungicidas antes da penetração e colonização de patógenos, em áreas com alta pressão de inóculo e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de epidemias, pode reduzir o progresso de doenças (SILVA et al., 2006).

#### 3.5.4. Ação de fungicidas no controle da expansão de lesões da mancha-de-macrospora e formação de picnídios de *Stenocarpella macrospora*

Na avaliação da eficácia de fungicidas no controle da expansão da mancha-de-macrospora, as misturas de estrobilurinas + triazóis também mostraram maior controle da doença (Tabela 8). Os fungicidas carbendazim e propiconazole não diferiram da testemunha, apresentando menor eficácia quando comparados aos demais. O fungicida tebuconazole e as misturas de estrobirulinas + triazóis apresentaram menor AACPD (integral) e menor taxa de expansão, sendo que o incremento médio das manchas variou de 0,35 mm/dia a 0,92 mm/dia para piraclostrobina + epoxiconazole e tebuconazole, respectivamente. Além disso, esses mesmos tratamentos apresentaram média do tamanho final das manchas inferior à média da testemunha, em cerca de 68% de redução. Foi observado também, que o maior aumento no tamanho das lesões se dá nos primeiros dias de avaliação, e após o terceiro dia há uma estabilização. Já para a testemunha e os fungicidas carbendazim e propiconazole as lesões continuam aumentando ao longo do tempo (Figura 8).

Tabela 8 - Tamanho médio de lesões da mancha-de-macrospora em folhas de plantas do híbrido AS1565 em função da aplicação de fungicidas. Lages, SC, 2011.

Produto	Tamanho médio das manchas (mm)			Taxa (mm/dia)
	Inicial <sup>1</sup>	Final <sup>2</sup>	Integral <sup>3</sup>	
Testemunha	54,6	214,7	3.197,6 a	6,08
Carbendazim	56,6	151,8	2.698,1 ab	3,57
Propiconazole	55,3	109,7	2.316,8 ab	2,00
Azoxistrobina + Ciproconazole	69,0	85,5	2.147,0 b	0,51
Piraclostrobina + epoxiconazole	68,8	80,2	2.037,7 b	0,35
Trifloxistrobina + Tebuconazole	61,9	82,5	1.988,6 b	0,73
Tebuconazole	57,5	82,2	1.896,4 b	0,92
Picoxistrobina + Ciproconazole	55,5	75,6	1.699,0 b	0,41
CV (%)				44,06

<sup>1</sup>Mensurado antes da aplicação dos fungicidas. <sup>2</sup>Mensurado 27 dias após a aplicação.

<sup>3</sup>Integralizada pela fórmula:  $\sum[(y_1+y_2)/2*(t_2-t_1)]$ , onde  $y_1$  e  $y_2$  são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos  $t_1$  e  $t_2$  respectivamente;

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

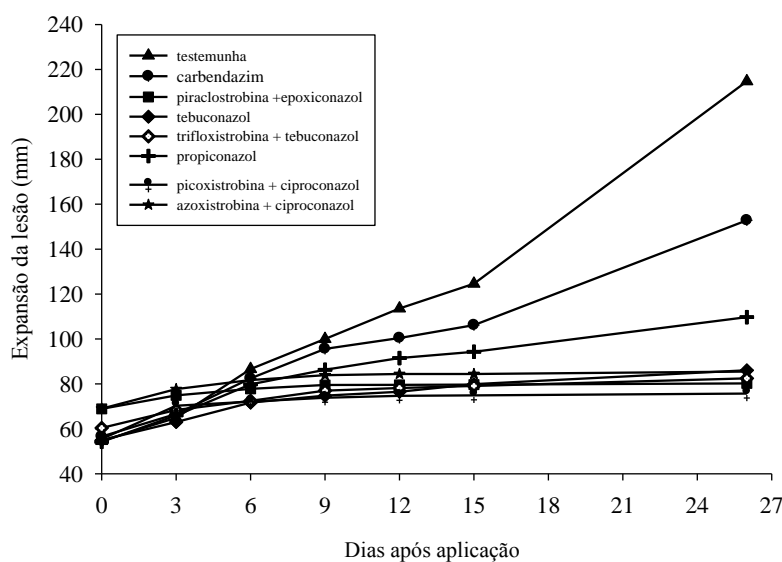


Figura 8 – Expansão de lesões da mancha-de-macrospora (mm) em função da aplicação de fungicidas no híbrido de milho AS1565. Lages, SC, 2011.

