

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

PAULO ROBERTO KUHNEM JÚNIOR

INDUÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE *Stenocarpella maydis*

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

Orientador: Ph.D. Amauri Bogo

LAGES, SC

2009

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

Kuhnem Júnior, Paulo Roberto
Indução da esporulação de *Stenocarpella maydis*. /
Paulo Roberto Kuhnem Júnior -- Lages, 2009.
58 p.

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

1. Milho. 2. Fungos – Culturas e meio de cultura. I Título.

CDD – 581.2

PAULO ROBERTO KUHNEM JÚNIOR

Graduado em Agronomia – UDESC/CAV – Lages-SC.

INDUÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE *Stenocarpella maydis*

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

Aprovado em:

Pela banca examinadora:

Homologado em:

Por

Ph.D. Amauri Bogo
Orientador - CAV/UDESC/Lages-SC

Dr. Jefferson Luis Meirelles Coimbra
Coordenador Técnico do Curso de Mestrado em
Produção Vegetal

Dr. Ricardo Trezzi Casa
Co-orientador - CAV/UDESC/Lages-SC

Dr. Paulo César Cassol
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Agrárias

Ph.D. Pedro Boff
EPAGRI/Lages-SC

Dr. Adil Knackfuss Vaz
Diretor Geral do Centro de Ciências
Agroveterinárias - CAV/UDESC/Lages-SC

Ph.D. Erlei Melo Reis
Universidade de Passo Fundo/UPF
Passo Fundo/RS

LAGES
Santa Catarina - Brasil
Fevereiro – 2009

*A minha mãe Célia Fossa, aos meus tios Ari
Antônio Dal Piva e Maria Aparecida Fossa,
pelo amor, dedicação e ensinamentos morais
que proporcionaram nesta vida e a todas as
pessoas com quem eu convivo e amo.*

Ofereço e dedico.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por nunca ter me desamparado nesta caminhada e por ter me proporcionado saúde, inteligência e discernimento.

A Universidade do Estado de Santa Catarina/UDESC e em especial ao Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV, pelo espaço cedido a realização dos experimentos, Laboratórios, equipamentos e salas de aula para estudo e aprendizado técnico científico.

Ao Programa de Monitoria de Pós-Graduação/PROMOP, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os professores do programa de Mestrado em Produção Vegetal, que contribuíram com seus conhecimentos edificantes.

Aos colegas de mestrado Ana Belani, Amauri Schmitt, João e Francini Nerbass e em especial ao amigo de todas as horas Fernando Gava, pelos momentos de estudo, trabalho e descontração vivenciados durante este período.

Aos bolsistas do Laboratório de Fitopatologia Anderson Danelli, Carlos Techio, Filipe Souza, Jonatha Bolzan e Lenita Agostinetto, pela ajuda sempre que necessário a realização dos experimentos.

A minha família, em especial a minha mãe, que é a base onde encontro apoio, dedicação e carinho para sempre crescer, e se não fosse por eles, eu não teria essa oportunidade.

Aos meus segundos pais, tia Cida e tio Dal Piva, que foram pessoas incríveis, me acolhendo como filho, pois seus ensinamentos, conhecimentos, cobranças e carinho tornaram possível este momento.

A minha namorada Vanessa, pelo amor, conforto e muitas vezes compreensão, por aceitar e acreditar na realização desse objetivo, agradeço por estar comigo neste momento de superação e alegria.

Ao professor Amauri Bogo, pela orientação e amizade.

Ao mestre Ricardo Trezzi Casa, pela dedicação, paciência e sabedoria para ensinar e orientar, pelo exemplo de profissionalismo e ética, além de ter sido um verdadeiro grande amigo ao longo desses anos de convivência e ensinamentos.

RESUMO

O fungo *Stenocarpella maydis* comumente causa podridão do colmo e da espiga em milho. Pouca informação existe sobre a resistência genética de plantas de milho à *S. maydis*. A resistência à *Stenocarpella* vem sendo investigada em diversas partes do mundo por técnicas de inoculação artificial a partir de inóculo produzido, principalmente, em fragmentos da planta de milho e grãos de sorgo e aveia. Neste caso, a quantidade de inóculo produzido é baixa, necessitando longo período de incubação para a produção de inóculo em níveis satisfatórios. Além do substrato, temperatura e luminosidade são fatores essenciais para estimular a esporulação dos fitopatógenos. O objetivo deste trabalho foi determinar um método fácil, rápido, reproduzível e de baixo custo para a indução à esporulação de *S. maydis*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, CAV/UDESC, Lages, SC, em 2008. O isolado monospórico do fungo foi obtido de grãos de milho naturalmente infectados oriundos de lavouras comerciais de município de Abelardo Luz, SC. Previamente foram realizados ensaios com 20 possíveis substratos naturais a partir de compostos de grãos, fragmentos de folhas e colmos de plantas como sorgo, trigo, aveia branca, aveia preta, centeio, cevada e milho a fim de selecionar os mais promissores. Foram descartados 13 diferentes substratos naturais que não apresentaram características desejáveis em qualquer etapa de preparação, manutenção, produção e contagem de conídios. Os 07 substratos naturais de grãos de sorgo, trigo, aveia branca, aveia preta, centeio, cevada e milho, foram submetido às temperaturas de 21, 24, 27, 30 e 33°C, em regimes de luz contínua, escuro e por período de 12 horas. Cada substrato foi embebido em 100 mL de água por 24 horas em Erlenmyers. Após a remoção do excesso de água os grãos foram esterilizados por duas autoclavagens por 20 min a 127°C. Em cada Erlenmeyer foram inseridos três discos de micélio do fungo. O material foi incubado em câmara de crescimento nas respectivas temperaturas e regimes de luz. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições. A avaliação do número de conídios por grama

de grãos e a viabilidade dos conídios foi quantificada aos 15 dias de incubação. Os dados do número de conídios/g de grãos e a viabilidade dos conídios foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos a análise de variância e comparados pelo teste de Bonferroni a 1% de significância. Posteriormente foi realizado ensaio com o melhor substrato natural com o objetivo de avaliar diferenças entre cultivares e tempo de incubação na produção e viabilidade de conídios. Muitos grãos de cereais, oleaginosas e fragmentos de milho não podem ser usados como substratos para induzir a esporulação de *S. maydis*. Os grãos de cevada, aveia preta e trigo foram os melhores para produção e viabilidade de conídios de *S. maydis*. A cevada foi o substrato natural que apresentou a maior produção de conídios. A produção de conídios e a viabilidade são influenciadas pela temperatura e fotoperíodo, sendo que *S. maydis* responde melhor a temperatura de 27 °C e fotoperíodo 12 h. Existe variação entre cultivares de cevada para número de conídios, o que não foi verificado para viabilidade de conídios. Procedimento igual foi realizado com *Stenocarpella macrospora*, no entanto não se obteve esporulação suficiente para mensuração da produção e germinação de conídios.

Palavras-chave: Conídios. Diplodia. produção de inóculo. *Zea mays*.

ABSTRACT

The fungus *Stenocarpella maydis* usually can cause corn stalk and ear rot. There is little data on the genetic resistance of maize plants to *S. maydis*. The *Stenocarpella* resistance has been investigated around the world by artificial inoculation techniques with inoculum produced mostly in fragments of maize plant and sorghum and oats grains. The amount of inoculum produced by these techniques is low, require a long period of incubation to give a satisfactory inoculum levels. Despite of the substrate, temperature and luminosity are essential factors to stimulate the pathogens sporulation. The objective of this study was to determine an easy, quick and reproducible method by relative low cost to induce the *S. maydis* sporulation. The experiments were carry out at the Plant Pathology Laboratory at the Centro de Ciências Agroveterinárias- CAV/UDESC during the years 2007/08. The *S. maydis* monosporic isolate was obtained from commercial crops naturally infected in the Aberlado Luz County, Santa Catarina State. Preliminary were carry out a experiment with 20 potentials natural substrates from grains and leaves and stalks fragments of different plants like, sorghum, wheat, white oat, black oat, rye, barley and maize , with the objective to select the most promising substrates. Were discarded 13 substrates by not present desirable features in any stage of preparation, maintenance, production and conidia amount. The remained 07 natural substrates based in grains of sorghum, wheat, white and black oat, rye, barley and maize were submitted to temperatures of 21, 24, 27, 30 and 33°C on continuous light systems and darkness by period of 12 hours Each substrate was soaked in 100 mL of water for 24 hours in Erlenmeyer. After removal of excess water, the grains were sterilized twice in autoclave by 20 min at 127°C. In each flask were added three disks of fungus mycelium. The material was incubated in growth chamber according to the different temperatures and light regimes. For each treatment three replicates were used. The assessment of the conidia number per gram of grains and conidia viability were measured at 15 days of incubation. The data of conidia number per gram of grain and conidia viability were transformed into $\sqrt{(x + 1)}$ and

subjected to analysis of variance and compared by Bonferroni test by 1% of significance. Subsequent tests were done with the best natural substrates with the objective to evaluate differences between cultivars and the incubation period on the conidia production and viability. Many cereal grains, oil seeds and crushed fragments of maize can not be used as substrates to induce *S. maydis* sporulation. The grains of barley, black oat and wheat were the best ones for *S. maydis* conidia production and viability. The barley grain was the natural substrate that showed the biggest conidia production. The conidia production and viability were influenced by temperature and photoperiod. The *S. maydis* developed better at temperature of 27°C and 12 h of photoperiod. There is conidia number variation among barley cultivars, which was not checked for viability of conidia. Same procedure was performed with *Stenocarpella macrospora*, however not obtained enough for measurement of spore production and germination of conidia.

Keywords: Conidia. Diplodia. inoculum production. *Zea mays*.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Substratos naturais utilizados no ensaio preliminar. Lages/SC, 2008..... | 35 |
| Tabela 2 - Análise de variância para número de conídios/g de substrato e viabilidade de conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> , para fotoperíodo, temperatura e substrato. Lages/SC, 2008..... | 42 |
| Tabela 3 - Número de conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> por fotoperíodo, temperatura e substrato natural. Lages/SC, 2008..... | 43 |
| Tabela 4 - Viabilidade de conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> por fotoperíodo, temperatura e substrato natural. Lages/SC, 2008..... | 43 |
| Tabela 5 - Melhor interação tripla entre substrato natural, fotoperíodo e temperatura para número de conídios/g de grãos de <i>Stenocarpella maydis</i> . Lages/SC, 2008..... | 45 |
| Tabela 6 - Melhor interação tripla entre substrato natural, fotoperíodo e temperatura para viabilidade de conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> . Lages/SC, 2008..... | 45 |
| Tabela 7 - Análise bromatológica dos substratos naturais e sua correlação com a produção de conídios. Lages/SC, 2008..... | 46 |
| Tabela 8 - Análise de variância para número de conídios de substrato de <i>Stenocarpella maydis</i> , para cultivares de cevada. Lages/SC, 2008..... | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Detalhe da formação de picnídios sobre grãos de milho plaqueados em meio de cultura de Batata Dextrose Ágar..... | 20 |
| Figura 2 - Colônia de <i>Stenocarpella maydis</i> em semente de milho plaqueada em meio de Batata Dextrose Ágar..... | 24 |
| Figura 3 - Colmo de milho naturalmente infectado apresentando cirros (A) e detalhe de cirros de <i>Stenocarpella maydis</i> (B)..... | 24 |
| Figura 4 - Trigo em flocos (A) e linho (B) com aspecto pastoso após a autoclavagem..... | 35 |
| Figura 5 - Coloração negra com aspecto de mela em grãos de feijao akuzi..... | 36 |
| Figura 6 - Detalhe de grãos de gergelim (A) e arroz (B) sem formação de picnídios e com contaminação..... | 36 |
| Figura 7 - Folha (A), grãos (B) e fragmentos de colmo (C) de milho com baixa formação de micélio e sem presença de picnídios..... | 37 |
| Figura 8 - Câmaras de crescimento (A) e detalhe do fornecimento de luz pelas lâmpadas Philips 15 W/75 (B)..... | 38 |
| Figura 9 - Erlenmeyers com volume de 250 mL de capacidade com 20 gramas de grãos cada (A), embebidos em 100 mL de água por 24 horas (B)..... | 38 |
| Figura 10 - Colônia de <i>Stenocarpella maydis</i> com 6 dias de idade (A), detalhe dos círculos de 5 mm de diâmetro (B) e repicagem dos discos para erlenmeyers após resfriamento (C)..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 11 - Tubos de ensaio contendo 20 mL de água destilada e esterilizada (solução estoque de 1.000 mL de água + 1 gota de espalhante Tween 10) + 2 g de substrato de cada erlenmeyer..... | 40 |
| Figura 12 - Germinação de conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> em placas de petri contendo ágar-água..... | 40 |
| Figura 13 - Exemplo do micélio de <i>Stenocarpella maydis</i> com coloração verde-oliva submetido na temperatura de 33°C..... | 44 |
| Figura 14 - Grãos de cevada incubados na temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 h. | 45 |
| Figura 15 - Número de conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> /g de substrato de quatro cultivares de cevado no tempo..... | 47 |
| Figura 16 - Germinação dos conídios de <i>Stenocarpella maydis</i> em grãos na média de quatro cultivares de cevada no tempo..... | 48 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 O FUNGO <i>Stenocarpella maydis</i>..... | 18 |
| 2.1 NOMES COMUNS DA DOENÇA | 18 |
| 2.2 ETIOLOGIA E TAXONOMIA..... | 18 |
| 2.3 VARIABILIDADE DE <i>Stenocarpella maydis</i> | 20 |
| 2.4 HISTÓRICO E OCORRÊNCIA..... | 21 |
| 2.5 DANOS | 22 |
| 2.6 HOSPEDEIROS | 23 |
| 2.7 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Stenocarpella maydis</i> | 23 |
| 2.7.1 Fontes de inóculo | 23 |
| 2.7.2 Disseminação | 25 |
| 2.7.3 Infecção e colonização | 26 |
| 2.7.4 Sobrevida..... | 27 |
| 2.8 CONTROLE | 28 |
| 2.8.1 Resistência genética à diplodia | 28 |
| 2.8.2 Produção de inóculo | 29 |
| 3 EFEITO DE SUBSTRATOS NATURAIS, TEMPERATURA E FOTOPERÍODO NA ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE <i>Stenocarpella maydis</i> | 31 |
| 3.1 RESUMO..... | 31 |
| 3.1.1 Abstract: Amount between natural substrate, temperature and photoperiod on <i>Stenocarpella maydis</i> conidia sporulation and viability. | 32 |
| 3.2 INTRODUÇÃO | 33 |
| 3.3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |

| | |
|---|----|
| CONCLUSÃO..... | 49 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo importante para alimentação, produção de combustível a partir do etanol e sendo de grande importância na balança comercial de vários países (CONAB, 2008)..

