

FRANCINE REGIANINI NERBASS

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Fusarium graminearum* EM
ESPIGAS DE MILHO, INTENSIDADE, DANOS E REAÇÃO
DE HÍBRIDOS À PODRIDÃO DE GIBERELA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Ricardo Trezzi Casa

**LAGES, SC
2014**

N443m

Nerbass, Francine Regianini

Métodos de inoculação de *Fusarium graminearum* em espigas de milho, intensidade, danos e reação de híbridos à podridão de giberela / Francine Regianini Nerbass. - Lages, 2014.

118 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Ricardo Trezzi Casa

Bibliografia: p. 102-118

Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências

Agroveteinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2014.

1. *Gibberella zeae*. 2. Podridão da espiga. 3. Resistência genética. 4. Produtividade. 5. *Zea mays*.

I. Nerbass, Francine Regianini. II. Casa, Ricardo Trezzi. III. Universidade do Estado de Santa

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do
CAV/UESC

FRANCINE REGIANINI NERBASS

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Fusarium graminearum* EM
ESPIGAS DE MILHO, INTENSIDADE, DANOS E REAÇÃO
DE HÍBRIDOS À PODRIDÃO DE GIBERELA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____

**Dr. Ricardo Trezzi Casa
UDESC/Lages-SC**

Membros:

**Dra. Marta Maria Casa Blum
URI/Erechim-RS**

**Ph.D. Luis Sangoi
UDESC/Lages-SC**

**Dr. Clovis Arruda de Souza
UDESC/Lages-SC**

**Dr. João Américo Wordell Filho
EPAGRI/Chapecó-SC**

Lages, 17/10/2014

Aos meus amados pais, Maria Cristina e João Martinho Nerbass, e a minha querida avó Olga Regianini (*in memoriam*) pelos ensinamentos, amor e exemplo de vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a existência, pelo amor infinito, proteção em todos os momentos e por todas as oportunidades de crescimento e conquistas.

Aos meus pais, Maria Cristina e João Martinho Nerbass, por todos os ensinamentos morais, orações, apoio, amizade, pelos maravilhosos momentos de convivência e afeto. Vocês foram essenciais para tornar este momento possível.

Ao meu irmão João Martinho Nerbass Junior, pelo amor e amizade.

Ao meu namorado Ricardo Otani, pelo carinho, ajuda e incentivo.

Ao professor Ricardo Trezzi Casa, pelos ensinamentos, exemplo de ética, generosidade, amizade e dedicação durante todo o período de orientação.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do Doutorado e concessão de bolsa de monitoria durante os três anos de curso.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela excelência de ensino e dedicação.

A Pioneer Sementes, em especial ao Evandro George, pela disponibilização da área experimental e de funcionários, que foram de suma importância para o desenvolvimento dos ensaios em Cruz Alta e Santa Rosa - RS.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa, pelas contribuições e ensinamentos.

Aos colegas de Pós-Graduação, Daiana Bampi, Rosiane Petry, Lenita Agostinnetto, Cristiano Sachs, Giovanni Piletti e Clodoaldo Andriolli, pelo companheirismo e auxílio na condução dos ensaios.

Aos bolsistas do Laboratório de Fitopatologia, José de Alencar, Maiquiel, Leila, Juan, Rômulo, Julhana, Fernando e Daicon, pela ajuda nos ensaios de campo e laboratório.

À minha prima Tatyane Montibeller, pelas conversas e amizade.

A todas as pessoas aqui não mencionadas, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste curso.

“Mas na profissão, além de amar
tem de saber. E o saber leva tempo
para crescer.”

Rubem Alves

RESUMO

NERBASS, Francine Regianini. **Métodos de inoculação de *Fusarium graminearum* em espigas de milho, intensidade, danos e reação de híbridos à podridão de giberela.** 2014. 118 f. Tese. (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Proteção de Plantas e Agroecologia) – Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2014.

A podridão de giberela causada pelo fungo *Fusarium graminearum*, provoca danos na produtividade e qualidade de grãos de milho sendo doença de difícil controle devido à indisponibilidade de híbridos resistentes e baixa eficácia de práticas culturais. Foram realizados três estudos, o objetivo do primeiro foi comparar quatro métodos de inoculação (injeção no canal do estilo-estigma, aspersão nos estigmas, ferimento dos grãos no centro da espiga e deposição na bainha da folha da espiga) e um tratamento controle em quatro híbridos (P30R50H, P30B30H, P3989, P32R48H) com base na severidade da doença e produtividade de grãos; o segundo estudo determinou a reação de 20 híbridos a podridão de giberela pela quantificação da incidência da doença, grãos ardidos e *F. graminearum* nos grãos e suas correlações; e o terceiro estudo caracterizou a resistência genética de híbridos à podridão de giberela pela elaboração de uma escala de reação envolvendo classes e intensidade de doença e suas correlações com produtividade de grãos e métodos de inoculação. Os experimentos do primeiro estudo foram conduzidos na safra 2011/12 em Cruz Alta, RS e Lages, SC. Os experimentos do segundo e terceiro estudos foram realizados em dois ambientes na safra agrícola 2012/13, em Cruz Alta. O delineamento dos experimentos foi em blocos casualizados com tratamentos arrançados num fatorial com quatro repetições. No primeiro estudo houve diferença na severidade da doença entre híbridos e métodos de inoculação. O híbrido P32R48H apresentou maior severidade da doença, diferindo dos demais. Inoculações no canal do estilo-estigma e ferimento dos grãos proporcionaram maior severidade da doença e menores produtividades de grãos. No segundo estudo o método de ferimento dos grãos proporcionou acréscimos superiores a 40% na incidência de espigas giberelas, incidência de grãos ardidos e incidência de *F. graminearum* nos grãos quando comparado ao método

de injeção no canal do estilo estigma. Houve efeito de híbridos e os valores foram de 37,2% a 95,6% para incidência de espigas giberelas, 2,1% a 17,0% para grãos ardidos e 4,0% a 29,3% para incidência de *F. graminearum* nos grãos. Correlações significativas e positivas ($r = 0,70$) foram obtidas entre incidência de *F. graminearum* nos grãos e grãos ardidos. No terceiro estudo foi observado que a produtividade de grãos foi afetada pelos híbridos, independentemente do método de inoculação. Os híbridos P30F35YH e BG7049H obtiveram melhores produtividades, independente do ambiente e método de inoculação, sendo classificados como moderadamente suscetível à podridão de giberela. Os híbridos AG8025PRO, DKB250PRO2, AS1555PRO, Status, 30K64HNSR e P4285 foram classificados como moderadamente resistente, considerando a intensidade de giberela e o envolvimento da resistência à colonização do estigma (ponta da espiga) e resistência do grão. Houve relações significativas e positivas entre produtividade com injeção no canal do estilo-estigma ($r = 0,93$) e produtividade com fermento dos grãos ($r = 0,94$) nos ambientes 1 e 2. Foi constatado que apesar de não haver híbridos resistentes existe variabilidade genética e o envolvimento de mecanismos de resistência do estigma e dos grãos, e que as podridões de giberela afetaram mais a qualidade dos grãos do que a quantidade.

Palavras-chaves: *Gibberella zeae*. Podridão da espiga. Resistência genética. Produtividade. *Zea mays*.

ABSTRACT

NERBASS, Francine Regianini. **Inoculation methods of *Fusarium graminearum* in maize ears, intensity, damage and reaction of hybrids to gibberella ear rot.** 2014. 118 f. Tese. (Doutorado em Produção Vegetal – Área: Proteção de Plantas e Agroecologia) – Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2014.