Duarte et al. (2009), em avaliação de fungicidas aplicados em estágio V8 a V10 com o híbrido 2B710, avaliado aos 56 dias após a aplicação, reportam uma redução média de 72% da mancha-de-macrospora, em relação a testemunha, que apresentou severidade de 18,75%, com aplicação de azoxistrobina + ciproconazole ( $0,3L\ ha^{-1}$ ), tebuconazole ( $1L\ ha^{-1}$ ),

carbendazim ( $0,5\text{Lha}^{-1}$ ), tetraconazole ( $0,5\text{L ha}^{-1}$ ), azoxistrobina ( $0,3\text{L ha}^{-1}$ ) e epoxiconazole + piraclostrobina ( $0,75\text{L ha}^{-1}$ ).

Em relação a formação de picnídios de *S. macrospora* nas lesões foi observado que todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha, reduzindo em média 60% a formação de picnídios  $\text{cm}^{-2}$ , variando de 51 a 73%, respectivamente para tebuconazol + trifloxistrobina e carbendazim (Tabela 9).

O carbendazim foi eficiente na inibição do crescimento micelial e no controle protetor da mancha-de-macrospora, esse fato corrobora com a hipótese que a inibição do crescimento micelial pode reduzir a formação de picnídios de *S. macrospora*.

Tabela 9 - Número médio de picnídios por  $\text{cm}^2$  nas lesões das manchas-de-macrospora e inibição da formação de picnídio (%) em relação à testemunha, em folhas de plantas do híbrido AS1565, 27 dias após a aplicação de fungicidas. Lages, SC, 2011.

<b>Tratamento</b>	<b>Pícnidio (<math>\text{cm}^{-2}</math>)</b>	<b>Inibição da formação de picnídio (%)</b>
Testemunha	30,2 a	
Trifloxistrobina + tebuconazole	14,8 b	51
Propiconazole	14,2 b	53
Tebuconazole	14,2 b	53
Piraclostrobina + Epoxiconazole	12,5 b	58
Picoxistrobina + Ciproconazole	12,1 b	60
Azoxistrobina + Ciproconazole	10,9 b	64
Carbendazim	8,6 b	73
<b>CV (%)</b>	<b>47,7</b>	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de tukey a 5%.

Com esse trabalho foi constatado que a aplicação de fungicidas reduz significativamente a severidade da doença, constituindo-se em estratégia eficiente dentro do manejo integrado de doenças. Por outro lado, mais estudos devem ser conduzidos em diferentes condições de campo, assim como, explorar mais moléculas e/ou misturas, épocas e número de aplicações visando reduzir a intensidade da mancha-de-macrospora e proporcionar aumento do rendimento e redução de grãos ardidos.



### 3.6 CONCLUSÕES

Todos os fungicidas foram classificados como altamente fungitóxicos na inibição do crescimento micelial *in vitro* para ambos os isolados.

As estrobilurinas mostraram maior eficácia na inibição da germinação de conídios *in vitro* de ambos os isolados, quando comparados aos triazóis e benzimidazóis.

O isolado de *S. macrospora* de SC foi mais sensível aos fungicidas testados na inibição da germinação de conídios.

Os fungicidas testados demonstraram-se eficientes quando aplicados de forma preventiva em plantas jovens de milho no controle da mancha-de-macrospora.

As misturas de estrobilurinas + triazóis demonstraram-se mais eficientes que os benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas isolados quando aplicados de forma curativa em plantas jovens de milho no controle da mancha-de-macrospora.

O fungicida tebuconazole e as misturas de estrobilurinas + triazóis mostraram-se eficientes no controle da expansão da mancha-de-macrospora.

Os fungicidas avaliados reduzem a formação de picnídios de *S. macrospora* nas lesões foliares.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mancha-de-macrospora tem se tornado uma das doenças mais freqüentes e importantes na cultura do milho no Brasil. No estado de Santa Catarina a demanda por altas produtividades de milho para o consumo animal tem dificultado o controle da doença através de práticas culturais, como rotação de culturas. Apesar de sua relevância, as informações de controle da doença são escassas, principalmente relacionadas a resistência genética e ao controle químico.