Na safra de 2007/08 o Brasil cultivou uma área de aproximadamente 14,7 milhões de hectares, com produção de 58,6 milhões de toneladas e produtividade média de 3.987 kg ha⁻¹, sendo o estado de Santa Catarina o sexto colocado no ranking nacional, porém a oferta é inferior a demanda (ICEPA, 2008). Nesta mesma safra, Santa Catarina cultivou uma área de aproximadamente 716 mil hectares, com produção de 4,1 milhões de toneladas e produtividade de 5.700 kg ha⁻¹ (CONAB, 2008). Na região oeste do estado concentra-se a maior parte da produção de milho, que é absorvida pela avicultura e suinocultura. Este déficit de produção é suprido por outras regiões catarinenses e pela importação de outros estados e da Argentina (ZAMPIERI & SILVA, 2005), caracterizando o estado como tradicional importador de milho.

O potencial de rendimento de grãos da cultura pode ser afetado pela fertilidade do solo, disponibilidade hídrica, população de plantas, potencial genético dos híbridos, práticas culturais, época de semeadura e por doenças, pragas e ou plantas daninhas (WHITE, 1999; FANCELI & DOURADO NETO, 2003; SANGOI et al., 2000).

A expansão da área cultivada em plantio direto proporcionou uma alteração no microclima e na biologia do agroecossistema, com reflexos nas populações dos agentes causais das doenças do milho (REIS et al., 2004). As podridões do colmo e da espiga, causada pelo fungo *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton tem sido detectadas frequentemente em lavouras de milho nas diversas regiões do Brasil (REIS et al., 2004; PEREIRA et al., 2005). *S. maydis* está amplamente distribuído onde se cultiva milho (SUTTON & WATERSTON, 1966), sendo frequente sua ocorrência no Brasil nas lavouras de monocultura (CASA et al., 2006). O gênero *Stenocarpella* comumente é detectado em grãos de milho ardidos (REIS et

al, 2004), o que pode ocasionar danos à saúde humana e animal (MARASAS et al., 1984).

A utilização de populações elevadas de plantas, aliada aos desequilíbrios nutricionais e à suscetibilidade dos genótipos, contribui para o aumento da incidência das podridões de colmo, espigas e de grãos ardidos (WHITE, 1999). A intensidade destas doenças aumenta quando se pratica a monocultura (FLETT & WEHNER 1991; REIS et al., 2004).

Como medida preferencial de controle recomenda-se o emprego de variedades resistentes a *S. maydis* (WHITE, 1999; REIS et al., 2004). No entanto, dentre as cultivares de milho disponíveis para comercialização na safra 2008/09 no Brasil, nenhuma apresenta informações sobre reação à *S. maydis* (CRUZ & PEREIRA FILHO, 2008). A resistência genética de plantas de milho à *Stenocarpella* vem sendo investigada há décadas em diversas partes do mundo (KOEHLER, 1951; PAPPELIS et al., 1973; ANDERSON & WHITE, 1994), por técnicas de inoculação em diferentes sítios de infecção e em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (FOLEY, 1960; ULLSTRUP, 1970; PEREIRA & PEREIRA, 1976; CHAMBERS, 1988; KLAPPROTH & HAWK, 1991; BIZZETTO et al., 2000).

De acordo com ULLSTRUP (1970) para diferenciação dos genótipos resistentes são necessárias técnicas adequadas de inoculação artificial e meios apropriados para multiplicação do inóculo. A composição do meio de cultura determina a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Entretanto, alguns fungos, geralmente apresentam baixa esporulação ou não esporulam em meio de cultura artificial (NAGEL, 1934). Além do meio de cultura, a temperatura e a luminosidade são fatores essenciais para estimular a esporulação dos fitopatógenos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Há pouca informação disponível na literatura sobre aspectos referentes à produção de inóculo de *S. maydis* em substratos naturais, bem como sua interação com amplitudes térmicas e regimes de luz (LATTEREL & ROSSI, 1983; BEN SCH et al., 1992; MORANT et al., 1993; CASA et al., 2006).

A produção de inóculo se faz importante para trabalhos que visam: estudar a fisiologia do parasitismo, com detalhes nas subfases do processo de infecção; a reação de cultivares; a quantificação de danos; inocular plantas de milho para gerar o gradiente da doença afim de estabelecer modelos de crescimento; quantificar a eficácia de fungicidas *in vitro* na germinação de conídios e *in vivo* por meio de inoculação nas plantas de milho explorando detalhes de modo de ação (preventiva, curativa e erradicativa) e persistência; e correlacionar intensidade de doença com dano visando a determinação de limiares de dano.

O trabalho teve como objetivo identificar um método fácil, rápido, barato e

reproduzível para indução da esporulação de *S. maydis* em substratos naturais submetidos a diferentes temperaturas e regimes de luz.

2 O FUNGO *Stenocarpella maydis*

2.1 NOMES COMUNS DA DOENÇA

No Brasil, quando os sintomas manifestam-se no colmo, a doença é conhecida como podridão do colmo causada por *Diplodia* (BALMER & PEREIRA, 1987; PEREIRA et al., 2005), podridão de *Diplodia*, podridão da base do colmo (REIS et al., 1996) e podridão de *Diplodia maydis* (FERNANDES & OLIVEIRA, 1997). Na espiga, é denominada de podridão da espiga causada por *Diplodia* (BALMER & PEREIRA, 1987, PEREIRA et al., 2005) e podridão de *diplodia* ou podridão branca da espiga (REIS et al., 1996; FERNANDES & OLIVEIRA, 1997; CASA et al., 2006).

2.2 ETIOLOGIA E TAXONOMIA

O fungo *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berkeley) Saccardo pertence ao Filo Deuteromycota, Classe Coelomycetes e Ordem Sphaeropsidales. Esta espécie apresenta no campo, em seu ciclo biológico, somente a forma anamórfica (imperfeita ou assexuada), e pode causar podridão do colmo, da espiga e grãos ardidos.

SUTTON (1980), em revisão dos "Coelomycetes", propôs que *D. maydis*, bem como a outra espécie *D. macrospora*, encontradas em colmos, sementes e folhas do milho, fossem incluídas no gênero *Stenocarpella* Syd., baseado na conidiogênese como uma característica taxonômica. Por outro lado, em 1985, na revista "Plant Disease", foi publicado uma lista de Nomes Comuns de Doenças de Plantas (COMMITTEE ON STANDARTIZATION OF COMMON NAMES FOR PLANT DISEASES, 1985), na qual o gênero *Diplodia* era preferido para identificar as espécies em discussão. Alguns pesquisadores na África do Sul (CHAMBERS, 1988; FLETT & WEHNER, 1991; BEN SCH, 1995) e nos Estados Unidos (LATTERELL & ROSSI, 1983; KLAPPROTH & HAWK, 1991; MORANT et al., 1993), adotam *Stenocarpella* para identificar as espécies *D. maydis* e *D. macrospora*. O gênero *Stenocarpella* também foi aceito em publicações da Sociedade Americana de Fitopatologia (American Phytopathological

Society - APS), como verificado na terceira edição do compêndio de doenças do milho (WHITE, 1999). Considerando as informações da literatura consultada, verifica-se que a classificação taxonômica dos agentes causais descritos nesta revisão, apresenta como base científica as descrições de SUTTON & WATERSTON (1966) e a revisão de SUTTON (1980). SUTTON (1980) justifica que características da conidiogênese levaram às espécies a serem incluídas em um gênero distinto de *Diplodia*, pois *Stenocarpella* apresenta células conidiogênicas enteroblásticas e fialídicas e, *Diplodia*, células conidiogênicas holoblásticas. Não foram encontrados na literatura informações sobre forma teleomórfica de *S. maydis*.

O fungo *Stenocarpella maydis* apresenta picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados, com coloração marrom-escura a preta, paredes grossas, diâmetro de 150-300 µm e um ostíolo protuberante papilado. Os conidióforos são usualmente ausentes. Apresentam células conidiogênicas enteroblásticas, fialídicas, cilíndricas, formadas nas células internas da parede do picnício. Os conídios são pardos-oliva a pardos, cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, medindo 15-34 x 5-8 µm, bicelulados e comumente com 1 septo (0-2) (SUTTON & WATERSTON, 1966; SUTTON, 1980).

Em meio de cultura de BSA (Batata+Sacarose+Ágar), apresenta crescimento micelial rápido, com micélio aéreo e cotonoso, cobrindo a placa de Petri de 90 mm de diâmetro em 5-6 dias. Com 10 dias as colônias das duas espécies apresentam cor branca. Aos 15 dias, a colônia de *S. maydis* apresenta cor superficial salmão-escura (CASA, 1997; REIS et al., 2004). MÁRIO & REIS (2001), verificaram que as colônias de *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle] permanecem brancas à bege 15 dias após a incubação das sementes em “Papel de filtro”, enquanto que *S. maydis*, originalmente branca, tornam-se pardo-escuras.

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 (batata + sacarose + ágar = BSA, farinha de milho e farinha de aveia) (Figura 1) e em pedaços de folha de milho superficialmente embebidos nestes meios agarizados (LATTERELL & ROSSI, 1983; CASA et al., 1998a). *S. maydis* também pode produzir picnício quando o micélio do fungo entra em contato com a parede de placas de Petri ou caixas de acrílico do tipo gerbox.



Figura 1 - Detalhe da formação de picnídios sobre grãos de milho plaqueados em meio de cultura de Batata Dextrose Ágar.

2.3 VARIABILIDADE DE *Stenocarpella maydis*

Na literatura consultada não há relato da presença de raças de *S. maydis*. Sabe-se, no entanto, na existência de variação no grau de agressividade entre diferentes isolados do patógeno. HOPPE (1936) estudando o antagonismo entre as espécies de *Stenocarpella* a partir de 21 isolados de *S. maydis* e de quatro isolados de *S. macrospora*, verificou que, em inoculações feitas em espigas com diferentes combinações entre três isolados de *S. maydis* e um de *S. macrospora*, havia uma ação antagônica entre eles, uma vez que, em isolamentos realizados após o apodrecimento das espigas inoculadas, apenas um dos isolados foi recuperado. A reação antagônica inter e intraespecífica de *S. maydis* e *S. macrospora* pode ser visível pelo escurecimento do micélio e do meio de cultura quando as hifas de cada colônia juntam-se quando os fungos são cultivados em meio agarizado (HOPPE, 1936). CASA et al. (1998a) também detectaram o antagonismo inter e intraespecífico em colônias desenvolvidas em meio de BSA em análise de patologia de sementes com material incubado a 25°C e fotoperíodo de 12 h, durante 10 a 12 dias.

LATTERELL & ROSSI (1983) comparando a patogenicidade dos fungos, verificaram que *S. macrospora* é mais agressivo do que *S. maydis* durante os estádios iniciais de desenvolvimento da planta. RHEEDER et al. (1990), relataram uma associação negativa entre as espécies crescendo na mesma placa de petri, sendo que *S. macrospora* restringiu o crescimento de *S. maydis* em plântula.

Estudo de DORRANCE et al. (1999) comparando 46 isolados de *S. maydis* oriundo de empresas de milho e de laboratórios fitopatologia dos Estados Unidos e da África do Sul, demonstraram baixo nível de polimorfismo de isoenzimas, com pequena variação para 10 enzimas avaliadas, sendo detectadas α -esterase, hexose quinase e malato dehidrogenase (DORRANCE et al., 1999). Os autores esperavam maior variação em função da agressividade do patógeno. A especialização do fungo ao hospedeiro é uma das justificativas para limitada variação em izoenzimas.

2.4 HISTÓRICO E OCORRÊNCIA

O fungo *S. maydis* foi descrito pela primeira vez em 1884 (SACCARDO, 1944) nos Estados Unidos, e desde então foi relatado nos cinco continentes (SUTTON & WATERSTON, 1966).