The gibberella ear rot caused by fungus *Fusarium graminearum*, causes damage in productivity and quality of maize kernel being disease of difficult to control due to the unavailability of resistant hybrids and low efficacy of cultural practices. Three studies were conducted, the aim of the first was to compare four methods of inoculation (injection silk-channel, sprinkling on silk, kernel- wounding and deposition in the ear leaf sheath) and a control treatment in four hybrids (P30R50H, P30B30H, P3989, P32R48H) based on disease severity and kernel yield; the second study determined the reaction of 20 hybrids to gibberella ear rot by quantifying the incidence of the disease, rot kernels and *F. graminearum* in the kernels and their correlations; and the third study characterized the genetic resistance of hybrids to gibberella ear rot through preparation of a reaction scale involving classes and disease intensity and their correlation with kernel yield and inoculation methods. The experiments of first study were conducted in 2011/12 harvest in Cruz Alta, RS and Lages. The experiments of the second and third studies were conducted in two environments in the season 2012/13 in Cruz Alta. The design of the experiments was a randomized complete blocks design with treatments arranged in a factorial with four replications. In the first study there was no difference in disease severity between hybrids and inoculation methods. The hybrid P32R48H presented higher disease severity, distinguishing from the others. Inoculations in silk-channel and wounding the kernels provided higher disease severity and lower kernel yield. In the second study, the method of the wounding the kernels provided increases above 40% in the incidence of gibberella ear rot, rot kernels and occurrence of *F.*

graminearum in the grain when compared to the injection silk-channel method. There was an effect of hybrids and the values were 37.2% and 95.6% for the incident of gibberella ear rot, 2.1% to 17.0% for rot kernels and 4.0% to 29.3% for incidence of *F. graminearum* in the kernels. Significant and positive correlations ($r = 0.70$) were found between incidence of *F. graminearum* in the kernels and rots kernels. In the third study it was watched that the kernel yield was affected by hybrids, regardless of the inoculation method. The P30F35YH and BG7049H hybrids obtained better yields, regardless of the environment and inoculation method, being classified as moderately susceptible to gibberella ear rot. The AG8025PRO, DKB250PRO2, AS1555PRO, Status, 30K64HNSR and P4285 were classified as moderately resistant considering the intensity of gibberella ear rot and the involvement of resistance to colonization of the stigma (tip of the ear) and kernel resistance. There were significant and positive relationship between productivity with injection in the silk-channel ($r = 0.93$) and wounding the kernels with productivity ($r = 0.94$) in environment 1 and 2. It was found that although there are no resistant hybrids there is genetic variability and the involvement resistance of stigma mechanisms and the kernels, and the giberella ear rot affected more kernel quality than quantity.

Key-words: *Gibberella zeae*. Ear rot. Genetic resistance. Productivity. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: <i>Fusarium graminearum</i> (<i>Gibberella zeae</i>). A e B) ascas e ascosporos, C) conídios e conidióforos..... | 34 |
| Figura 2: Sintoma de podridão de giberela em espiga de milho. | 37 |
| Figura 3: Sintomas de grãos de milho rosados colonizados por <i>Fusarium graminearum</i> | 40 |
| Figura 4: Escala diagramática para avaliação da severidade de giberela em espigas de milho inoculadas pelo estilo estigma e por ferimentos nos grãos. | 51 |
| Figura 5: Intensidade média de giberela para quatro métodos de inoculação e um tratamento controle (infecção natural) avaliados nos ambientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C). | 58 |
| Figura 6: Temperatura média referente ao período 06/11/12 a 11/02/13 (ambiente 1-A) e 26/11/2012 a 11/02/2013 (ambiente 2-B). Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13. | 69 |
| Figura 7: Correlação de Pearson entre incidência de grãos ardidos e espigas gibereladas (A), incidência de <i>Fusarium graminearum</i> nos grãos e espigas gibereladas (B), incidência de <i>Fusarium graminearum</i> nos grãos e grãos ardidos (C) em dois ambientes de semeadura em vinte híbridos de milho submetidos a dois métodos de inoculação. Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13. | 78 |
| Figura 8: Correlação entre intensidade de giberela em híbridos inoculados através de injeção de inóculo no canal do estilo estigma e intensidade de giberela com o método de fermento dos grãos (A), produtividade em híbridos inoculados através de injeção de inóculo no canal do estilo estigma e produtividade com o método de fermento dos grãos (B), em dois ambientes. | 96 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Resumo da análise de variância (ANOVA) quadrado médio do resíduo para os fatores de variação nos dados de intensidade de giberela e produtividade de grãos para métodos de inoculação, híbridos de milho e suas interações em três ambientes na safra agrícola de 2011/12.....53
- Tabela 2: Resumo da análise de variância (ANOVA) conjunta dos três ambientes para intensidade de giberela.53
- Tabela 3: Intensidade de giberela (%) em espigas de híbridos de milho comparando diferentes métodos de inoculação de dois isolados do fungo *Fusarium graminearum* em três ambientes conduzidos na safra agrícola de 2011/12.55
- Tabela 4: Rendimento de grãos em quatro híbridos de milho comparando diferentes métodos de inoculação de dois isolados do fungo *Fusarium graminearum* em três ambientes conduzidos na safra agrícola de 2011/12.56
- Tabela 5: Resumo da análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação nos dados de incidência de espigas giberelada, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em amostra homogênea de grãos para os ambientes 1 e 2, métodos de inoculação (injeção e fermento), híbridos de milho e suas interações, safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.....70
- Tabela 6: Efeito do ambiente na incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em amostra homogênea de grãos de vinte híbridos de milho na safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.....71
- Tabela 7: Efeito de método de inoculação na incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em amostra homogênea de grãos de 20 híbridos de milho na safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.71
- Tabela 8: Interação entre ambiente 1 e 2 e método de inoculação na incidência média de espigas gibereladas de vinte híbridos de milho na safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.72

| | |
|--|----|
| Tabela 9: Incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e <i>Fusarium graminearum</i> em grãos de híbridos de milho comerciais submetidos a dois métodos de inoculação do fungo em semeadura na primeira quinzena do mês de novembro de 2012 (ambiente 1). Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13. | 74 |
| Tabela 10: Incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e <i>Fusarium graminearum</i> em grãos de híbridos de milho comerciais submetidos a dois métodos de inoculação do fungo em semeadura na segunda quinzena do mês de novembro de 2012 (ambiente 2). Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13. | 75 |
| Tabela 11: Incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e <i>Fusarium graminearum</i> em amostra homogênea de grãos de vinte híbridos de milho (ambiente 1 e ambiente 2), na safra agrícola de 2012/13, Cruz Alta, RS. | 77 |
| Tabela 12: Híbridos de milho submetidos à avaliação da reação a giberela, safra agrícola 2012/13. Cruz Alta, RS. | 87 |
| Tabela 13: Resumo da análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação nos dados intensidade de giberelada e produtividade de grãos para os ambientes 1 e ambiente 2, métodos de inoculação (injeção e fermento), híbridos de milho, e suas interações na safra agrícola de 2012/13. | 90 |
| Tabela 14: Intensidade de giberela e produtividade de grãos em híbridos de milho comerciais inoculados artificialmente pelo método de injeção no canal do estilo estigma e fermento no centro dos grãos da espiga no ambiente 1 e ambiente 2, Cruz Alta, RS. | 91 |
| Tabela 15: Escala de reação à giberela correlacionando intensidade de doença e escala de classes, após inoculação artificial com injeção no canal do estilo estigma e fermento dos grãos no centro da espiga. | 93 |
| Tabela 16: Intensidade média de giberela e reação de híbridos de milho comerciais após inoculação artificial de <i>Fusarium graminearum</i> através de injeção no canal do estilo estigma e de fermento dos grãos no centro das | |