Com base nos resultados deste trabalho pode-se concluir que não há resistência completa a mancha-de-macrospora nos principais híbridos cultivados em Santa Catarina. Porém, existem diferentes níveis de suscetibilidade. Desta forma, mais estudos visando a avaliação de diferentes híbridos e isolados de regiões distintas sob diferentes condições ambientais devem ser conduzidos para maiores informações de resistência a mancha-de-macrospora.

O controle químico é uma estratégia de controle de doenças muito utilizada por agricultores. Apesar de não se ter informações de fungicidas indicados específico para mancha-de-macrospora no Brasil, foi constatado neste trabalho que os fungicidas testados reduzem significativamente a severidade da doença, constituindo-se em estratégia eficiente dentro do manejo integrado.

Valores de  $CI_{50}$  são úteis no monitoramento da sensibilidade de *S. macrospora*. Estudos de fungitoxicidade em diferentes condições de campo devem ser conduzidos, assim como, avaliação da época e número de aplicações, visando reduzir a intensidade da mancha-de-macrospora.

Para finalizar, salienta-se que práticas de controle isoladas podem não ser eficazes no controle da mancha-de-macrospora. Contudo, o manejo integrado possibilita reduzir danos e perdas causados por *S. macrospora* em milho nas regiões com ocorrência epidêmica da doença, o que inclui híbridos com tolerância e aplicação de fungicidas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba, Agronômica Ceres, 2001, 704p.
- BAMPI, D.; CASA R.T.; WORDELL FILHO, J.A.; KUHNEM JR, P.R.; PILETTI, G. Relação entre a mancha-de-macrospora na folha da espiga e o rendimento e a sanidade de grãos de milho. In: **VIII Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão**. n.8, 2011. Chapecó. Resumos... Chapecó: Epagri, 2011.
- BLUM, L.E.; SANGOI, L.; AMARANTE, C. V. T.; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L. S. Desfolha, população de plantas e precocidade do híbrido afetam a incidência e severidade de podridões de colmo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n.5, p. 805-811, 2003.
- BLUM,M.M.C. **Sensibilidade de *Pakpsora pachyrhizi* a fungicidas**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UPF, Passo Fundo, 2009, 164.
- BRUNELLI, K.R.; ATHAYDE, C.S.; CAVALCANTI, L.S.; FERREIRA, P.T.O.; CAMARGO, L.E.A. Germinação e penetração de *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p. 187-190, 2005.
- BUCK, J. W.; WILLIAMS-WOODWARD, J. L. The effect of fungicides on urediniospore germination and disease development of daylily rust. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 135-140, 2003.
- CASA, R.T.; REIS, E. M.; KUHNEM JUNIOR, P.R.; HOFFMANN, L.L. **Doenças do milho: Guia de Campo para identificação e controle**. Lages: Graphel, 2010. 79 p.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; SEVERO, R., DENTI, E.; TRENTO, S.; BLUM, M.M.C. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: Sandini, I.A.; Fancelli, A.L. (Eds.) **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava. Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. p.131-146, 2000.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.28, p.355-361, 2003.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, p.141-147, 2004.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados a semente de milho produzida nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.370-373. 1998.
- CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L.; MOREIRA, E.N. Efeito da temperatura e de regimes de luz no crescimento do micélio, germinação de conídios e esporulação de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.32, p.137-142, 2007.

CASA, R.T; REIS, E.M; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas pelo gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.5, p. 427-439, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Indicadores da Agropecuária. Disponível em: [www.conab.com.br](http://www.conab.com.br). Acesso em 21 de ago. 2011.

COSTA NETO, J.P. Lista de fungos sobre gramíneas (capins e cereais) no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Agronomia (UFRGS)** v.1, p.43-78, 1976.

COSTA, R. V; COTA, L. V. **Controle químico de doenças na cultura do milho: aspectos a serem considerados na tomada de decisão sobre aplicação**. Embrapa, Sete Lagoas, MG, 2009. (Circular Técnica 125).

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; SILVA, G.H. Oferta abundante. In: **Cultivar: grandes culturas**. n.136, p. 18-33, 2010.

DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C. et al. Economia da produção e utilização do milho. In: **Cultivo do milho**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sistema de produção, 1. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/economiadaprodu.htm>>. Acesso em: 5 set. 2006.

DUARTE, R.P.; JULIATTI, F.C.; FREITAS, P.T. Eficácia de diferentes fungicidas na cultura do milho. **Biosciencia**. J, Uberlândia. v.25, n. 4, p. 101-111, 2009.