A freqüência de detecção da espécie *S. maydis* em colmos de milho no estado da Flórida, Estados Unidos, foi de 80,3% (EDDINS, 1930), sendo que alguns colmos apresentaram os picnídios de duas espécies, e em poucos casos, a presença das três espécies. KOEHLER & BOEWE (1957) examinando colmos de milho infectados durante os anos de 1946, 47 e 48, no estado de Illinois, Estados Unidos, verificaram porcentagem média de infecção de 31% para *S. maydis* e 25,8% para *Gibberella zae* (Schw.) Petch. Em 1959, também no estado de Illinois, HOOKER & WHITE (1976), relataram que *S. maydis* foi encontrado em 86,3% das lavouras avaliadas, mas em 1975, somente 5,0% de lavouras apresentavam o patógeno. O declínio de *S. maydis* foi atribuído à especificidade do fungo ao hospedeiro e ao desenvolvimento de cultivares superiores do ponto de vista de resistência genética, pelos programas de melhoramento genético. No entanto, ANDERSON & WHITE (1987), relataram aumento da incidência de *S. maydis* causando podridão do colmo, com valores de 38,5% e 11,1% das lavouras amostradas, respectivamente nos anos de 1982 e 1983.

No Brasil, apesar da existência de inúmeros trabalhos sobre *S. maydis*, a prova de patogenicidade e a mensuração das estruturas reprodutivas foram realizadas na década de 90 (CASA, 1997). Em testes de patologia de sementes de milho, *S. maydis* foi a espécie com maior freqüência de detecção (OLIVEIRA & MELLO, 1986; REIS et al., 1995; PINTO, 1998). Hoje, o fungo *S. maydis* é detectado com freqüência em sementes, fato atribuído ao aumento na ocorrência e intensidade da doença nas lavouras da Região Sul do Brasil (CASA et al., 2000). DENTI & REIS (2003) avaliando o efeito da monocultura e da rotação de culturas na incidência

e nos danos causados pelas podridões do colmo relataram que *S. maydis* e *S. macrospora* foram, na ordem de incidência, o segundo e o quarto fungo isolado das plantas sintomáticas.

Em Santa Catarina a oferta de milho é inferior a demanda (ICEPA, 2008). Na região oeste do estado concentra-se a maior parte da produção de milho, que é absorvida pela avicultura e suinocultura (ZAMPIERI & SILVA, 2005). A prática de semeadura direta do milho em monocultura representa uma atividade muito adotada entre os pequenos e médios produtores do estado de Santa Catarina (RIBEIRO et al., 2005). O cultivo do milho em semeadura direta sob monocultura favorece a sobrevivência e multiplicação do inóculo dos fungos necrotróficos (ZAMBOLIM et al., 2000; DENTI & REIS, 2001). Trabalhos relatando podridões de colmo, espiga e grãos ardidos em milho no estado de Santa Catarina são freqüentemente encontrados na literatura (CASA et al., 2005b; RIBEIRO et al., 2005; KUHNEM JÚNIOR et al., 2007a; KUHNEM JÚNIOR et al., 2007b; CASA et al., 2007a). CASA et al. (2007a) estudando o efeito do adensamento de plantas de milho na incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos no município de Lages, SC, determinaram que *Stenocarpella* sp., junto com *Fusarium graminearum*, foram os fungos mais freqüentes em podridões do colmo independente das densidades de semeadura, nos dois anos avaliados.

2.5 DANOS

Na Região Sul do Brasil, os fungos *S. maydis* estão relacionados com a germinação de sementes, emergência e estabelecimento de plântulas, podridões do colmo e da espiga e mancha foliar (CASA et al., 2000; REIS & CASA, 2001). O efeito negativo sobre a germinação de sementes indica que os fungos atacam e matam o embrião (CLAYTON, 1927; CASA, 1997).

As podridões do colmo podem ser consideradas as doenças mais importantes na cultura do milho, ocorrem em todas as lavouras, todas as safras de cultivo, com incidência e severidade variada (REIS et al., 2004; PEREIRA et al., 2005). Nos Estados Unidos, SHURTLEFF (1992), relatou danos de 10 a 20%. No Brasil, NAZARENO (1989), detectou incidência de 15 a 85% e reduções no rendimento de grãos de 12 a 40%. Posteriormente, DENTI & REIS (2003) determinaram incidências de 4 a 72% com reduções no rendimento variando de 0,67 a 50%. A podridão do colmo interfere no desenvolvimento normal da planta, afetando suas funções, ocasionando quebra da base do colmo, acamamento e morte prematura da planta (SHURTLEFF, 1992; REIS et al., 2004). Durante três anos, MICHAELSON & CHRISTENSEN (1953)

determinaram redução no rendimento grãos devido à podridão do colmo, chegando a danos de 9,7% causado por *S. maydis*. Redução de 5% no rendimento de grãos foi obtido a partir de inoculações no colmo com *S. maydis* (SINGH & SHARMA, 1974; NATTI & WHITE, 1981).

A podridão branca da espiga pode causar redução na produtividade e na qualidade dos grãos colhidos. Muitos fungos causadores de podridão da espiga produzem micotoxinas que podem afetar também o valor econômico do grão e o valor nutricional da ração (MOLIN & VALENTINI, 1999). SHURTLEFF (1992) e WHITE (1999) não mencionam *Stenocarpella* como produtor de micotoxinas. No entanto, CUTLER et al. (1980) relatam uma toxina denominada diplodiol, enquanto que WILLIAMS et al. (1992) descrevem a ocorrência de uma doença chamada diplodiose em patos jovens, ratos, bovinos e ovelhas e causada por uma toxina ainda não identificada que é produzida por *S. maydis*.

Apesar de existir informações sobre redução de rendimento de grãos causados por podridões do colmo, no Brasil os danos e as perdas causadas exclusivamente por *S. maydis* ainda não foram quantificados.

2.6 HOSPEDEIROS

As duas espécies identificadas como *S. maydis* e *S. macrospora* parasitam plantas de milho (SUTTON & WATERSTON, 1964; WHITE, 1999). A espécie *S. maydis* também foi encontrada em bambú (*Arundinaria* sp.) (SUTTON & WATERSTON, 1966; SUTTON, 1980). Na literatura nacional a maior parte dos trabalhos não menciona os hospedeiros para essas duas espécies, assumindo que o milho é considerado o único hospedeiro (COSTA NETO, 1976; PINTO et al., 1997; FERNANDES et al., 1997; REIS et al., 2004; PEREIRA et al., 2005).

2.7 CICLO BIOLÓGICO DE *Stenocarpella maydis*

2.7.1 Fontes de inóculo

O fungo *S. maydis* é agente necrotrófico, apresenta fase parasitária na planta viva e fase saprofítica nos restos culturais. É encontrado sobrevivendo como micélio em sementes (Figura 2) (McGEE, 1988; CASA et al., 1998a, RHEEDER et al., 1990) e formando picnídios nos restos culturais (Figura 3) (SMITH & WHITE, 1988; SHURTLEFF, 1992).



Figura 2 - Colônia de *Stenocarpella maydis* em meio de BDA oriundas de semente de milho.

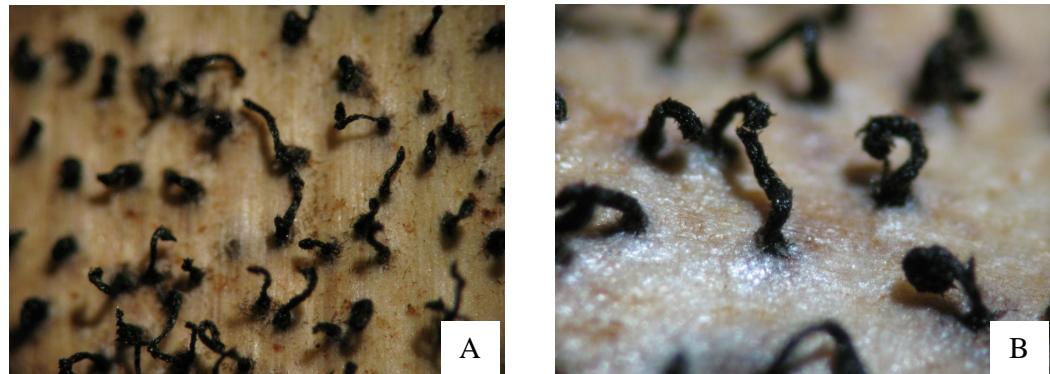


Figura 3 - Colmo de milho naturalmente infectado apresentando cirros (A) e detalhe dos cirros de *Stenocarpella maydis* (B).

As sementes infectadas constituem-se em fonte de inóculo primário para podridão de semente, morte de plântulas e podridão de raízes. O fungo *S. maydis* pode ser transmitido à plântula (McNEW, 1937; McGEE, 1988). No entanto, a taxa de transmissão desse fungo ainda não foi quantificada. A transmissão é fundamental em lavouras onde o milho nunca foi semeado ou em áreas de rotação de culturas, pois indica o potencial de inóculo da semente no desenvolvimento inicial de epidemias (REIS et al, 2004). O processo de transmissão de *S. maydis* ocorre com o micélio do fungo colonizando o sistema radicular e a base do colmo. A passagem do fungo da semente, via mesocótilo, alcançando a coroa, raízes e finalmente a base do colmo, é um processo lento que quase coincide com o ciclo da cultura (CASA et al., 1998b).

Os restos culturais de milho infectados por *S. maydis* que permanecem na superfície do solo, de uma estação de cultivo para a outra, são considerados a principal fonte de inóculo

primário para as podridões do colmo e da espiga e para mancha foliar (FLETT et al., 1992; CASA et al., 2004). Durante os anos de 1962 e 1963, em Indiana, Estados Unidos, verificou-se a ocorrência de duas epifitias da podridão branca da espiga do milho, causada por *S. maydis*, limitadas em extensão com uma redução na intensidade da doença a partir da fonte de inóculo, constituída de palha infectada dos anos anteriores (ULLSTRUP, 1964). Na África do Sul, uma relação linear positiva entre a incidência da podridão branca da espiga e a quantidade de resíduo na superfície do solo foi relatada por FLETT et al. (1998).

As maiores intensidades da podridão do colmo e da espiga ocorrem nas situações onde as plantas se encontram próximas da fonte de inóculo (ULLSTRUP, 1964; FLETT et al., 1992. Incidência de 49 a 61% de podridão da espiga, causada por *S. maydis*, foi detectada em lavoura localizada ao lado da fonte de inóculo, sendo que a incidência baixou para menos de 1% em lavouras localizadas a 16 m da fonte de inóculo. DEL RIO & MELARA (1991) relataram redução de 80% na incidência de podridão da espiga, causada por *S. maydis*, em plantas distantes 20 m da fonte de inóculo constituída por palha infectada. MÁRIO et al. (1998) demonstraram que o inóculo de *S. maydis* e *S. macrospora* produzido nos restos culturais sobre o solo e dispersado pelo vento, relaciona-se com a incidência dos fungos na semente colhida.

Uma possível fonte de inóculo alternativa seria os hospedeiros secundários. Entretanto, segundo a literatura consultada, somente as plantas de bambú seriam parasitadas por *S. maydis*. Como a população dessa planta é muito restrita, limitando-se a pequenos bosques em determinadas regiões, provavelmente essas têm pouca importância como fonte de inóculo.

NEMEC (1992) e SCOTT (1993) consideram *S. maydis* e *S. macrospora* como fungos de solo, tendo como critério a sobrevivência saprofítica nos restos culturais. Esses autores não consideram a necessidade de estruturas especiais de repouso ou a probabilidade de sobreviverem como conídios livres, como critério para incluir as duas espécies como fungo de solo.

2.7.2 Disseminação

A semente infectada é um dos principais veículos de disseminação de *S. maydis*, sendo responsável pela introdução do fungo em novas áreas de cultivo, mesmo distantes de seu local de produção, como detectado pelo serviço de quarentena do Japão em sementes importadas dos Estados Unidos (DAI et al., 1987). MACDONALD & CHAPMAN (1997), em testes de sanidade de sementes de diferentes países, detectaram com freqüência a presença do fungo *S. maydis*.

A dispersão vertical e horizontal dos conídios de *S. maydis* a partir dos restos culturais naturalmente infectados foi recentemente relatada por CASA et al. (2004). Os dados demonstraram que mais de 60% dos conídios de *S. maydis* foram coletados até altura de 25 cm. Esses valores ajudam a compreender porque as podridões causadas por *Stenocarpella* em milho apresentam sintomas freqüentes e típicos na base do colmo, normalmente no primeiro e segundo entrenó. Os conídios de *S. maydis* capturados acima de 50 cm de altura possivelmente são responsáveis por uma das vias de inoculação dos fungos nas espigas. MÁRIO et al. (1998) determinaram que os esporos produzidos nos restos culturais foram responsáveis pela infecção de grãos de milho no campo.

2.7.3 Infecção e colonização

A podridão da base do colmo pode ter origem com a infecção nos órgãos abaixo do nível do solo, a partir do inóculo presente nas sementes infectadas (McNEW, 1937) ou nas raízes infectadas (CRAIG & HOOKER, 1961). De modo geral, o processo mais freqüente de infecção dos colmos, ocorre com inóculo proveniente dos resíduos culturais. A velocidade de colonização de *S. maydis* em colmos inoculados é maior uma a três semanas após a antese (HOOKER, 1957), sendo inibida em tecidos com células vivas (PAPPELIS & SMITH, 1963), predominantes nos entrenós dos colmos antes da floração. CHAMBERS (1988) demonstrou não haver diferença significativa entre a podridão medular do colmo com inoculações na metade do período de polinização e 18 dias após. Segundo LATTERELL & ROSSI (1983), a infecção na espiga por *S. maydis* é maior algumas semanas após a polinização.