| | |
|---|----|
| espigas no ambiente 1 e ambiente 2, safra agrícola 2012/13. Cruz Alta, RS..... | 94 |
| Tabela 17: Intensidade média de giberela e reação de híbridos de milho comerciais após a utilização conjunta dos métodos de inoculação de injeção no canal do estilo estigma e de ferimento dos grãos no centro das espigas. | 95 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 29 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 32 |
| 3 CAPÍTULO 1 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE <i>Fusarium graminearum</i>, SEVERIDADE DA GIBERELA EM ESPIGAS E PRODUTIVIDADE DE HÍBRIDOS DE MILHO | 45 |
| 3.1 RESUMO | 45 |
| 3.2 ABSTRACT | 45 |
| 3.3 INTRODUÇÃO | 46 |
| 3.4 MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 3.5 RESULTADOS | 52 |
| 3.6 DISCUSSÃO | 59 |
| 3.7 CONCLUSÕES | 61 |
| 4 CAPÍTULO 2 INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO DE GIBERELA, GRÃOS ARDIDOS E <i>Fusarium graminearum</i> NOS GRÃOS DE HÍBRIDOS DE MILHO COM INOCULAÇÃO DO FUNGO NO CANAL DO ESTILO ESTIGMA E POR FERIMENTO DOS GRÃOS | 62 |
| 4.1 RESUMO | 62 |
| 4.2 ABSTRACT | 63 |
| 4.3 INTRODUÇÃO | 63 |
| 4.4 MATERIAL E MÉTODOS | 65 |
| 4.5 RESULTADOS | 68 |
| 4.6 DISCUSSÃO | 79 |
| 4.7 CONCLUSÕES | 81 |
| 5 CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À PODRIDÃO DE GIBERELA EM ESPIGA DE MILHO DE HÍBRIDOS COMERCIAIS E PRÉ-COMERCIAIS, APÓS A UTILIZAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL | 82 |
| 5.1 RESUMO | 82 |
| 5.2 ABSTRACT | 83 |
| 5.3 INTRODUÇÃO | 84 |
| 5.4 MATERIAL E MÉTODOS | 86 |
| 5.5 RESULTADOS | 89 |
| 5.6 DISCUSSÃO | 97 |
| 5.7 CONCLUSÕES | 100 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 101 |
| 7 REFERÊNCIAS | 102 |

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) possui importância econômica pela participação em diferentes segmentos da cadeia produtiva de alimentos, sendo um dos cereais mais cultivados e consumidos no mundo.

O cereal apresenta o segundo maior volume de produção mundial de grãos (EMYGDIO et al., 2013). No Brasil, na safra 2013/14, foram colhidos 79,9 milhões de toneladas com produtividade de 5,06 t ha⁻¹ (CONAB, 2014). O Estado de Santa Catarina apresentou produtividade de 7,38 t ha⁻¹, no entanto, ainda baixo se comparado a produtividades superiores a 15 t ha⁻¹ obtidas em condições experimentais (SANGOI et al., 2004).

O potencial produtivo muitas vezes é comprometido pela ocorrência de doenças. As podridões de espiga reduzem a quantidade e qualidade dos grãos e são consideradas doenças de difícil controle (WHITE, 1999; REID et al., 1999; PRESELLO et al., 2008).

Em Santa Catarina um agravante para a ocorrência das podridões da espiga tem sido o cultivo do milho em monocultura e Plantio Direto o que tem favorecido a sobrevivência, manutenção e a multiplicação do inóculo dos agentes necrotróficos nos resíduos culturais infectados (WORDELL & CASA, 2010).

O fungo *Fusarium graminearum* Schwabe denominado cientificamente na forma anamórfica, e na teleomórfica, de *Gibberella zeae* (Schwein) Petch, causador da podridão de giberela ou podridão rosada da ponta da espiga, tem sido relatado pela assistência técnica de campo como um dos principais patógenos causadores de podridão de espiga no Sul do Brasil.

O fungo é frequente em regiões de temperaturas ao redor de 20°C onde coincidem condições de clima úmido durante o florescimento e maturação do milho. As principais vias de infecção desse patógeno em espigas de milho são através do estilo estigma e por ferimentos nos grãos (KOEHLER, 1942; SUTTON, 1982; REID et al., 1996).

A podridão de giberela da espiga envolve o ataque direto do fungo aos grãos, os quais podem exibir sintomas da colonização, denominados de grãos ardidos. Além de afetar o valor econômico durante a comercialização, a presença de grãos ardidos altera o valor nutricional da ração pelo acúmulo de micotoxinas em grãos infectados que são indesejáveis a saúde humana e animal (MOLIN & VALENTINI 1999).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para o controle dos fungos agentes causais das podridões da espiga (CASA et al., 1995; PINTO et al., 1997; FERNANDES & OLIVEIRA, 2000; CASA et al., 2000; ZAMBOLIM et al., 2000; REIS et al., 2004b). No entanto, o controle da podridão da giberela a utilização dessas estratégias não tem sido satisfatório. O método mais eficiente para o controle da doença consiste na utilização de resistência genética do hospedeiro. A resistência genética a doenças pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno (PARLEVLIET, 1997). Dois tipos de resistência a podridões de espiga foram identificados em milho (CHUNGU *et al.*, 1996; REID *et al.*, 1996b). O primeiro tipo refere-se à resistência do estilo estigma e o outro a resistência do grão a infecção e colonização. A resistência à podridão de giberela é quantitativa (ALI et al., 2005). No Brasil não estão disponíveis pelas empresas que comercializam milho, informações de resistência genética específica para *F. graminearum*. Existem informações subjetivas para complexo de doenças da espiga e qualidade de grãos (EMYGDIO et al., 2013).

Um dos passos essenciais para o desenvolvimento de híbridos resistentes pelos programas de melhoramento é a identificação de fontes de resistência e a caracterização de genótipos. Estudos de reação de genótipos à podridão de giberela em espigas de milho foram reportados no Canadá (SCHAAFSMA et al., 1997) e na Argentina (PRESELLO et al., 2004). Porém nesses estudos não foram feitas especificações na metodologia considerando híbrido resistente, moderadamente resistente, moderadamente suscetível e suscetível. No Brasil são escassas as informações sobre a resistência de híbridos comerciais.

Outro ponto a considerar na avaliação de resistência pela intensidade da podridão de giberela é o fato de não ser consistente de ano para ano em condições de campo, sendo necessário à utilização de métodos de inoculação artificial que simulem diferentes modos de infecção natural do fungo. Alguns métodos testados até o presente momento demonstraram ineficácia para distinguir a reação de híbridos de milho à podridão de giberela (WARREN, 1978; GULYA et al., 1980; SUTTON & BALIKO, 1981; NASCIMENTO, 2010).

O desenvolvimento ou aprimoramento de técnicas de inoculação de *F. graminearum* em espigas e de métodos de quantificação e caracterização da resistência de híbridos à podridão de giberela em milho é fundamental para uma doença preocupante e de difícil controle por práticas culturais de cultivo.

Duas hipóteses foram fundamentadas nesta tese: 1) A identificação de híbridos contrastantes para resistência ou suscetibilidade à podridão de giberela pode ser explorada por diferentes métodos de inoculação do fungo em diferentes vias de infecção na espiga do milho; 2) Os híbridos com maior grau de resistência genética podem expressar o máximo potencial de rendimento e melhor qualidade de grãos.