EARLE, F.S. New species of fungi imperfect from Alabama. **Bulletin Torrey Botanical Club** v.24, p.28-32, 1897.

EDDINS, A.H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. **Phytopathology**, Sant. Paul, v.20, n.3, p. 439-448, 1930.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G.L. Fungitoxic Spectrum of Benzimidazole Compounds. **Phytopathology**, Sant Paul, v.61, p.42-44, 1971.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. Fisiologia da Produção e Aspectos Básicos de Manejo para Alto Rendimento. In: SANDNI, I.E.; FANCELLI, A.L. **Milho: Estratégias de Manejo para a Região Sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, p.103-115, 2000.

FANCELLI, A.L.; LIMA, U.A. **Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: SICCI; PROMOCET; FEALQ, 1982. 112p. (Série Extensão Agroindustrial, 5).

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa- CNPMS, 1997. 80 p. (Circular Técnica, 26).

FLETT, B.C.; WEHNER, F.C. Incidence of *Stenocarpella* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.133, p.327-333. 1991.

FRAC, 2000. Fungicide resistance action committee. Global Crop Protection Organization. Brussels. ([www.gcpt.org/frac](http://www.gcpt.org/frac))

FREEMAN, S., NIZANI, F., DOTAN, S., EVEN, S.; SANDO, T. Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse and field conditions. **Plant Disease**, Sant Paul, v.81, p.749-752. 1997.

JOHANN, H. *Diplodia macrospora* em milho no Brasil. **Plant Disease**, Sant Paul, v.19, p.9-10, 1935.

KAPPELMAN, A.J.; THOMPSON, D.L.; NELSON, R.R. Virulence of 20 isolates of *Diplodia zeae* as revealed by stalk rot development in corn. **Crop Science**, Madison, v.5, p. 441-443, 1965.

KOEHLER, B. Natural mode of entrance of fungi into maize ears and some symptoms that indicate infection. **Journal Agricultural Research**, Washington, v.64, n.8, p. 421-442, 1942.

KOSOSKI, R.M.; FURLANETTO, C.; TOMITA, C.K.; CAFÉ FILHO, A.C. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.26, p. 662-666, 2001.

LATTERELL, F.M.; ROSSI, A.E. *Stenocarpella macrospora* (= *Diplodia macrospora*) and *S. maydis* (= *D. maydis*) compared as pathogens of corn. **Plant Disease**, Sant Paul, v.67, p.725-729, 1983.

LLANO, A.; SCHIEBER, E. *Diplodia macrospora* on corn in Nicaragua. **Plant Disease**, Sant Paul, v.64, p.797, 1980.

MARASAS, W.F.O.; VAN DER WESTHUIZEN, G.C.A. *Diplodia macrospora*: the cause of leaf blight and cob rot of maize (*Zea mays*) in South Africa. **Phytophylactica**, Pretória, v.11, p.61-64, 1979.

MÁRIO, J.L.; REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.26, p.670-672, 2001

MAXWELL, J.D.; THOMPSON, D.L. Mutual balance between tester resistance and isolate virulence the evaluation of corn inbreds for *Diplodia* stalk rot. **Crop Science**, Madison, v.14, n.4, p. 594-595, 1974.

McGEE, D.C. **Maize diseases: A reference source for seed technologists**. Sant Paul. American Phytopathological Society. 1988. 150p.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> acesso em : 06 de outubro de 2011.

MORA, L.E.; MORENO, R.A. Cropping pattern and soil management influence on plant diseases: I. *Stenocarpella macrospora* leaf spot of maize. **Turrialba**, San José, v.34, p.35-40, 1984.

OLATINWO, R.; CARDWELL, K.; MENKIR, A.; DEADMAN, M.; JULIAN, A. Inheritance of resistance to *Stenocarpella macrospora* (Earle) ear rot of maize in the mid-altitude Zone of Nigeria. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, n.6 , p.535-543, 1999b.

OLATINWO, R.O.; CARDWELL, K.F.; DEADMAN, M.L; JULIAN, A.M. Epidemiology of *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton on maize in the Mid-altitude Zone of Nigeria. **Journal of Phythopathology**, Berlin, v.147, n.6 , p.347-352, 1999a.

PASCUAL, C.B.; GUZMAN. P.S.; SALAZAR, A.M. Reliable and Economical inoculum production method and disease resistance evaluation techniques to *Stenocarpella macrospora* in maize. **Journal of Tropical Plant Pathology**, Los Baños, v.38, n.1, p.1-8, 2002.

PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; SAWAZAKI,E.; DUDIENAS, C. DUARTE, A. P.; GALLO, P. B. Diallel crosses among maize lines with emphasis on resistance to foliar diseases. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v.23, n.1, p.381-385, 2000.

PEREIRA, O.A.P., CARVALHO, R.V.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho (*Zea mays* L.). In: KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. 4ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres. 2005. p. 477-488.

PINTO, N.F.J.A. Controle Químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.3, n.1, p.134-138, 2004.

PINTO, N.F.J.A., FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Controle de Doenças do milho. In: VALE, F.X.R.; ZAMBLIM, L. (Eds.) **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG. 1997. p. 821-864.

PINTO, N.F.J.A.; ANGELIS de, B.; HABE, M.H. Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da cercosporiose (*Cercosporazeae-maydis*) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.3, n.1, p.139-145, 2004.

R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

RAM, A.; RAM, C.; ROCHA, H.M. A new disease of maize in Bahia, Brazil, with special reference to its causal organism. **Turrialba**, San José, v.23, p.227-230, 1973.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Milho: manejo integrado de doenças. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (Eds.) **Milho: tecnologia e produtividade**. Piracicaba SP. ESALQ/LPV, 2001. p. 223-237.

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

REIS, E.M.; REIS, A.C.; CARMONA, M.A. **Manual de fungicidas: Guia para controle químico de doenças de plantas**. 6º ed. Passo Fundo. Ed. Universidade de Passo Fundo, 2010. 226p.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; WYK, P.S.VAN.; TOIT, W. DU.; PRETORIUS, A.J.; SCHALKWYK, D.J. VAN. Incidence of *Fusarium* and *Diplodia* species and other fungi in naturally infected grain of South African maize cultivars. **Phytophylactica**, Pretoria, v.22, p.97-102, 1990

RINGER C.E.; GRYBAUSKAS A.P. Infection cycle components and disease progress of grey leaf spot on field corn. **Plant Disease**, Sant Paul, v.79, n.1, p.24-28, 1995.

SANGOI, L. Aptidão dos Campos de Lages (SC) para Produção de Milho em Diferentes Épocas de Semeadura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, p.51-63, 1993.

SANGOI, L.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G.; RAMBO, L. **Desenvolvimento e exigências climáticas da planta de milho para altos rendimentos**. Lages: Graphel, v.1, 2007. 95p.

SANGOI, L.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G.; RAMBO, L. **Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos**. Lages: Graphel, v.1, 2010. 84p.

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

SILVA, J. C.; MEYER, M.C.; COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D. Fungitoxicidade de grupos químicos sobre *Myrothecium roridum* in vitro e sobre a mancha-de-mirotécio em algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.5, p.755-761, 2006.

STOLTE, R.E. **Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas 'in vitro'**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UPF, Passo Fundo, 2006. 103p.

SUTOYO. Resistance of corn in cultivar/lines from Indonésia and the Philippines to *Stenocarpella* leaf blight (*Stenocarpella macrospora*). In: ZAIDI, P.H.; AZRAI, M.; PIXLEY, K. **Maize for Azia: Emerging Trends and Technologies**, Makassar, 2010. p. 669.

SUTTON, B.C. The coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, England. 1980. 696p.

SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. ***Diplodia macrospora*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**. 83. London C.M.I., 1966.

TAVARES, G.M.; PAULO ESTEVÃO DE SOUZA DE, P.E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Caricapapaya l.*). **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p. , 2005.

TOLLENAAR, M. Sink-source relationships during reproductive development in maize. A review. **Maydica**, Bergamo, v.22, p.49-85, 1977.

WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. 3th Edition. Sant Paul. American Phytopathological Society. APS Press. 1999. 78p.

WORDELL FILHO, J. A. Resistência de cultivares de milho (*Zea mays L*) a antracnose foliar no estágio de plântula. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.23, n.1, p.53- 57, 2010.

WORDELL FILHO, J.A.; CASA,R.T. Doenças na cultura do milho. In: WORDELL FILHO, J.A.; ELIAS, H.T. **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis: epagri, p.207-273, 2010.

USDA In: UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. World agricultural supply and demand estimates. Disponível em: <<http://usda.gov./oce/commodity/wasde/latest.pdf>> Acesso em: 12 out. 2011.