Normalmente a infecção da espiga ocorre a partir de esporos disseminados pelo vento, que ao germinarem na presença de água sobre o tecido do hospedeiro, emitem o tubo germinativo, penetrando diretamente a palha da espiga (SHURTLEFF et al., 1976; BENSCH, 1995). BENSCH et al. (1992) determinaram que suspensão de conídios de *S. maydis* inoculada no colmo atrás da espiga, no período de polinização, resulta na maior incidência da podridão da espiga. Por outro lado, KLAPPROTH & HAWK (1991), obtiveram maior intensidade de infecção com injeção da suspensão de esporos de *S. maydis* dentro da espiga. Posteriormente, BENSCH (1995) determinou que a colonização do fungo na base da espiga, com posterior ramificação do micélio para a ponta da mesma, ocorreu pela inoculação dos conídios de *S. maydis* entre a bainha foliar e o colmo. A infecção natural ocorre principalmente no período de duas a três semanas após a polinização, com clima úmido e temperatura de 28-30 °C

(SHURTLEFF, 1992).

A germinação dos conídios de *S. maydis* sobre os tecidos do colmo e da bainha foliar ocorreu após 5 h de incubação a 30°C (BENSCH et al., 1992), com penetração e colonização da hifa do fungo inter e intracelular. A colonização foi acompanhada pela degeneração das paredes da célula, demonstrando haver atividade de enzimas.

O alto nível de N e baixo de K, a alta densidade de plantas e a redução da área foliar devido a outras doenças, o granizo ou danos por insetos, podem também predispor as plantas à infecção de *Stenocarpella* (DODD, 1980; SMITH & WHITE, 1988).

O efeito da temperatura e do período luminoso no crescimento do micélio e germinação de esporos de *S. macrospora* e *S. maydis* foi determinado em meio de batatasacarose-ágar e ágar-água sob condições controladas (CASA et al., 2007). No entanto, não foi encontrado na literatura dados sobre substratos naturais, temperatura e luminosidade ideal para induzir a esporulação de *S. maydis*.

2.7.4 Sobrevida

O fungo *S. maydis* sobrevive principalmente na forma de micélio no endosperma e no embrião das sementes de milho. CASA et al. (1998a) relataram uma freqüência média de 18,5 e 21,4% de *Stenocarpella* spp. em sementes de milho produzidas em lavouras do sul e do sudeste do Brasil, safra 94/95 e 95/96, respectivamente, tratadas comercialmente com fungicidas.

O fungo *S. maydis* também sobrevive saprofíticamente na resteva de milho, colonizando os tecidos celulares e formando picnídios subepidérmicos. No sistema plantio direto os restos culturais do milho são deixados na sua totalidade sobre a superfície do solo. O posicionamento da palha sobre o solo torna sua decomposição mais lenta, o que aumenta o período de sobrevida dos patógenos necrotróficos, durante a fase saprofítica (CASA, 2000; CASA et al., 2003). Dessa maneira, o inóculo encontra-se num posicionamento ideal para esporulação, liberação e dispersão (CASA, 2000). Por isso, a intensidade de diplodia no sistema plantio direto é maior sob monocultura (MORA & MORENO, 1984; FLETT & WEHNER, 1991). O desenvolvimento e o período de sobrevida de picnídios de *S. maydis* são maiores nos restos culturais na superfície do solo (FLETT et al., 1992). Esses autores verificaram 11 meses após a colheita a produção de 90,6 e 37,9 picnídios/cm² 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 uma viabilidade de *S. maydis* superior a 90% em colmos de

milho mantidos na superfície do solo até 320 dias de exposição no campo.

Pouco se conhece a respeito da possibilidade de *S. maydis* sobreviver como conídios ou clamidiosporos livres no solo. CRAIG & HOOKER (1961) infestaram o solo com *S. maydis*, em casa-de-vegetação, e observaram em estudo histológico que a infecção do colmo pode se processar a partir de raízes infectadas, pelo inóculo presente no solo. CASA (1997) observou a morte de plantas e sintomas de podridão radicular 21 dias após a infestação do solo com conídios de *S. maydis* e *S. macrospora*. Nesse caso, utilizou-se solo autoclavado, com semeadura do milho logo após a adição do inóculo no solo, demonstrando a capacidade dos conídios presentes livres no solo em parasitar as plântulas. No entanto, não se conseguiu posteriormente determinar a densidade de inóculo no solo e a viabilidade dos conídios após a retirada das plantas, demonstrando a necessidade de mais estudos para esclarecer a possibilidade dos conídios livres no solo constituírem-se em fonte de inóculo.

2.8 CONTROLE

O controle integrado de *S. maydis* tem preconizado o uso de sementes sadias, tratamento de sementes (CASA et al., 1998b), rotação de culturas (FLETT & MCLAREN, 2001), utilização adequada da população de plantas (DENTI & REIS, 2001; TRENTO et al., 2002) e equilíbrio nutricional, principalmente excesso de nitrogênio e baixos níveis de potássio (WHITE, 1999).

O uso de variedades resistentes para podridões do colmo e espiga tem sido estudado pelas empresas produtoras de sementes por ser medida eficiente de controle (WHITE, 1999; REIS et al., 2004).

2.8.1 Resistência genética à diplodia

A resistência genética de plantas de milho a *Stenocarpella* vem sendo investigada há décadas em diversas partes do mundo (KOEHLER, 1951; PAPPELIS et al., 1973; ANDERSON & WHITE, 1994), principalmente por técnicas de inoculação em diferentes sítios de infecção e em diferentes estádios de desenvolvimento da planta (FOLEY, 1960; ULLSTRUP, 1970; PEREIRA & PEREIRA, 1976; CHAMBERS, 1988; KLAPPROTH & HAWK, 1991; BIZZETTO et al., 2000), o que tem esclarecido, em parte, os processos de infecção, colonização e expressão dos sintomas em diversas variedades, apesar da dificuldade de repetibilidade do grau

de resistência (FLETT & MCLAREN, 1994; VAN RENSBURG & FERREIRA, 1997).

A redução do nível de açúcar no colmo das plantas de milho determina a senescência destes, que é indicada pela diminuição da densidade da medula. As plantas com tecido senescedo estão mais predispostas aos agentes causais das podridões do colmo (CRAIG & HOOKER, 1961), sendo que, aparentemente, a síntese celular de substâncias de resistência diminui (BE MILLER & PAPPELIS, 1965). DODD (1980), também relata que a senescência ou a morte celular dos tecidos precede à podridão do colmo. No caso de espigas, KOEHLER (1951), relacionou a resistência à podridão com o bom empalhamento da espiga.

No Brasil, os híbridos comerciais de milho têm sido classificados quanto a sua resistência às podridões do colmo e da espiga, e em algumas situações em relação à incidência de grãos ardidos (DENTI *et al.*, 2002; CASA *et al.*, 2005a; CASA *et al.*, 2005b; RIBEIRO *et al.*, 2005; KUHNEM JÚNIOR *et al.*, 2007a; KUHNEM JÚNIOR *et al.*, 2007b; CASA *et al.*, 2007a). Entretanto, não existe uma descrição clara da reação dos materiais genéticos especificamente para cada patógeno. Até o momento desta revisão, existem 302 cultivares de milho disponíveis para comercialização na safra 2008/09 no Brasil (CRUZ & PEREIRA FILHO, 2008), no entanto, nenhuma apresenta informação sobre reação a *Stenocarpella*. No caso de podridão da espiga, o híbrido X 9403 apresentou menor incidência de *S. maydis*, quando comparado com os híbridos P3041, C808, C901, XL212 e Ag9012 (MÁRIO & REIS, 2003).

2.8.2 Produção de inóculo

Para produção de inóculo de fungos visando trabalhos de inoculação e determinação da reação de suscetibilidade à patógenos, podem ser empregados meios contendo soluções e substâncias nutritivas necessárias ao seu desenvolvimento e reprodução (ZAUZA *et al.*, 2007). Espécies do gênero *Stenocarpella* caracterizam-se pelo rápido crescimento micelial e pela reduzida esporulação em meios de cultura (WHITE, 1999).

Meios de cultura como BDA (batata + dextrose + ágar) (MORANT *et al.*, 1993), BSA (batata + sacarose + ágar) (CASA *et al.*, 2007), FAA (farinha de aveia + ágar) (JONG & EDWARDS, 1991) e extrato de malte-levedura + ágar (BIZZETTO *et al.*, 2000) são comumente utilizados para produção micelial de *Stenocarpella*, porém com baixas esporulações. MORANT *et al.* (1993) recomenda a adição de biotina para estimular a esporulação de *S. macrospora*.

Diversos substratos naturais são citados na literatura a fim de promover à esporulação

de fungos para trabalhos que utilizam inoculação artificial. Entre eles, destacam-se grãos de aveia, arroz, centeio, milho, soja e sorgo (MELGAR & ROY, 1994; DHINGRA & SINCLAIR, 1995; HARTMAN *et al.*, 1997; TOLEDO *et al.*, 2004; KLINGELFUSS *et al.*, 2007). No caso de *Stenocarpella* os substratos mais utilizados são colmos de milho (CASA *et al.*, 2007), grãos de sorgo (ULSTRUP, 1970) e grãos de aveia (MORANT *et al.*, 1993). Mesmo assim, nestes casos a quantidade de inóculo produzida é baixa e um longo tempo é demandado para sua produção em níveis satisfatórios.

Além do meio de cultura, a temperatura e a luminosidade são fatores essenciais para estimular a esporulação dos fitopatógenos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Segundo GRIFFIN (1994) a temperatura influência a produção de proteínas e enzimas responsáveis pela manutenção da célula fúngica. A luminosidade exerce efeito sobre a célula fúngica, induzindo ou inibindo a formação de estruturas de reprodução, embora haja algumas espécies que são indiferentes à quantidade ou qualidade da luz (HAWKER, 1957).

3 EFEITO DE SUBSTRATOS NATURAIS, TEMPERATURA E FOTOPERÍODO NA ESPORULAÇÃO E VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE *Stenocarpella maydis*

3.1 RESUMO

A podridão da base do colmo e a podridão branca da espiga do milho causada pelo fungo *Stenocarpella maydis* é freqüente na região sul do Brasil em áreas de monocultivo. Há pouca informação sobre aspectos da fisiologia, às amplitudes térmicas e aos regimes de luz favoráveis à esporulação do fungo sobre substrato natural. O objetivo deste trabalho foi determinar método fácil, rápido, reproduzível e de baixo custo para induzir a esporulação de *S. maydis*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina CAV/UDESC, Lages, SC, em 2008. O isolado monospórico do fungo *S. maydis* foi obtido de grãos de milho naturalmente infectados oriundos de Abelardo Luz, SC. Os substratos naturais testados foram grãos de sorgo, trigo, aveia branca, aveia preta, centeio, cevada e milho. Submetido às temperaturas de 21, 24, 27, 30 e 33°C, em regimes de luz contínua, escuro total e fotoperíodo de 12 horas. Cada substrato (20 g de grãos) foi embebido em 100 mL de água por 24 horas em erlenmyers. Após a remoção do excesso de água os grãos foram submetidos à esterilização por meio de duas autoclavagens, com intervalo de 24 horas entre cada processo. Em cada erlenmeyer foram inseridos três discos de micélio do fungo. O material foi incubado em câmara de crescimento nas respectivas temperaturas e regimes de luz. Para cada tratamento foram utilizadas três repetições. A avaliação do número conídios por grama de grãos e a viabilidade dos conídios foi quantificada aos 15 dias de incubação. Posteriormente foi realizado um ensaio com o melhor substrato a fim de avaliar diferenças entre cultivares e tempo de incubação na produção e viabilidade de conídios. Os grãos de cevada, aveia preta e trigo foram os melhores para produção de conídios. O substrato a base de grãos de cevada apresentou a maior produção, com 67.600 conídios/g de grãos na temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12 h. Existe variação entre cultivares de cevada para número de conídios, no

entanto não foi verificada para viabilidade de conídios.

Palavras-chave: Conídios. Diplodia. produção de inóculo. *Zea mays*.

3.1.1 Abstract: Amount between natural substrate, temperature and photoperiod on *Stenocarpella maydis* conidia sporulation and viability.

The corn stalk rot caused by the fungus *Stenocarpella maydis* is frequent in areas of monoculture in South Brazil. There is little information on physiological aspects and favorable temperature and light ranges on the fungus sporulation in natural substrates. The objective of this study was to determine an easy, quick and reproducible method by relative low cost to induce the *S. maydis* sporulation. The experiments were carry out at the Plant Pathology Laboratory in the Centro de Ciências Agroveterinárias- CAV/UDESC, during the years 2007/08. The *S. maydis* monosporic isolate was obtained from commercial crops naturally infected in the Aberlado Luz County, Santa Catarina State. The natural substrates composed by grains of sorghum, wheat, white and black oat, rye, barley and maize were submitted to temperatures of 21, 24, 27, 30 and 33°C on continuous light systems and darkness by period of 12 hours. Each substrate (20 g of grain) was soaked in 100 mL of water for 24 hours in Erlenmeyer. After removal of excess water, the grains were sterilized twice in autoclave by 20 min at 127°C. In each flask were added three disks of fungus mycelium. The material was incubated in growth chamber according to the different temperatures and light regimes. For each treatment three replicates were used. The assessment of the conidia number per gram of grains and conidia viability were measured at 15 days of incubation. Subsequent tests were done with the best natural substrates with the objective to evaluate differences between cultivars and the incubation period on the conidia production and viability. The grains of barley, black oat and wheat were the best ones for *S. maydis* conidia production and viability. The barley grain substrate presented the highest conidia production with 67,600 conidia/g of grains at the temperature of 27°C and 12 h of photoperiod. There is conidia amount variation among barley cultivars, which was not checked for viability of conidia.