O presente estudo foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo teve como objetivo comparar métodos de inoculação de *F. graminearum* em espigas de quatro híbridos de milho pela quantificação da severidade da doença e produtividade de grãos. No segundo capítulo foi determinada a reação de vinte híbridos de milho à podridão de giberela pela quantificação da incidência da doença, de grãos ardidos e da associação de *F. graminearum* nos grãos de milho. E no terceiro capítulo foi caracterizada a resistência dos vinte híbridos de milho à podridão de giberela com base numa escala de classes de intensidade de doença e suas correlações com produtividade de grãos e métodos de inoculação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O milho (*Zea mays*) é uma planta originária das Américas, pertencente à ordem *Poales*, família das *Poaceae* (gramíneas). Evidências científicas levam a crer que a planta foi domesticada pelos índios há 7.300 anos na região onde hoje se situa o México (Mundstok, 2004; Roney, 2009).

No Brasil, o cereal é cultivado em praticamente todos os estados brasileiros, apresentando expressão na agricultura em virtude do estabelecimento de grandes agroindústrias no País. É fundamental na cadeia produtiva de aves, suínos e bovinocultura leiteira, uma vez que é o principal insumo para a fabricação de rações. Aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70% e 80% do milho produzido no Brasil são destinados a essas cadeias produtivas. Tem destacada importância também na alimentação humana, produção de combustível etanol principalmente nos Estados Unidos, além de ser matéria prima para a fabricação dos mais variados produtos (EMBRAPA, 2011; EMYGDIO et al., 2013).

Na safra 2012/13 a área de milho no País foi de aproximadamente 15,4 milhões de ha, considerando primeira e segunda safra, com produção de 76,07 milhões de toneladas de grãos e produtividade média de 4,93 t ha⁻¹ (CONAB, 2013).

O Estado de Santa Catarina apresentou a terceira maior produtividade dentre todas as Unidades da Federação, com valores médios de 6,485 t ha⁻¹ e 536,7 mil hectares de área cultivada (CONAB, 2013).

Apesar da produtividade de grãos de milho no Estado de Santa Catarina ser superior à produtividade nacional, de acordo com SANGOI et al. (2010) este valor é ainda baixo se comparado aos rendimentos superiores a 10 t ha⁻¹ obtidos em condições experimentais. Em algumas regiões catarinenses rendimentos próximos a 16 t ha⁻¹ foram relatados em condições experimentais (SANGOI et al., 2004).

Diversos fatores afetam o estabelecimento de altas produtividades em milho, destacando-se fertilidade do solo, devido à aplicação de baixas doses de fertilizantes, disponibilidade hídrica irregular, população e arranjo de plantas inadequadas, época de semeadura imprópria, utilização de genótipos com baixo potencial de rendimento e não adaptados a região de cultivo, e ataque de pragas e doenças (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2003; SANGOI et al., 2010).

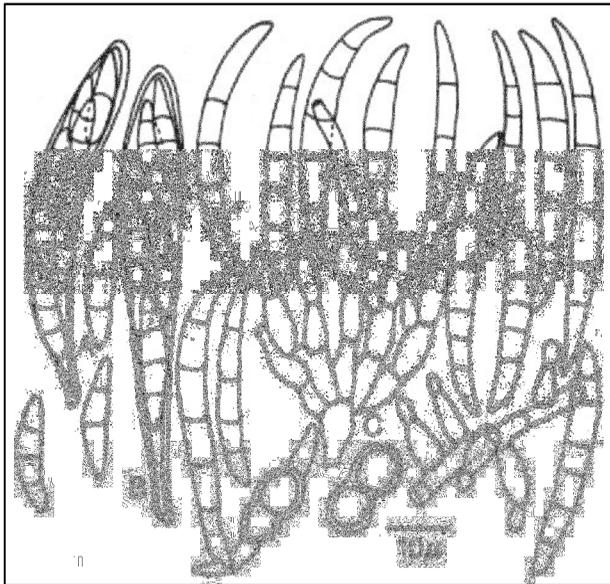
A ocorrência e a intensidade de doenças de espiga na cultura do milho são fatores que afetam a produtividade e a qualidade de grãos. Os danos decorrentes deste patossistema dependem de fatores que envolvem principalmente a genética, o clima e as práticas culturais (REIS et al., 2004). Na Região Sul do Brasil o fungo *F. graminearum*, está entre os principais agentes causadores de podridão de espiga (WORDELL FILHO & CASA, 2010).

A morfologia e o tipo de frutificação dos esporos são distintos para a fase assexuada e sexuada do fungo. Na forma anamórfica, *F. graminearum* pertence à divisão Amastigomycota, classe dos fungos mitospóricos, ordem Moniliales e família Tuberculariaceae. O teleomorfo, *G. zeae* pertence à divisão Amastigomycota, classe dos Ascomycetes, subclasse dos Pirenomycetes, ordem Hypocreales e família Nectriaceae (ALEXOPOULOS, 1962).

A forma vegetativa do fungo apresenta micélio septado, hialino e delgado. A frutificação de *F. graminearum* ocorre na forma de esporódóquio com fiáldes laterais curtas de 3,5-4,5 x 10-14 µm, que produzem apenas macroconídios, envoltos por uma matriz gelatinosa. Os conídios apresentam forma falcada, com ou sem a célula apical alongada, com uma célula pé bem característica, medindo 2,5-5 x 35-63 µm, com 3 a 7 septos (Figura 1). Os clamidósporos são globosos medindo de 10-12 µm de diâmetro simples ou em cadeia (BOOTH, 1971). As colônias do fungo apresentam coloração rosa-avermelhada e micélio aéreo pardo-amarelado (BOOTH, 1971; SUTTON, 1982).

O corpo de frutificação na forma morfológica *Gibberella* é um peritécio, contendo em seu interior ascas, cada uma com oito ascosporos (Figura 1). Os peritécios são ovoides em forma, com parede rugosa e de coração púrpura escura a preto, com diâmetro de diâmetro de 150-350 µm. As ascas são clavadas de 8-11 x 60-85 µm com estipe curta e parede delgada. Os ascosporos são hialinos ou pardo-claros, fusóides, geralmente com 3 septos e extremidades arredondadas e medem 3-5 x 17-25 µm (Figura 1) (BOOTH, 1971).

Figura 1: *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). A e B) ascas e ascosporos, C) conídios e conidióforos



Fonte: Booth, (1971).

A espécie *F. graminearum* pode ser composta por duas populações naturais: grupo I e grupo II (FRANCIS & BURGESS, 1977). AOKI e O'DONNELL (1999) descreveram o grupo I como sendo a população de *F. pseudograminearum* e o grupo II como sendo a população original de *F. graminearum*. A distinção dos dois grupos é feita pela observação da formação de peritécios. O fungo *F. graminearum* é homotático e forma peritécios em meio de cultura, sendo isolado em órgãos aéreos e fotossintéticos de milho e trigo. O grupo I não forma peritécios em cultura e está associado a podridões radiculares na cultura do trigo e é heterotático.

Os dois grupos podem coexistir numa mesma área, mas normalmente um grupo é dominante. O grupo I predomina em regiões secas e o grupo II em áreas úmidas (FRANCIS & BURGESS, 1977). A podridão de giberela em milho é causada pelo grupo II.