Keywords: Conidia. Diplodia. inoculum production. *Zea mays*.

3.2 INTRODUÇÃO

O fungo *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berkeley) Saccardo causa podridão do colmo e espiga em milho (WHITE, 1999). A qualidade dos grãos é alterada direta ou indiretamente quando são infectados podendo produzir micotoxinas, que ocasionam danos à saúde humana e animal (MARASAS *et al.*, 1984).

No Brasil, a ocorrência de *S. maydis* causando podridão da base do colmo ou podridão branca da espiga é freqüente nas lavouras de milho conduzidas em área de sistema plantio direto sob monocultura (REIS *et al.*, 2004; CASA *et al.*, 2006).

Em Santa Catarina a oferta de milho é inferior a demanda (ICEPA, 2008). Na região oeste do estado concentra-se a maior parte da produção de milho, que é absorvida pela avicultura e suinocultura (ZAMPIERI & SILVA, 2005). A prática de semeadura direta do milho em monocultura representa uma atividade muito adotada entre os pequenos e médios produtores do estado de Santa Catarina (RIBEIRO *et al.*, 2005). A ocorrência de podridões de colmo, espiga e grãos ardidos em milho, incluindo a presença de *S. maydis*, vem sendo monitorada com freqüência no estado de Santa Catarina (CASA *et al.*, 2005b; RIBEIRO *et al.*, 2005; KUHNEM JÚNIOR *et al.*, 2007a; KUHNEM JÚNIOR *et al.*, 2007b; CASA *et al.*, 2007a).

O uso de variedades resistentes para podridões do colmo e espiga tem sido estudado pelas empresas produtoras de sementes por ser medida eficiente de controle (WHITE, 1999; REIS *et al.*, 2004). No entanto, no Brasil, não há informação específica sobre a reação de variedades de milho disponíveis para safra 2008/09 quanto à suscetibilidade à *S. maydis* (CRUZ & PEREIRA FILHO, 2008).

Genótipos de milho são periodicamente avaliados visando obter materiais com níveis de resistência à *S. maydis*. A seleção pode ser feita em condições naturais de campo (KOEHLER, 1951; PAPPELIS *et al.*, 1973; ANDERSON & WHITE, 1994; MÁRIO *et al.*, 2002) ou inoculação artificial (BENSCH *et al.*, 1992; BENSCH & VAN STADEN, 1992; BIZZETTO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005). A seleção de variedades de milho resistentes em programas de melhoramento genético, onde se utiliza métodos de inoculação artificial, demanda grande quantidade de inóculo, fazendo-se necessário otimizar a produção massal de conídios (ULLSTRUP, 1970).

Diversos substratos naturais são citados na literatura a fim de promover à esporulação de fungos para trabalhos que utilizam inoculação artificial. Entre eles, destacam-se grãos de aveia, arroz, centeio, milho, soja e sorgo (PEREIRA & PEREIRA, 1976; BENSCH & VAN

STADEN, 1992; MELGAR & ROY, 1994; HARTMAN et al., 1997; TOLEDO et al., 2004; KLINGELFUSS et al., 2007). Além do substrato, a temperatura e a luminosidade são fatores essenciais para estimular a esporulação dos fitopatógenos (DHINGRA & SINCLAIR, 1995).

Como *S. maydis* apresenta baixa e lenta esporulação em meios agarizados, resultando em baixa concentração de inóculo, esse trabalho objetivou avaliar o efeito de substratos naturais em diferentes temperaturas e fotoperíodos sobre a produção e a viabilidade de conídios de *S. maydis*.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, CAV/UDESC, Lages, SC, durante os anos de 2007 e 2008.

O isolado monospórico de *S. maydis* foi obtido de sementes de milho naturalmente infectadas, coletadas em lavoura comercial na região de Abelardo Luz, SC, e encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do CAV/UDESC.

Previamente foi realizado um ensaio com 20 substratos naturais, compostos de grãos, fragmentos de folhas e colmos, afim de selecionar os mais promissores (Tabela 1). O processo foi repetido duas vezes.

Foram descartados os substratos naturais que não apresentaram características desejáveis em qualquer etapa de preparação, manutenção, produção e contagem de conídios. Os grãos de linho e o trigo em flocos após autoclavados apresentaram aspecto pastoso (Figura 4) de difícil separação sob agitação. Os grãos de feijão azuki, de canola e de grão de bico apresentaram uma substância de coloração amarelo-negra (Figura 5), com aspecto de mel e baixa produção micelial sem formação de picnídios. Os três tipos de grãos de arroz e os grãos de gergelim apresentaram baixa produção de micélio e contaminação em todas as repetições (Figura 6). Os grãos de milho crioulos I e II e os fragmentos de colmos e folhas de milho não apresentaram formação de micélio e picnídios (Figura 7).

Tabela 1 - Substratos naturais utilizados no ensaio preliminar. Lages/SC, 2008.

| Substrato Natural | |
|--------------------------|----------------------|
| 1. Arroz Branco | 11. Folha de Milho |
| 2. Arroz Integral Feijão | 12. Gergilim |
| 3. Arroz Parboilizado | 13. Grão de Bico |
| 4. Aveia Branca | 14. Linho |
| 5. Aveia Preta | 15. Milho Amarelo |
| 6. Canola | 16. Milho Crioulo I |
| 7. Centeio | 17. Milho Crioulo II |
| 8. Cevada | 18. Sorgo |
| 9. Colmo de Milho | 19. Trigo |
| 10. Feijão Azuki | 20. Trigo em Flocos |

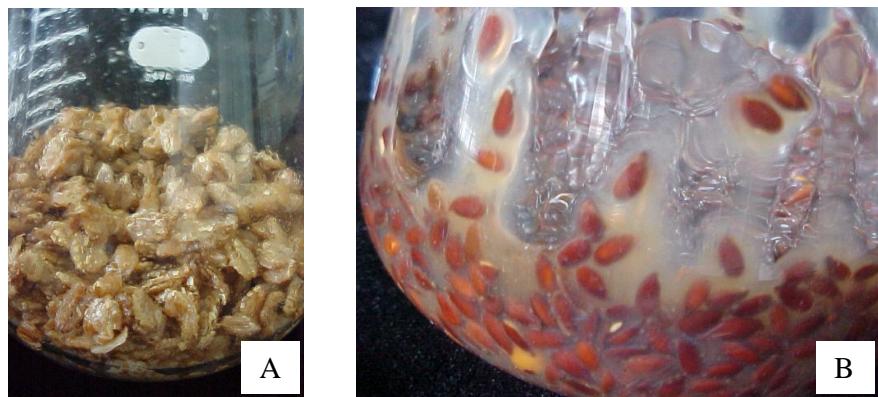


Figura 4 - Trigo em flocos (A) e linho (B) com aspecto pastoso após a autoclavagem.



Figura 5 - Coloração negra, de aspecto de mela em grãos de feijao akuzi.

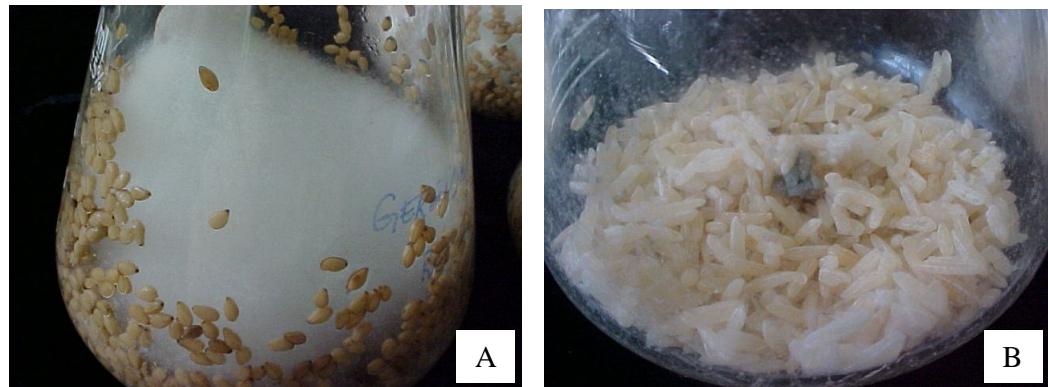


Figura 6 - Detalhe de grãos de gergilim (A) e arroz (B) sem formação de picnídios e com contaminação.

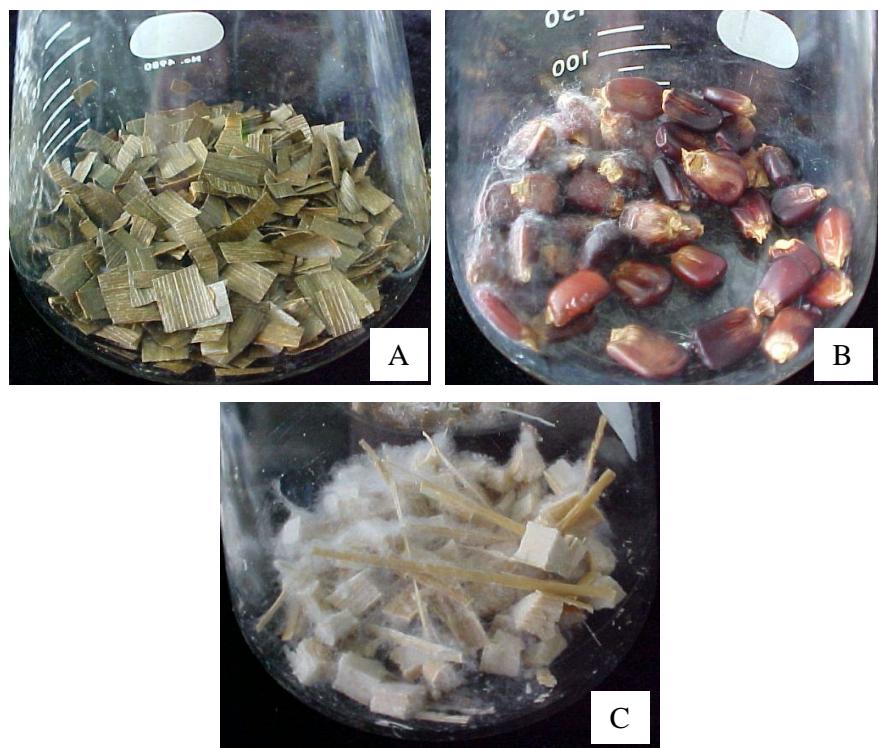


Figura 7 - Folhas (A), grãos (B) e colmo (C) de milho com baixa formação de micélio e sem presença de picnídios.

Ensaio I: Grãos de cereais, temperaturas e fotoperíodos sobre esporulação e germinação de conídios *Stenocarpella maydis*

Foi conduzido experimento fatorial incluindo sete substratos naturais selecionados previamente, cinco temperaturas e três fotoperíodos, com quatro repetições no delineamento inteiramente causalizado, avalindo o número de conídios/g de substrato e a viabilidade dos conídios aos 15 dias de incubação.

Foram utilizados como substratos naturais grãos de sorgo, trigo, aveia branca, aveia preta, centeio, cevada e milho, nas temperaturas de 21, 24, 27, 30 e 33 °C, sob três regimes de luminosidade, luz contínua, escuro total e fotoperíodo de 12 h de luz, iniciando-se o experimento com período de 12 h sob luz nos tratamentos com luz.

Os substratos foram acondicionados em câmeras de crescimento, com controle de temperatura e iluminação fornecida por quatro lâmpadas Philips 15 W/75 (luz do dia) distanciadas 5 cm dos erlmeyers (Figura 08).

A produção do micélio de *S. maydis* do isolado monospórico foi feita em placas de

Petri de 80 mm de diâmetro, contendo meio de cultura de BDA (batata-dextrose-ágar = 39 g de 1.000 mL de água). Do isolado monospórico foram feitas três repicagens referentes aos três fotoperíodos, onde foram rodadas todas as temperaturas utilizando cinco câmaras de crescimento.



Figura 8 - Câmaras de crescimento (A) e detalhe do fornecimento de luz pelas lâmpadas Philips 15 W/75 (B).

Foram utilizados erlenmeyers com volume de 250 mL de capacidade com 20 gramas de cada grão, embebidos em 100 mL de água por 24 horas, com posterior remoção do excesso e esterilização por meio de duas autoclavagens, por 20 minutos a temperatura de 127°C, com intervalo de 24 h entre cada processo (Figuras 09).

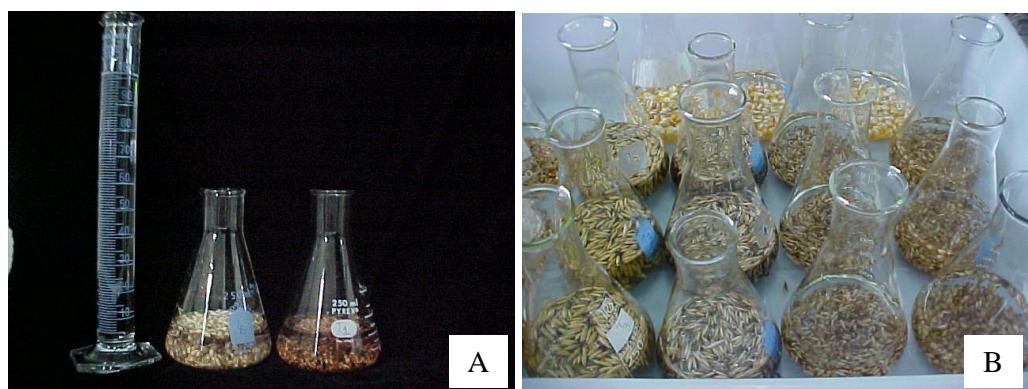


Figura 9 - Erlenmeyers com volume de 250 mL de capacidade com 20 gramas de grãos cada(A), embebidos em 100 mL de água por 24 horas (B).

Após o resfriamento dos grãos, cada erlenmeyer recebeu três discos de micélio do fungo de 5 mm de diâmetro, provenientes de colônias de seis dias de idade (Figura 10). Sendo levado posteriormente para a incubadora de acordo com seu respectivo tratamento.

A cada cinco dias todos erlenmeyers foram agitados de forma manual e suave por aproximadamente 10 segundos para homogenização e compactação dos grãos.

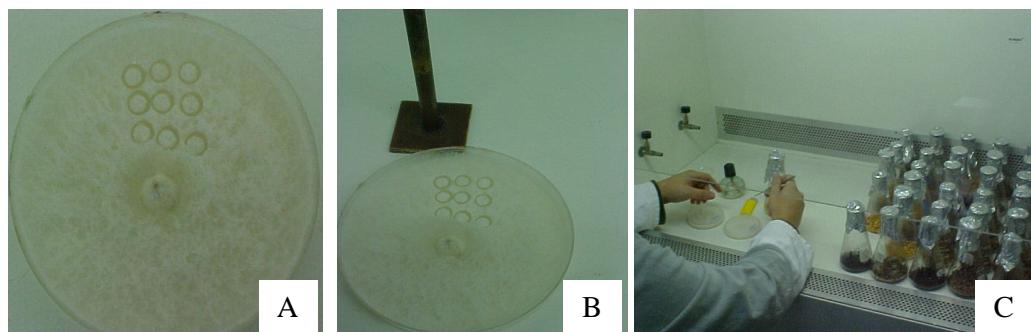


Figura 10 - Colônia de *Stenocarpella maydis* com seis dias de idade (A), detalhe dos discos de 5 mm de diâmetro (B) e repicagem dos discos para erlenmeyers após resfriamento (C).

Aos 15 dias os erlenmeyers foram retirados das câmaras de crescimento. Com auxílio de uma espátula flambada, foi transferido 2 g de substrato de cada erlenmeyer para tubo de ensaio contendo 20 mL de água destilada e esterilizada (solução estoque de 1.000 mL de água + 1 gota de espalhante Tween 10) (Figura 11). A mistura foi agitada de forma manual e vigorosa para liberar os esporos em suspensão. Posteriormente, com auxílio de uma pipeta foram retiradas quatro aliquotas de 0,03 mL da suspensão de cada tubo e colocadas em lâminas microscópicas. A contagem do número de conídios por aliquota foi feita em microscópio ótico com aumento de 40 vezes. Por regra de três calculou-se o número de conídios por mL de suspensão, com posterior multiplicação por 10 para obtenção do número de conídios por grama de substrato.



Figura 11 - Tubos de ensaio contendo 20 mL de água destilada e esterilizada (solução estoque de 1.000 mL de água + 1 gota de espalhante Tween 10) + 2 g de substrato de cada erlenmeyer.

Também foi pipetado 1,0 mL da suspensão para placas de Petri contendo ágar-água a 1% para determinar a germinação dos conídios considerando a viabilidade dos conídios. As placas foram colocadas nas câmaras de crescimento com temperatura de 25 °C e luz contínua durante 6 h. A germinação dos conídios foi observada diretamente nas placas sob microscópio ótico, com magnitude de 40 vezes (Figura 12). Foram examinados 50 conídios por placa de Petri, considerando germinado o conídio que apresentou tubo germinativo com comprimento igual ou maior que a maior largura do conídio (Casa et al., 2007).



Figura 12 - Germinação de conídios de *Stenocarpella maydis* em placas de petri contendo ágar-água.

Os resultados obtidos do número de conídios/g de substrato e a viabilidade dos conídios foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos a análise de variância, posteriormente analisados pela comparação de médias pelo teste de Bonfferoni ao nível de 1% de significância.

Ensaio II: Produção e viabilidade de conídios de *Stenocarpella maydis* em grãos de cultivares de cevada em função do tempo de incubação

Foi conduzido experimento fatorial incluindo quatro cultivares de cevada, selecionadas no ensaio anterior como o substrato natural mais promissor, na temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 h, com quatro repetições. Delineamento inteiramente causalizado, avaliando o número de conídios/g de cevada e a viabilidade dos conídios aos 10, 15, 20, 25 e 30 dias de incubação. Foram utilizadas as cultivares de cevada Scarlet, Borema, MN 610 e MN 721. O ensaio foi conduzido com procedimento igual ao ensaio descrito anteriormente.

Ensaio III: Efeito de substratos naturais, temperatura e fotoperíodo na esporulação e viabilidade de conídios *Stenocarpella macrospora*

O isolado monospórico de *S. macrospora* foi obtido de colmos de milho naturalmente infectados, coletadas em lavoura comercial na região de Capinzal, SC, e encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Fitopatologia do CAV/UDESC.

Foi conduzido experimento fatorial incluindo sete substratos naturais: grãos de sorgo, trigo, aveia branca, aveia preta, centeio, cevada e milho, nas temperaturas de 21, 24, 27, 30 e 33 °C, sob três regimes de luminosidade, luz contínua, escuro total e fotoperíodo de 12 h de luz, iniciando-se o experimento com período de 12 h sob luz nos tratamentos com luz.

O ensaio constou de quatro repetições no delineamento inteiramente causalizado, avaliando o número de conídios/g de substrato e a viabilidade dos conídios aos 15 dias de incubação.

O ensaio foi conduzido com os mesmo procedimentos descritos para *S. maydis*.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio I: Grãos de cereais, temperaturas e fotoperíodos sobre esporulação e viabilidade de *Stenocarpella maydis*

Houve diferença estatística significativa para fotoperíodo, temperatura, substrato e suas interações, incluindo a interação tripla, tanto para o número de conídios/g de substrato quanto para viabilidade de conídios (Tabela 2). Demonstrando que *S. maydis* responde diferentemente em cada substrato aos estímulos de temperatura e de luminosidade na produção e viabilidade dos conídios.

Tabela 2 - Análise de variância para número de conídios/g de substrato e viabilidade de conídios de *Stenocarpella maydis*, para fotoperíodo, temperatura e substrato. Lages/SC, 2008.

| F.V. | G.L. | Q.M. | |
|-----------------|------|----------------------|-------------|
| | | Conídios/g de subst. | Viabilidade |
| Fotoperíodo (F) | 2 | 82.329* | 1261,80* |
| Temperatura (T) | 4 | 82.339* | 454,58* |
| FxT | 8 | 9.359* | 164,30* |
| Substrato (S) | 6 | 20.019* | 97,88* |
| FxS | 12 | 2.760* | 136,29* |
| TxS | 24 | 3.706* | 27,71* |
| FxTxS | 48 | 1.899* | 23,44* |
| Erro | 315 | 7,31 | 4,89 |
| Total | 419 | - | - |
| C.V. | - | 16,72 | 12,22 |

*significativo ao nível de 1% de significância pelo teste F.

Não houve diferença significativa entre o fotoperíodo de 12 e 24 h de luz na produção e viabilidade de conídios (Tabelas 3 e 4). No escuro contínuo foi observado menor produção e viabilidade de conídios na média de todas as temperaturas e substratos diferindo significativamente dos outros fotoperíodos (Tabelas 3 e 4). A luminosidade pode exercer efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas reprodutivas (BRUNELLI et al., 2006). Estes mesmos autores determinaram que a falta de luminosidade foi fator inibitório na esporulação de *Cercospora zae-maydis*. Para HANADA et al. (2002) a luminosidade foi um fator fundamental na esporulação de *Mycosphaerella fijiensis*, uma vez que no regime de escuro contínuo o fungo não esporulou. TRIONE & LEACH (1969) relataram que, para

fungos cuja esporulação é induzida pela luz, este agente físico age diretamente na ativação de enzimas-chave envolvidas na esporogênese. Embora haja algumas espécies que são indiferentes à quantidade ou qualidade da luz (HAWKER, 1957). CASA et al. (2007) verificaram aumento de 30% na germinação de conídios de *S. macrospora* em meio de BSA sob luz contínua quando comparado aos mantidos no escuro. Estes mesmos autores relatam que para *S. maydis* não ocorreram tais diferenças.

Tabela 3 - Número de conídios de *Stenocarpella maydis* por g/substrato para fotoperíodo, temperatura e substrato natural. Lages/SC, 2008.

| Fotoperíodo (h) | Temperatura (°C) | Substrato | Nº de conídios/g de subst. |
|-----------------|------------------|--------------|----------------------------|
| 12 | - | - | 5.900 a |
| 24 | - | - | 5.700 a |
| 0 | - | - | 660 b |
| - | 27 | - | 11.000 a |
| - | 24 | - | 5.700 b |
| - | 30 | - | 2.900 c |
| - | 21 | - | 700 d |
| - | 33 | - | 80 d |
| - | - | Cevada | 11.800 a |
| - | - | Aveia Preta | 4.100 b |
| - | - | Trigo | 4.100 b |
| - | - | Centeio | 2.700 c |
| - | - | Sorgo | 2.600 c |
| - | - | Aveia Branca | 1.900 cd |
| - | - | Milho | 1.300 d |

*letras iguais não diferem pelo teste de Bonferroni ao nível de 1% de significância.

Tabela 4 - Viabilidade de conídios de *Stenocarpella maydis* por fotoperíodo, temperatura e substrato natural. Lages/SC, 2008.

| Fotoperíodo (h) | Temperatura (°C) | Substrato | Viabilidade (%) |
|-----------------|------------------|--------------|-----------------|
| 24 | - | - | 57 a |
| 12 | - | - | 55 a |
| 0 | - | - | 24 b |
| - | 27 | - | 57 a |
| - | 24 | - | 56 a |
| - | 30 | - | 48 b |
| - | 21 | - | 43 c |
| - | 33 | - | 22 d |
| - | - | Cevada | 60 a |
| - | - | Aveia Preta | 48 b |
| - | - | Trigo | 47 b |
| - | - | Centeio | 43 c |
| - | - | Sorgo | 42 c |
| - | - | Aveia Branca | 37 d |
| - | - | Milho | 33 e |

*letras iguais não diferem pelo teste de Bonferroni ao nível de 1% de significância.

Com relação às temperaturas analisadas, em todos os tratamentos na temperatura de 33°C observou-se alteração da coloração do micélio de *S. maydis* de branco para verde-oliva (Figura 13), e baixa esporulação. A temperatura de 27°C proporcionou a maior produção de conídios (11.000/g de grãos) na média de todos os fotoperíodos e substratos diferindo das demais temperaturas (Tabela 3). A temperatura de 27°C também obteve a melhor viabilidade (57%), diferindo estatisticamente das demais temperaturas, exceto 24°C (56%) (Tabela 4). Segundo BENNSCH & VAN STADEN (1992), os conídios de *S. maydis* germinam no tecido da planta após 5 h de incubação a 30°C. No entanto, a maioria dos trabalhos que visam obter inóculo artificial utiliza temperaturas variando de 22 a 27°C (ULLSTRUP, 1970; HANADA et al., 2002; NOZAKI et al., 2004; BRUNELLI et al., 2006; MAFACIOLI et al., 2008).



Figura 13 - Exemplo do micélio de *Stenocarpella maydis* com coloração verde-oliva submetido na temperatura de 33°C.

O substrato natural que apresentou a maior produção e viabilidade de conídios na média de todos os fotoperíodos e temperaturas foi a cevada, com 11.800 conídios/g de grão e 60% de germinação diferindo estatisticamente dos demais (Tabelas 3 e 4). A interação tripla “cevada x 27°C x 12 h de fotoperíodo” proporcionou a maior produção de conídios (67.600/g de grãos) diferindo estatisticamente das demais interações triplas e a maior germinação (93%), porém não diferindo dos demais substratos (Tabelas 5 e 6) (Figura 14). Do mesmo modo, MORANT et al. (1993) obtiveram 86% e 96% de germinação de conídios de *S. maydis* em aveia e meio a base de sais minerais, respectivamente. BIZZETTO et al. (2000) estudando produção micelial e esporulação de *S. maydis* em grãos de sorgo, de aveia e meios de cultura agarizados obtiveram o máximo de 10.000 conídios/mL de suspensão aos 15 dias de

incubação. Para obter uma concentração de 1.200.000 conídios/ mL ULLSTRUP (1970) precisou de 6 semanas de incubação com grãos de aveia a uma temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 h. Comparativamente, grãos de cevada, na temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 h obteve-se uma suspensão de aproximadamente 700.000 conídios/ mL aos 15 dias de incubação, um pouco superior a metade do obtido por ULLSTRUP (1970), porém em um período 12 vezes mais rápido.