Subdivisões de *F. graminearum* têm sido propostas na literatura. CULLEN et al. (1982) propôs dois tipos, denominado 'A' e 'B', que diferem na morfologia, patogenicidade e produção de zearalenona, mas esta terminologia não tem sido amplamente utilizada e

a base genética para esta diferença não foi comprovada. Carter et al. (2002) identificaram três grupos distintos, denominados "A", "B" e "C" oriundos da Europa, Nepal e dos Estados Unidos. DESJARDINS et al. (2004) identificaram três grupos do Nepal. O'DONNELL et al. (2000; 2004) e WARD et al. (2002), identificaram nove linhagens filogenéticas de *F. graminearum* que podem ser identificados por sequenciamento de genes. Porém, não há evidências na literatura que estas linhagens pertençam a mais de uma espécie biológica. LESLIE & SUMMEREL (2006) recomendam que um único nome seja utilizado para todas as linhagens filogenéticas / espécies associadas a este grupo de fungos, ou seja, *F. graminearum*.

Estudos filogenéticos determinaram que *F. graminearum* constitui um complexo de pelo menos 15 espécies filogenéticas (SARVER et al., 2011). Essas espécies do complexo *F. graminearum* variam quanto ao genótipo e fenótipo químico (quimiotipo) tricoteceno, sendo os genótipos/quimiotipos desoxinivalenol (DON) e as suas duas formas acetiladas [3-A(acetil)DON e 15-ADON] e o nivalenol (NIV) os mais comumente identificados (O'DONNELL et al., 2004; DESJARDINS & PROCTOR, 2011).

Estudos populacionais do complexo *F. graminearum* no Brasil mostraram a ocorrência de múltiplas espécies desse complexo associado com trigo e cevada, com consistência entre a espécie e o genótipo tricoteceno: *F. meridionale* apresenta o genótipo NIV e *F. graminearum sensu stricto* (s.s.) o genótipo 15-ADON, sendo este último a espécie predominante nos dois cereais de inverno (>80%) (ASTOLFI et al., 2012; 2011).

O fungo infecta uma ampla gama de plantas cultivadas como trigo, triticale, cevada, aveia, centeio, azevém, arroz, milho, milheto, trevo, alfafa, batata-doce, sorgo (WIESE, 1987; REIS & CASA, 2007; MEDINA et al., 2009; SEGALIN & REIS, 2010), e soja (PANISSON et al., 2000; MARTINELLI et al., 2002). Há relatos da formação de peritécios em restos culturais das plantas cultivadas citadas acima e de outros hospedeiros secundários como algumas gramíneas nativas ou invasoras. O fungo também sobrevive nas sementes de cereais de inverno e milho (REIS et al., 2004; REIS et al., 2007).

Os peritécios de *G. zeae* são formados em plantas hospedeiras e restos culturais de diversas espécies vegetais entre 5 a 35 °C, com um ótimo de 29 °C (SUTY & MAULER-MACHNIK, 1996). TSCHANZ et al. (1975) verificou que houve aumento da produção de peritécios com a elevação da temperatura até 29 °C, não havendo produção dos mesmos

com temperaturas superiores e que *G. zeae* é insensível ao fotoperíodo, não necessitando de período escuro.

Os ascósporos são produzidos em temperaturas de 16°C a 31°C (ANDERSEN, 1948), com temperatura ótima para liberação ao redor de 16 °C e a temperatura máxima de 26°C (AYERS et al., 1975; TSCHANZ et al., 1975). Para liberação dos ascósporos ou conídios é necessário água do orvalho ou da chuva (SUTTON, 1982). Tanto os ascósporos quanto os macroconídios podem iniciar eficazmente infecções em plantas (STACK, 1989).

A podridão de giberela é mais frequente no Brasil em regiões de altitude onde predominam temperaturas amenas (CASA et al., 2011). A infecção do fungo está associada a condições de clima úmido (excesso de molhamento) durante o florescimento. De acordo com SUTTON (1982) para a ocorrência da infecção a temperatura ótima situa-se na faixa entre 25°C e 32°C, a presença de pólen, anteras, estilo-estigma e brácteas senescidas também podem atuar como potenciais substratos para o estabelecimento da infecção, sendo a presença de água essencial para a germinação dos esporos.

A infecção natural de giberela em milho geralmente começa pela ponta da espiga e progride em direção a base (Figura 2), sendo favorecida pelo mau empalhamento, por injúrias causadas por pássaros e insetos e pela germinação de esporos e penetração através dos estigmas até os grãos e sabugo (REID et al., 1992a). Considera-se que na natureza as principais vias de infecção de giberela em espigas de milho são através do estilo-estigma e de ferimentos nos grãos (KOEHLER, 1942; SUTTON, 1982; REID et al., 1996). Os ascósporos e conídios são levados até os estigmas pelo vento e por insetos (SUTTON, 1982; CHRISTENSEN & SCHNEIDER, 1950; LEW et al., 1991; FARRAH & DAVIS, 1991).

Figura 2: Sintoma de podridão de giberela em espiga de milho.



Fonte: Casa, (2012).

A ocorrência da podridão de giberela é esporádica, não sendo consistente de ano para ano em função da disponibilidade de inóculo e de período crítico favorável no momento de florescimento do milho. Técnicas de inoculação artificial que simulem os modos de infecção natural do fungo na espiga do milho são essenciais em programas de melhoramento visando à identificação de genótipos resistentes.

Diversas técnicas de inoculação artificial têm sido relatadas internacionalmente, com destaque para pulverizações de suspensão de macroconídios sobre os estigmas (WARREN, 1978; GULYA et al., 1980); injeção de esporos dentro do canal do estilo-estigma através da palha (REID et al., 1992a, 1993); inserção de palitos colonizados com o micélio do fungo inserido entre os estigmas (SUTTON & BALIKO, 1981); inoculação dos grãos envolvendo ferimentos da palha e do grãos (REID & HAMILTON, 1996); injúria mecânica nos grãos; ferimento dos grãos com pinos de aço imersos em suspensão de macroconídios (REID et al., 1996a); e injeção de macroconídios no estigma (REID et al., 1996a). No Brasil, 12 métodos de inoculação artificial foram comparados simulando a infecção via estilo-estigma e danos causados por insetos, variando em ausência de cobertura (câmara úmida), cobertura por 24 horas e por 48 horas (NASCIMENTO, 2010). Os resultados desse estudo mostraram não haver diferenças estatísticas significativas entre os métodos para a maioria dos híbridos avaliados.

A habilidade de infecção de *F. graminearum* em espigas de milho é influenciada pelas condições do estigma. REID et al. (1992a) relataram que a eficácia de inoculação no canal do estigma foi maior logo após o florescimento e diminuiu com a idade do estigma. Inoculações realizadas sete dias após o florescimento não permitiram diferenciar genótipos resistentes de suscetíveis. REID et al. (1996a) demonstraram maior severidade da giberela com inoculações de macronídios no canal do estilo-estigma no período de quatro a sete dias após a emissão do estigma.

A eficácia da inoculação dos grãos também é dependente do desenvolvimento da planta. REID & MATHER (1996) observaram que inoculações nos grãos de milho pelo método de ferimento no centro das espigas no período de dez a quinze dias após a emissão do estigma proporcionaram maior severidade da podridão de giberela permitindo discriminar genótipos com diferentes graus de resistência.

Estruturas físicas e compostos químicos são importantes mecanismos de defesa das plantas contra patógenos. De acordo com REID et al. (1992b), estilo-estigma novo é altamente receptivo ao patógeno. A proteção contra a infecção pode ser conseguida pela utilização de genótipos que apresentam um canal longo e abundante de estigmas. Um canal longo representa maior distância a ser percorrida pelo fungo, antes de atingir o sabugo e os grãos, e a maior abundância de estigmas funciona como barreira física contra o fungo, que pode parar ou retardar a colonização.