Tabela 5 - Melhor interação tripla entre substrato natural, fotoperíodo e temperatura para número de conídios/g de grãos de *Stenocarpella maydis*. Lages/SC, 2008.

| Substrato | Fotoperíodo (h) | Temperatura (°C) | conídios/g de grãos (nº) |
|------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Cevada | 12 | 27 | 67.600 a |
| Aveia Preta | 12 | 27 | 23.200 b |
| Trigo | 12 | 27 | 19.000 bc |
| Centeio | 12 | 27 | 15.000 bc |
| Sorgo | 12 | 24 | 11.500 c |
| Milho | 24 | 24 | 9.600 c |
| Aveia Branca | 12 | 27 | 9.000 c |

*letras iguais não diferem pelo teste de Bonferroni ao nível de 1% de significância.

Tabela 6 - Melhor interação tripla entre substrato natural, fotoperíodo e temperatura para viabilidade de conídios de *Stenocarpella maydis*. Lages/SC, 2008.

| Substrato | Fotoperíodo (h) | Temperatura (°C) | Viabilidade (%) |
|------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Cevada | 12 | 27 | 93 a |
| Aveia Preta | 12 | 27 | 90 a |
| Milho | 12 | 27 | 89 a |
| Aveia Branca | 12 | 27 | 85 ab |
| Sorgo | 12 | 27 | 85 ab |
| Trigo | 12 | 27 | 78 bc |
| Centeio | 12 | 27 | 75 c |

*letras iguais não diferem pelo teste de Bonferroni ao nível de 1% de significância.



Figura 14 - Grãos de cevada incubados na temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 h por 15 dias.

Embora trabalhos relacionem correlação entre produção de conídios e teores nutricionais dos meios de cultura e substratos naturais, principalmente teores de carbono e nitrogênio (CUTRIM et al., 2006; MAFACIOLI et al., 2008), neste trabalho não foi observado correlação entre a produção de conídios e teores de proteína, fibra e gordura bruta nos grãos (Tabela 7). No entanto GRIFFIN (1994) relata que a relação entre carbono e nitrogênio é muito importante para o crescimento e esporulação dos fungos e ainda que a alta concentração de nitrogênio inibe a esporulação.

Tabela 7 - Análise bromatológica dos substratos naturais e sua correlação com a produção de conídios. Lages/SC, 2008.

| Substrato | conídios/g de grãos (nº) | Proteína bruta (%) | Fibra Bruta (%) | Gordura Bruta (%) |
|------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| Cevada | 67.600 | 11,94 ^{n.s.*} | 51,99 ^{n.s.} | 2,58 ^{n.s.} |
| Aveia Preta | 23.200 | 14,91 | 38,91 | 6,12 |
| Trigo | 19.000 | 13,69 | 61,44 | 1,63 |
| Centeio | 15.000 | 14,78 | 50,15 | 2,71 |
| Sorgo | 11.500 | 7,81 | 62,21 | 4,01 |
| Milho | 9.600 | 9,01 | 55,35 | 4,84 |
| Aveia Branca | 9.000 | 10,16 | 49,09 | 4,58 |

*n.s. = não significativo pela análise de regressão ao nível de 5%.

Ensaio II: Produção e viabilidade de conídios de *Stenocarpella maydis* em grãos de cultivares de cevada em função do tempo de incubação

Houve diferença estatística significativa entre as quatro cultivares de cevada, o tempo de incubação e sua interação na produção de conídios de *S. maydis* (Tabela 8). O que demonstra que cada cultivar de cevada responde diferente ao tempo de produção de conídios.

Tabela 8 - Análise de variância para número de conídios de substrato de *Stenocarpella maydis*, para cultivares de cevada. Lages/SC, 2008.

| F.V. | G.L. | Q.M. | |
|-------------|-------------|---------------------------------|------------------------|
| | | conídios/g de grãos (nº) | viabilidade (%) |
| Cevada (C) | 3 | 357.705* | 53,58 |
| Tempo (T) | 4 | 472.622* | 1.234* |
| C x T | 12 | 90.730* | 70,94 |
| Repetição | 5 | 41.107 | 18,59 |
| Erro | 95 | 17.833 | 36,33 |
| Total | 119 | - | - |
| C.V. | - | 40,22 | 7,33 |

*significativo ao nível de 1% de significância pelo teste F.

A cultivar Scarllete apresentou a maior produção de conídios em todas as datas de avaliação (Figura 15). Também foi a única cultivar a apresentar regressão linear, ao contrário das demais que apresentaram regressão quadrática, porém todas significativas a 5% (Figura 15). Pela derivação das equações obteve-se o tempo de incubação que proporcionou a maior produção de conídios, o qual ocorreu aos 21, 23, e 22 dias para Borema, MN 610 e MN 721 (Figura 15).

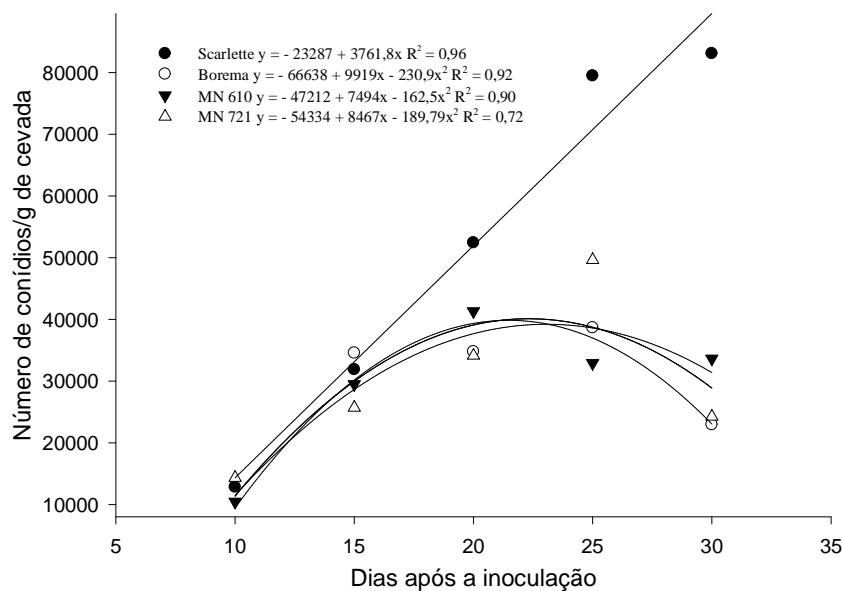


Figura 15 - Número de conídios de *Stenocarpella maydis*/g de substrato de quatro cultivares de cevado no tempo.

Para a viabilidade de conídios não foi observado diferença estatística entre as cultivares, no entanto foi verificado diferença na viabilidade de conídios ao longo do tempo de incubação (Tabela 8). Tal fato demonstra que ao contrário da produção de conídios, a viabilidade dos mesmos independe da cultivar utilizada, sendo apenas dependente do tempo de incubação (Figura 16). Observa-se também que a maior viabilidade de conídios (93%) foi aos 15 dias de incubação, a qual decresce após esta data. Se comparar com a produção de conídios (Figura 15) observa-se que a data de maior produção encontra-se próximo aos 22 dias, no entanto nesta data a viabilidade destes conídios é menor (85%) (Figura 16). Deste modo, deve-se levar em consideração o número de conídios viáveis para se estabelecer o período de incubação adequado.

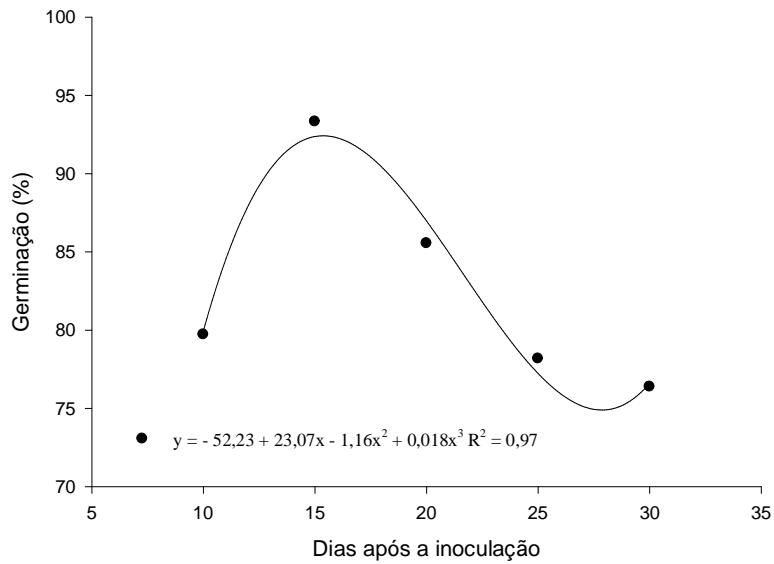


Figura 16 - Germinação dos conídios de *Stenocarpella maydis* em grãos na média de quatro cultivares de cevada no tempo.

Ensaio III: Efeito de substratos naturais, temperatura e fotoperíodo na esporulação e viabilidade de conídios *Stenocarpella macrospora*

Todos os tratamentos apresentaram colonização dos grãos pelo micélio de *S. macrospora*. Com destaque para a temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 h.

Apenas a cevada e o milho apresentaram formação de alguns picnídios, os quais não produziram ou escassamente produziram conídios, nas temperaturas de 24 e 27 °C, ambas no fotoperíodo de 12 h. A baixa quantidade de conídios (menos de 15 conídios/g de substrato) encontrados apenas nestes dois substratos para quantificação da produção e germinação de conídios impossibilitou a obtenção de resultados consistentes.

Sugere-se que trabalhos futuros explorem outros substratos naturais, com ou sem adição de substâncias que possam induzir a esporulação, como MORANT et al. (1993) que utilizaram Biotina em meio de cultura de BSA para favorecer a esporulação e viabilizar a quantificação da produção e germinação de conídios de *S. macrospora*.

CONCLUSÃO

Nem todos os grãos de cereais, oleaginosas e fragmentos de milho podem ser usados como substratos naturais na produção de inóculo de *S. maydis*.

Os grãos de cevada, aveia preta e trigo foram os melhores substratos para produção de conídios de *S. maydis*, com destaque para grãos de cevada.

A produção e a germinação de conídios de *S. maydis* são influenciadas pela temperatura e luminosidade, como melhor resposta à temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12h.

A luminosidade é fator essencial para esporulação e germinação de conídios de *Stenocarpella maydis*.

Existe variação entre cultivares de cevada para produção de conídios de *S. maydis*, porém não existe diferença para viabilidade de conídios.

O método desenvolvido neste trabalho para produção e germinação de conídios de *S. maydis* pode ser considerado eficaz, rápido, barato e reproduzível, podendo ser recomendado para produção massal de inóculo.

O fungo *Stenocarpella macrospora* esporulou somente sobre grãos de cevada e milho, porém com quantidade insuficiente para serem utilizados para produção de inóculo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B.; WHITE, D.G. Fungi associated with cornstalks in Illinois in 1982 and 1983. **Plant Disease** 71: 135-137. 1987.
- ANDERSON, B.; WHITE, D.G. Evaluation of methods for identification of corn genotypes with stalk rot and lodging resistance. **Plant Disease** 78: 590-593. 1994.
- BALMER, E.; PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: Paterniani, E. & Viegas, G.P. (Eds) **Melhoramento e produção do milho**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.2, p.595-634.
- BE MILLER, J.N.; PAPPELIS, A.J. 2,4-Dihydroxy-7methoxy-1,4-benzoxazin-3-one glicoside in corn. I. Relation of water-soluble, 1-butanol-soluble glycoside fraction content of pith cores and stalk rot resistance. **Phytopathology** 55:1237-1240. 1965.
- BENSCH, M.J. *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton colonization of maize ears. **Journal of Phytopathology** 143: 597-599. 1995.
- BENSCH, M.J.; VAN STADEN, J. Ultrastructural histopathology of infection and colonization of maize by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, n.4, p. 312-318, 1992.
- BENSCH, M.J.; VAN STADEN, J.; RIJKENBERG, F.H.J. Time and site inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology** 136: 265-269. 1992.
- BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; SILVA, H.P. Técnicas de inoculação de *Diplodia maydis* em milho. **Fitopatologia Brasileira** 25: 21-29. 2000.
- BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeae-maydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, p. 92-94, 2006.
- CASA, R.T. *Diplodia maydis e Diplodia macrospora associados à semente de milho*. (Dissertação de Mestrado) Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 1997.

CASA, R.T. **Sobrevivência de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em restos culturais de milho.** (Tese de Doutorado) Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2000.

CASA, R.T.; BLUM, M.M.C.; FONTOURA, S.M.V. Efeito do pré-cultivo de aveia branca e nabo forrageiro sobre a incidência de podridões do colmo, de grãos ardidos, de fungos nos grãos e sobre o rendimento de grãos de diferentes híbridos de milho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, n.3, p. 241-246, 2005a.

CASA, R.T.; MOREIRA, E.N.; BOGO, A.; SANGOI, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.4, p.353-357, 2007a.

CASA, R.T. et al. Incidência e danos de podridões do colmo em genótipos de milho em três localidades de Santa Catarina. V Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijao. Chapecó, SC. **Resumo Expandido**. p. 138-141. 2005b.

CASA, R.T. et al. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: Sandini, I.A. & Fancelli, A.L. **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. 209 p.:il.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas Regiões Sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 23: 370-373. 1998a.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira** 28: 355-361. 2003

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira** 29: 141-147. 2004.

CASA, R.T.; REIS, E.M.; ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira** 31:427-439. 2006.

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 *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira** 32:137-142. 2007b.

CASA, R.T.; ZAMBOLIM, L.; REIS, E.M. Transmissão e controle de diplodia em sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira** 23: 436-441. 1998b.