Em linhagem de milho mais resistente foi encontrado uma cera mais espessa sobre o estigma, quando comparado a cera de uma linhagem suscetível (BERGVINSON & REID, 1995). O tipo de endosperma também parece estar associado com a suscetibilidade a *Fusarium*. LOESCH et al. (1976), WARREN (1978) observaram que híbridos portadores do alelo opaquê-2 que é responsável por aumentar a lisina e o triptofano no endosperma mostraram-se mais suscetíveis a *F. graminearum* e *F. verticillioides* do que híbridos com endosperma normal.

As características morfológicas dos híbridos podem influenciar na reação de resistência. FARRAH & DAVIS (1991) relataram que híbridos portadores de palhas bem aderidas às espigas apresentaram menores sintomas de podridão de espiga por *Fusarium* quando comparadas a híbridos com empalhamento frouxo.

A espessura do pericarpo do grão pode ser um importante mecanismo de resistência, pois pericarpos mais grossos resistem melhor ao ataque de insetos e previnem que fungos entrem nos grãos através de

ferimentos de acordo com as observações de HOENISCH & DAVIS (1994).

Compostos fenólicos também parecem estar envolvidos com a resistência do estigma (REID et al., 1992b) e dos grãos (ASSABGUI et al., 1993) a podridão de giberela. REID et al. (1992b) relatam que a produção de compostos fenólicos após inoculações com *F. graminearum* no estilo-estigma foi incrementado em linhagens resistentes quando comparado a linhagem suscetível.

De acordo com ALI et al. (2005) existem dois mecanismos de resistência distintos que impedem a podridão de giberela. O primeiro refere-se à resistência do estigma que é a capacidade da espiga em prevenir a propagação do fungo para baixo do canal do estilo-estigma. Porém, este mecanismo não é totalmente compreendido, e é bem mais complexo do que uma barreira física (REID et al, 1992c;. REID et al. 1994). O segundo refere-se à resistência do grão que visa impedir a colonização do patógeno na espiga, uma vez que este tenha crescido quer para baixo do canal do estigma ou tenha sido introduzido através de ferimento. Portanto, os dois tipos de resistência tem sido estudados de forma independente, utilizando técnicas de inoculação diferenciais.

As espigas infectadas por fungos reduzem a produtividade e a qualidade dos grãos (BOUTIGNY et al., 2011). De acordo com VIGIER et al. (2001) danos na produtividade de até 48% foram estimados em híbridos suscetíveis a podridão de giberela.

A podridão de giberela envolve o ataque direto do fungo aos grãos, os quais podem exibir sintomas da colonização pela coloração rosada (Figura 3) (CASA et al., 2012). Os grãos com alteração normal da cor do tegumento ou do gérmen podem ser denominados de grãos ardidos ou avariados. No momento do recebimento do milho, em uma unidade de comercialização, é descontado do preço oferecido pelo produto um percentual correspondente à incidência de grãos ardidos.

Figura 3: Sintomas de grãos de milho rosados colonizados por *Fusarium graminearum*.



Fonte: Casa, (2012).

A presença de grãos ardidos altera o valor nutricional da ração (MOLIN & VALENTINI 1999). De acordo com LAZZARI (1997) os fungos alimentam-se dos grãos, farelos e rações, consumindo carboidratos e gordura, reduzindo a energia total do produto. NERBASS & CASA (2007) estimaram perda média de gordura de 28,85% e de proteína bruta de 3,5% ao comparar amostras de grão ardido em relação aos grãos regulares. Grãos ardidos também causam aumento na acidez do óleo no processo de fabricação do produto, incrementando custos com neutralização dessa acidez, diminuindo o rendimento do óleo e aumentando custos de clareamento. Prejudicam as características organolépticas dos produtos como presença de pontos pretos no amido e produtos finais e alteração da cor e sabor (STRAZZI, 1998).

O acúmulo de micotoxinas nos grãos infectados ou subprodutos representa um perigo para a saúde humana e animal (PRANDINI et al., 2009; SCUSSEL, 2002). Perdas provocadas por doenças em animais com reflexo no desenvolvimento destes e rejeição de produto pelo mercado importador são fatos marcantes do prejuízo causado pela produção de micotoxinas.

Isolados de *F. graminearum* podem produzir três importantes micotoxinas, zearalenona, nivalenol e deoxinivalenol (DON) (MARASAS et al., 1984). O nivalenol e o deoxinivalenol pertencem ao

grupo dos tricotecenos e seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese de proteínas, de DNA e RNA e acarretam efeitos imunossupressores e hemorrágicos (KIESSLING, 1986; LANGSETH & RUNDBERGET, 1998). No Sul do Brasil, os tricotecenos apresentam maior incidência em cereais e significativas concentrações são frequentemente detectadas em aveia, cevada, milho, trigo, enquanto níveis menores são verificados em arroz, centeio e sorgo (MALLMANN & DILKIN, 2009).

A zearalenona é um metabólito fúngico estrogênico não esteróide, sendo particularmente importante em estações de alta umidade relativa do ar, acompanhadas de temperaturas amenas. A ação desta toxina ocorre pelo estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, incrementando a síntese proteica do aparelho reprodutor. Consequentemente, a secreção das células endometriais, síntese das proteínas uterinas e o peso do trato reprodutivo são aumentados (SCUSSEL, 2008).

Estudos em 46.314 amostras de grãos no Brasil durante sete anos indicaram resultados positivos para DON e zearalenona com 23,5% e 45,1%, respectivamente (MALLMANN et al., 2012). No entanto, segundo WU (2007) não há dados suficientes para gerar uma análise completa e precisa dos impactos econômicos de micotoxinas no preço dos grãos.

Dentre as principais estratégias de controle dos fungos agentes causais das podridões da espiga na região Sul do Brasil destacam-se a rotação de culturas no verão com a soja ou feijão, a não semeadura do milho sobre restos culturais de gramíneas de inverno, evitar estresses na planta como o emprego de densidade de plantas acima do recomendado para o híbrido, escolha de híbridos com bom empalhamento da espiga, evitar injúrias causadas por insetos na espiga e evitar atraso na colheita (REIS et al., 2004; CASA et al., 2012; WORDELL FILHO & CASA, 2010). No entanto, para o controle da giberela a utilização destas estratégias não tem sido suficientes para obter controle satisfatório. De acordo com MUNKVOLD (2003) algumas práticas culturais que incluem rotação de culturas, plantio direto, épocas de semeadura, manejo da irrigação e fertilização apresentam efeitos limitados sobre a infecção de *G. zeae* em milho.

O desenvolvimento de epidemias é dependente da coincidência entre condições ambientais favoráveis e condições favoráveis à infecção do hospedeiro. De acordo com REIS (2011) manejar épocas de semeadura, como medida de evasão ou fuga, é uma estratégia viável na prevenção da doença. No entanto, de acordo com MUNKVOLD (2003)

a imprevisibilidade do ambiente pode afetar negativamente a eficácia desta estratégia. A meteorologia ainda não consegue prever condições ambientais para 70 a 90 dias após a semeadura, ou seja, é uma questão de sorte escalonar épocas de semeadura que não coincidam com ambiente favorável ao processo de infecção.