CHAMBERS, K.R. Effect of time of inoculation on Diplodia stalk and ear rot of maize in South Africa. **Plant Disease** 72: 529-531. 1988.

CLAYTON, E.E. Diplodia ear rot disease of corn. **Journal Agricultural Research** 34: 357-371. 1927.

CONAB. **Indicadores da Agropecuária**. Disponível em: <<http://www.conab.com.br>> Acesso em: 10/07/08.

COMMITTEE ON STANDARDIZATION OF COMMON NAMES FOR PLANT DISEASES. Common names for plant diseases. **Plant Disease** 69:649-676. 1985.

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

CRAIG, J.; HOOKER, A.L. Diplodia root and stalk rot of dent corn. **Phytopathology** 51:382-385. 1961.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. **Mais de 300 cultivares de milho são disponibilizadas no mercado de sementes do Brasil para a safra 2008/09**. Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <<http://www.cnpmgs.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>> Acesso em: 11/12/08.

CUTLER, H.G. et al. Diplodiol: a new toxin from *Diplodia macrospora*. **Journal Agricultural Food and Chemistry** 28:135-138. 1980.

CUTRIM, F.A. et. al. Influence of culture media and the carbon-nitrogen interaction on growth and sporulation of *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 85-88, 2006.

DAI, K. et al. Detection of *Diplodia maydis* (Berkeley) Saccardo from imported corn seed. **Research Bulletin of the Plant Protection Service** 23:1-6. 1987.

DEL RÍO, L.; MELARA, W. Dispersion de *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton en un cultivo de maíz. **Ceiba** 32: 133-140. 1991.

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

DENTI, E.; REIS, E.M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do planalto médio gaúcho e dos campos gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira** 28: 585-590. 2003

DENTI, E.; REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Reação de genótipos de milho às podridões da base do colmo. **Summa Phytopathologica** 28: 286-288. 2002.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 1995.

DODD, J.L. The role of plant stresses in development of corn stalk rots. **Plant Disease** 64:533-537. 1980.

DORRANCE, A.E.; MILLER, O.K.; WARREN, H.L. Comparison of *Stenocarpella maydis* isolates for isozyme and cultural characteristicis. **Plant Disease** 83: 675-680. 1999

EDDINS, A.H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. **Phytophatology** 20: 439-448. 1930.

FANCELLI , A.L.; DOURADO NETO, D. **População e distribuição espacial de plantas de milho.** In: Milho: Estratégias de manejo para alta produtividade. ESALQ. Piracicaba. 2003.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 80p. (Embrapa-CNPMS. 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** 133:327-333. 1991.

FLETT, B.C.; WEHNER, F.C.; SMITH, M.F. Relationship between maize stubble placement in soil and survival of *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*). **Journal of Phytopathology** 134:33-38. 1992.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Incidence of *Stenocarpella maydis* ear rot of corn under crop rotation systems. **Plant diseases** 85: 92-94. 2001.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W. Optimum disease potencial for evaluating resistance to *Stenocarpella maydis* ear rot in corn hybrids. **Plant Disease** 78:587-589. 1994.

FLETT, B.C.; McLAREN, N.W.; WEHNER, F.C. Incidence of ear rot pathogens under alternating corn tillage practices. **Plant Disease** 82:781-784. 1998.

FOLEY, D.C. The response of corn to inoculation with *Diplodia zeae* and *Giberella zeae*. **Phytopathology** 50:146-150. 1960.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology.** New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira** 27:170-173. 2002.

HAWKER, L.E. **The physiology of reproduction in fungi.** Cambridge: Cambridge University Press, 1957. 128p.

HARTMAN, G.L.; HUANG, Y.H.; NELSON, R.L.; NOEL, G.R. Germoplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. **Plant Disease** 81:515-518. 1997.

HOOKER, A.L. Factors affecting the spread of *Diplodia zeae* in inoculated corn stalks. **Phytopathology** 47:196-199. 1957.

HOOKER, A.L.; WHITE, D.G. Prevalence of corn stalk rot in Illinois. **Plant Disease** 60:364-365. 1976.

HOPPE, P.E. Intraspecific and interspecific aversion in *Diplodia*. **Journal Agricultural Research** 53:671-680. 1936.

ICEPA. Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. **A despeito da redução de plantio, produção catarinense deve crescer.** - Milho, 10/11/2006, 2006. Disponível em: <<http://www.icepa.com.br/milho>>. Acesso em 17 de novembro de 2008.
JONG, S.C., EDWARDS, M.J. **Catalogue of Filamentous Fungi: Media formulations.** 18 ed. Maryland: American Type Culture Collection, 1991, 667p.

KLAPPROTH, J.C.; HAWK, J.A. Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ear with *Stenocarpella maydis*. **Plant Disease** 75:1057-1060. 1991.

KLINGELFUSS, L.H.; YORINORI, J.T.; DESTRO, D. Métodos de inoculação para quantificação de resistência em soja à *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira** 32:050-055. 2007.

KOEHLER, B. Husk coverage and ear declination in relation to corn ear rots. **Phytopathology** 41:22. 1951.

KOEHLER, B.; BOEWE, G.H. Causes of corn stalk in Illinois. **Plant Disease** 41: 501-504. 1957.

KUHNEM JÚNIOR, P.R.; BIELUCZYK, J.; CASA, R.T.; ERNANI, P.R. Relação entre pH do solo e incidência de podridões do colmo e grãos ardidos. VI Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão. Chapecó, SC. **Resumo Expandido.** p. 93-97. 2007a.

KUHNEM JÚNIOR, P.R.; ZANIN, C.G.; SCHIMITT, A.; CASA, R.T.; SANGOI, L. Efeito do adensamento de plantas de milho com genótipos contranstantes na incidência de grãos ardidos e rendimento de grãos. VI Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijao. Chapecó, SC. **Resumo Expandido.** p. 88-92. 2007b.

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

MACDONALD, M.V.; CHAPMAN, R. The incidence of *Fusarium moniliforme* on maize from Central America, Africa and Asia during 1992-1995. **Plant Pathology** 46:112-125. 1997.

MAFACIOLI, R.; TESSMANN, D. J.; SANTOS, A. F.; VIDA, J. B. Variabilidade patogênica e efeito de carboidratos no crescimento micelial, esporulação e agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.18-21, 2008.

MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. **Toxigenic Fusarium Species: Identity and Toxicology**. Pennsylvania State University Press, University Park. 1984.

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. **Phytophyllactica** 11: 61-64. 1979.

MÁRIO, J.L.; PRESTES, A.M.; REIS, E.M. Avaliação da resistência à mancha foliar de *Diplodia macrospora* em genótipos de milho. **Fitopatologia Brasileira** 22:280. 1998.

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** 26:670-672. 2001

MÁRIO, J.L.; REIS, E.M. Reação de híbridos de milho à podridão branca da espiga. **Fitopatologia Brasileira** 28: 155-158. 2003

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

MCNEW, G.L. **Crown infection of corn by Diplodia zeae**. Iowa:[s.n.], 1937 (Iowa Agric.Exp. Stn. Res. Bull., 216).

MELGAR, J.; ROY, K.W. Soybean sudden death syndrome: cultivar reactions to inoculation in a controlled environment and host range and virulence of causal agent. **Plant Disease** 78:265-268. 1994.

MICHAELSON, M.E.; CHRISTENSEN, J.J. Reduction in yield of corn due to stalk rot. **Phytopathology** 43:479. 1953.

MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. Fundação Cargill, Fundação ABC, 1999. 208p.

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

MORANT, M.A.; WARREN, H.L.; VON QUALEN, S.K. A synthetic medium for mass production of picnidiospores of *Stenocarpella* species. **Plant Disease** 77: 424-426. 1993.

NAGEL, C.M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology** 24:1101-1110. 1934.

NATTI, T.A.; WHITE, D.G. Yield losses due to anthracnose and Diplodia stalk rot of corn. **Phytopathology** 71:1117. 1981.

NAZARENO, N.R.X. Avaliação de perdas por podridões do colmo em milho (*Zea mays* L.) no estado do Paraná. **Fitopatologia brasileira** 14: 82-84. 1999.

NEMEC, S. The deuteromycotina: Diplodia. In: SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Eds). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. St. Paul:American Phytopathological Society, 1992. p.111-114.

NOZAKI, M.H.; CAMARGO, M.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira** 29:429-432. 2004.

OLIVEIRA, DE M.Z.A.; MELLO, DE S.C.M. Qualidade sanitária de sementes de milho (*Zea mays*) das regiões de Irecê e do Vale do Paraguaçu, Bahia. **Fitopatologia Brasileira** 11:283. 1986.

PAPPELIS, A.J.; SMITH, F.G. Relationship of water contend and living cells to spread of *Diplodia zeae* in corn stalks. **Phytopathology** 53:1100-1105. 1963.

PAPPELIS, A.J. et al. Parenchyma cell death and *Diplodia maydis* susceptibility in stalks and ears of corn. **Plant Disease** 57: 308-310. 1973.

PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho (*Zea mays* L.). In KIMATI, H. et al. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. 4ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. pp.477-488.

PEREIRA, O.A.P.; PEREIRA, W.S.P. Estudo de *Diplodia zea* (Schw.) Lev. e *Fusarium moniliforme* Sheldon em colmo de milho. **Summa Phytopathologica** 2: 157-165. 1976.

PINTO, N.F.J. de A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1998. 44p. (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 29).

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

REIS, A.C.; REIS, E.M.; CASA, R.T.; FORCELINI, C.A. Erradicação de fungos patogênicos associados a sementes de milho e proteção contra *Pythium* sp. presente no solo pelo tratamento com fungicidas. **Fitopatologia Brasileira** 20: 585-590. 1995.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Milho: manejo integrado de doenças. In: Fancelli, A.L. & Dourado Neto, D. (Eds). **Milho: tecnologia e produtividade**. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2001. pp. 223-237.

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

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** 22:97-102. 1990.

RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v35, n.5, p.1003-1009, set-out, 2005.

SACCARDO, P.A. **Syllogie fungorum**. Michigan: Edwards Brothers, 1944. v.3, 860p.

SANGOI, L. et al. Sustentabilidade do colmo em híbridos de milho de diferentes épocas de cultivo em função da densidade de plantas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.1, n. 2, p. 1, 2002.

SILVA, A.R.; JULIATTI, F.C.; BRITO, C.H.; GOMES, L.S. Métodos de inoculação de *Stenocarpella maydis* em três populações de milho. **Summa Phytophatologica**. V.31, p. 82-86, 2005.

SCOTT, D.B. Soil-borne diseases of wheat and maize in South Africa: etiological and epidemiological aspects. **Applied Plant Science** 7:60-64. 1993.

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

SHURTLEFF, M.C.; WORF, G.L.; WYSONG, D.S. Disease resistance and tolerance. In: Jugenheimer, R.W. (Ed.). **Corn improvement seed production and uses**. New York:John Wiley & Sons, 1976. p.259-327.

SINGH, B.M.; SHARMA, Y.R. Evaluation of maize germplasm to *Diplodia* stalk rot and assesment of yield loss. **Indian Phytopathology** 27:202-207. 1974.

SMITH, D.R.; WHITE, D.G. Diseases of corn. In: Sprague, G.F.; Dudley, J.W. (eds) **Corn and corn improvement**. Americam Society of Agronomy. Madison, WI. 1988. p.687-766.

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

SUTTON, B.C.; WATERSTON, J.M. *Diplodia maydis*. London: C.M.I., 1966. (Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 84).

TOLEDO, J.; REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Efeito do substrato na morfologia de conídios de *Bipolaris sorokiniana* e da densidade de inóculo na intensidade da mancha marrom em cevada. **Fitopatologia Brasileira** 29:005-010. 2004.

TRENT, S.M.; IRGANG, H.H.; REIS, E.M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira** 27: 609-613. 2002.

TRIONE, E.J.; LEACH, C.M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, n.8, p.1077- 1083, 1969.

ULLSTRUP, A.J. Observations on two ephiphytots of *Diplodia* ear rot of corn in Indiana. **Plant Disease Reporter** 48:414-415. 1964.

ULLSTRUP, A.J. Methods for inoculating corn ears with *Gibberella zae* and *Diplodia maydis*. **Plant Disease Reporter** 54:658-662. 1970.

VAN RENSBURG, J.B.J.; FERREIRA, M.J. Resistance of elite maize inbred lines to isolates of *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton. **South Africa Journal Plant Soil** 14:89-92. 1997.

WILLIAMS, K.C.; BLANEY, B.J.; DODMAN, R.L.; PALMER, C.L. Assesment for animal feed of maize kernels naturally-infected predominantly with *Fusarium moniliforme* and *Diplodia maydis*. I. Fungal isolations and changes in chemical composition. **Australian Journal of Agricultural Research** 43:773-782. 1992.

WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. Third Edition. Americam Phytopathological Society. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 1999. 128p.

ZAMBOLIM, L.; CASA, R.T.; REIS, E.M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. **Fitopatologia Brasileira** 25: 585-595. 2000.

ZAMPIERI, S. L.; SILVA, V. P. Modelo para o cálculo do déficit anual de milho usando séries históricas de produção em Santa Catarina. In: REUNIÃO TÉCNICA CATARINENSE DE MILHO E FEIJÃO, V, 2005, Chapecó. **Resumos...**Chapecó: Newsprint, 2005. 336p. p. 169-172.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: AFENAS, A.C. & MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Ed. UFV, 2007. pp 23-50.