Além disto, *G. zae* possui ampla gama de hospedeiros, sendo dezenas de espécies de importância econômica, gramíneas nativas e plantas daninhas (WIESE, 1987; REIS, 1990b; FERNANDEZ & FERNANDES, 1990; MAULER-MACHNIK & ZAHN, 1994). REIS (2011) afirmou ser a rotação de culturas uma medida pouco viável no Sul do Brasil para o controle da giberela, devido à redução do inóculo primário, pois, o fungo apresenta habilidade saprofítica de colonização dos restos culturais sobre o solo, produzindo peritécios e liberando os ascósporos no ar praticamente todos os dias do ano.

Aplicação de fungicidas para o controle de giberela na cultura do trigo sob o sítio de infecção (antras) tem apresentado baixa eficiência de controle (MESTERHÁZU & BARTÓK, 1996). Para a cultura do milho são escassos estudos sobre a eficiência de fungicidas nos sítios de infecção (ANDRIOLI et al., 2013). E essas aplicações apresentam dificuldades, pois não se conhece exatamente a necessidade para híbrido e local, o momento ideal de aplicação, a tecnologia empregada para pulverização para a obtenção de resultados no controle da doença e seus efeitos sobre a polinização e fertilização.

A utilização de milho geneticamente modificado, contendo *Bacillus thuringiensis Berlinier* tem contribuído para a redução da infecção de *Fusarium* e de micotoxinas em grãos de milho, por conferir proteção às plantas contra injúrias causadas por insetos (MUNKVOLD et al., 1997, 1999; BAKAN et al., 2002; SCHAAFSMA et al., 2002). Todavia, somente a utilização desta estratégia não é suficiente, uma vez que fungos do gênero *Fusarium* apresentam mais de uma via de infecção nas espigas.

Quando existente o uso de híbridos com resistência genética é considerado método eficiente de controle da podridão de giberela. É essencial que programas de melhoramento identifiquem fontes de resistência e a caracterizem genótipos.

A resistência genética a doenças pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno (PARLEVLIET, 1997). ALI et al. (2005) reportou que a resistência à podridão de giberela é quantitativa e altamente influenciada pelo ambiente com distribuição dos scores de severidade contínuo, indicando que a resistência do estigma e dos grãos

são condicionadas por múltiplos genes. O estudo mapeou 11 posições genômicas (QTLs) para giberela após inoculação no canal do estilo estigma e 18 posições genômicas (QTLs) após inoculação da espiga com ferimentos nos grãos.

No Canadá, SCHAAFSMA et al. (1997) analisando a reação de 61 híbridos comerciais obtiveram dois híbridos com resistência moderada a podridão de giberela. Posteriormente, SCHAAFSMA et al. (2006) avaliaram híbridos à infecção de *F. graminearum* e *F. verticillioides* utilizando dois métodos de inoculação durante quatro anos. No primeiro ano de estudo avaliaram 37 híbridos, no segundo ano oito híbridos, no terceiro ano 24 híbridos e no quarto ano 20 híbridos. Concluíram neste estudo, que as taxas de severidade de giberela foram consistentes durante os três primeiros anos e semelhantes às encontradas por SCHAAFSMA et al. (1993).

Na Argentina, PRESELLO et al. (2004) avaliaram germoplasmas de milho argentinos como fonte para a resistência a *F. graminearum* e *F. verticillioides* e constataram menor severidade de podridão de espiga para *F. verticillioides*. Concluíram neste estudo, que os genótipos apresentaram maior resistência a fusariose. Fato que pode ser explicado pela prevalência de *F. verticillioides* na Argentina mais do que *F. graminearum*. E com isso, segundo os autores pode ter ocorrido uma co-evolução patógeno-hospedeiro para resistência a podridão de *F. verticillioides*.

No Brasil, são escassos os relatos sobre a resistência de híbridos de milho a podridão de giberela. NASCIMENTO (2010) classificou nove híbridos de milho no Estado do Paraná, sendo quatro híbridos considerados suscetível, quatro híbridos tolerantes e um moderadamente suscetível. Porém, neste trabalho à reação de híbridos à giberela não há especificações na metodologia sobre que é considerado um híbrido resistente, moderadamente resistente, tolerante, suscetível, e moderadamente suscetível. Ao analisar os resultados de severidade dos híbridos utilizados no estudo de Nascimento foi observado que não houve diferenças entre híbridos classificados como tolerantes, suscetível e moderadamente suscetível.

As empresas que produzem e comercializam sementes de milho quando caracterizam seus genótipos também disponibilizam de forma subjetiva informações para o complexo de doenças da espiga e raramente há informação específica da reação de um híbrido para um patógeno específico, no caso *F. graminearum*.

A podridão de giberela é problema no milho e em outras gramíneas cultivadas no Brasil em virtude de manutenção do inóculo do

fungo nos resíduos culturais presentes no sistema de Plantio Direto, sendo denominada de “doença do plantio direto”. A dificuldade de controle da doença por práticas culturais faz com que a caracterização de genótipos de milho a infecção de *F. graminearum* seja imediata e de fundamental prioridade dentro de programas melhoramento genético. Da mesma forma, ainda há necessidade de pesquisas relacionando a intensidade da podridão de giberela com perdas na cultura do milho, tanto no aspecto quantitativo como qualitativo.

3 CAPÍTULO 1: MÉTODOS DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE *FUSARIUM GRAMINEARUM*, SEVERIDADE DA GIBERELA EM ESPIGAS E PRODUTIVIDADE DE HÍBRIDOS DE MILHO

3.1 RESUMO

O fungo *Fusarium graminearum* causa redução na quantidade e qualidade de grãos de milho. Antes de iniciar um programa de melhoramento para a resistência à *F. graminearum*, métodos de inoculação eficientes devem ser desenvolvidos para auxiliar na identificação de híbridos resistentes. O objetivo deste trabalho foi comparar métodos de inoculação de *F. graminearum* em espigas de milho pela quantificação da severidade da doença e avaliar seu efeito na produtividade de híbridos. Três experimentos de campo foram realizados em três (ambientes) na safra 2011/12, testando quatro híbridos, dois resistentes (P30R50H, P30B30H) e dois suscetíveis (P3989 e P32R48H), dois isolados do fungo, quatro métodos de inoculação (injeção no canal do estilo-estigma, aspersão nos estigmas, ferimento dos grãos no centro da espiga e deposição na bainha da folha da espiga) e um tratamento controle (infecção natural). Houve diferença significativa na severidade da doença entre híbridos e métodos de inoculação para os dois isolados. Não houve diferenças entre isolados. O híbrido P32R48H apresentou maior severidade, diferindo significativamente dos demais híbridos avaliados. Houve diferença significativa na produtividade entre os híbridos avaliados. Contudo, somente o híbrido P30R50H apresentou diferença significativa entre os métodos de inoculação avaliados. Os métodos de inoculação de injeção no canal do estilo-estigma e ferimento dos grãos no centro da espiga apresentaram maior severidade da doença e podem ser utilizados em técnicas de avaliação da reação de híbridos de milho à podridão de giberela.

Palavras chaves: *Gibberella zeae*, inóculo, podridão de espiga, produtividade, *Zea mays*.

3.2 ABSTRACT

The *Fusarium graminearum* fungus causes a reduction in the quantity and quality of corn kernels. Before starting a breeding program for resistance to *F. graminearum* inoculation efficient methods must be developed to assist in the identification of resistant hybrids. The

objective of this study was to compare methods of inoculation of *F. graminearum* in corn ear by quantifying the severity of the disease and assess their reaction on the yield of hybrids. Three field experiments were conducted in three environment in 2011/12, testing four hybrids, two resistant (P30R50H, P30B30H) and two susceptible (P3989 and P32R48H), two isolates, four methods of inoculation (injection into the silk-channel, spray on silk, kernel-stab in center of ear and deposition in leaf), and a control treatment (natural infection). There were significant differences in disease severity between hybrids and methods of inoculation for the two isolates. There were no differences among isolates. The hybrid P32R48H showed greater severity, differing significantly from the other hybrids. There was a significant difference in yield between the hybrids. However, only the hybrid P30R50H showed significant difference between the methods of inoculation reviews. The methods of inoculation injection silk-channel and kernel-stab had greater disease severity and may be used in evaluation techniques of the reaction of maize hybrids to gibberella ear rot.

Key words: *Gibberella zeae*, inoculum, ear rot, yield, *Zea mays*.

3.3 INTRODUÇÃO

O potencial produtivo do milho é muitas vezes, comprometido pela ocorrência de doenças. Dentre as doenças mais importantes e de difícil controle, estão às podridões de espiga que reduzem a quantidade e qualidade dos grãos (WHITE, 1999; REID et al., 1999; PRESELLO et al., 2008).

O fungo *Fusarium graminearum* (Schwabe) [teleomorfo *Gibberella zeae* (Schw) Petch, agente causal da podridão de giberela ou podridão rosada da ponta da espiga é uma das principais doenças da espiga na Região Sul do Brasil (REIS et al., 2004a; WORDELL FILHO & CASA, 2010). O fungo ataca ampla gama de plantas cultivadas (SUTTON, 1982), sobrevivendo principalmente nos restos culturais de gramíneas de inverno (WIESE, 1987; FERNANDEZ & FERNANDES, 1990; DILL-MACKY & JONES, 2000) e de verão (KHONGA & SUTTON, 1988; REIS, 1990). Peritécios de *G. zeae* também foram encontrados em restos culturais de soja no Brasil (FERNANDEZ & FERNANDES, 1990) o que assegura a sobrevivência do fungo (ZAMBOLIM et al., 2000; PEREYRA et al., 2004; REIS & CASA, 2004a) e a liberação de ascosporos ao longo de praticamente todos os dias do ano (REIS, 1988; PANISSON et al., 2002). No Sul do Brasil

resíduos infectados de milho demoram mais de dois anos para serem mineralizados (CASA et al., 2003; REIS et al., 2011a). A situação se agrava com o cultivo de milho safrinha, devido manutenção e aumento da densidade de inóculo. Outra forma do potencial do inóculo está em áreas com presença de pastagem mantendo palha infectada de espécies de braquiárias e *Panicum* que garantem a produção de peritécios de *G. zeae* (PEREYRA & DILL-MACKY, 2008; CASA et al., 2010).

Os ascosporos liberados dos restos culturais são disseminados principalmente pelo vento até os estigmas das espigas de milho (SUTTON, 1982; MUNKVOLD, 2003b). A infecção ocorre pela germinação de esporos e penetração através dos estigmas com posterior colonização dos grãos e sabugo (REID et al., 1992a; REID & HAMILTON, 1996). A infecção também é favorecida pelo mau empalhamento expondo os grãos a injúrias causadas por pássaros, granizo e insetos (KOEHLER, 1942; MUNKVOLD, 2003b). Condições de clima úmido com presença de água para germinação dos esporos durante o florescimento e temperatura entre 25°C e 32°C favorecem o processo de infecção (SUTTON, 1982; REID et al., 1999; LOGRIECO et al., 2002).

A podridão de giberela é manifestada pela presença de mofo de coloração rosada iniciando geralmente na ponta e progredindo em direção à base da espiga (WHITE, 1999; REIS et al., 2004b). Quando a infecção ocorre no início do ciclo reprodutivo a podridão pode colonizar toda a espiga. Danos de até 48% foram observados em híbridos suscetíveis a podridão de giberela no Leste do Canadá (VIGIER et al., 2001).

Práticas culturais que envolvem rotação e sucessão de culturas, adubação equilibrada, épocas escalonadas de semeadura, arranjo e população de plantas, não tem tido sucesso satisfatório como estratégias de controle da doença (MUNKVOLD, 2003a; WORDELL FILHO & CASA, 2010; REIS et al., 2011b). Neste caso, a utilização de resistência genética do hospedeiro torna-se medida preferencial de controle. A resistência genética de plantas é um dos métodos mais eficientes e econômicos no controle de doenças (PATERNIANI et al., 2000). No entanto, no Brasil são escassas e imprecisas as informações de resistência à podridão de giberela, bem como de danos causados pela doença em híbridos de milho. Existem informações disponibilizadas pelas empresas que comercializam milho para o complexo de doenças da espiga ou qualidade de grãos, sem especificar qual o agente causal envolvido. A utilização de métodos de inoculação artificial é necessária e pode auxiliar na identificação de genótipos resistentes à podridão de

giberela e na quantificação da redução de produtividade causada pela doença.

Diversas técnicas de inoculação artificial foram descritas, dentre elas podem ser citadas pulverizações de suspensão de macroconídios sobre os estigmas (WARREN, 1978; GULYA et al., 1980); injeção de esporos dentro do canal do estilo-estigma através da palha (REID et al., 1992a, 1993); inserção de palitos colonizados pelo patógeno e colocados entre os estigmas (SUTTON & BALIKO, 1981); grãos infectados através fermentos com pinos de aço imersos em suspensão macronidial (REID & HAMILTON, 1996); ou infectados através de injeção de inóculo dentro dos grãos (REID et al., 1996).

No Brasil, NASCIMENTO, (2010) testou 12 métodos de inoculação artificial. Porém, os resultados deste trabalho demonstraram não haver diferenças estatísticas significativas entre os métodos para a maioria dos híbridos avaliados.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar métodos de inoculação artificial de *F. graminearum* em espigas de milho pela quantificação da severidade da doença e avaliar o seu efeito na produtividade de grãos.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na safra agrícola de 2011/12 em lavouras experimentais de milho, localizadas em áreas distintas do Sul do Brasil, nos municípios de Lages, SC e Cruz Alta, RS.

O município de Lages está localizado no Planalto Catarinense com coordenadas geográficas de 27° 48' 57'' de latitude Sul e 50° 19' 33'' de longitude oeste, com altitude aproximada de 916 metros do nível do mar, clima temperado, tipo Cfb segundo a classificação de Koeppen, precipitação média anual de 1300 mm, temperatura média de 14,3°C e umidade relativa do ar média de 79,3%. Cruz Alta está situada no Noroeste-Rio Grandense com altitude média de 452 metros do nível do mar e coordenadas geográficas de 28° 38' 19" de latitude Sul e 53° 36' 23" de longitude Oeste, clima subtropical, tipo Cfa, apresentando precipitação média anual de 1284,2 mm, temperatura média de 20°C e umidade relativa do ar de 74%.

As semeaduras foram realizadas em três ambientes, a primeira com início em 19/10/11 (ambiente 1, Cruz Alta), a segunda em 16/11/11 (ambiente 2, Cruz Alta) e a terceira em 13/12/2011 (ambiente 3, Lages). Foram utilizados quatro híbridos escolhidos com base nas características de resistência (P30B30H, P30R50H) e suscetibilidade (P32R48H,

P3989) à giberela fornecidas pelo departamento técnico da Pioneer Sementes. Os híbridos foram semeados de acordo com a quantidade de energia térmica exigido para o florescimento. No primeiro dia de semeadura em cada ambiente foram semeados os híbridos P3989 e P30B30H (soma térmica de 840 e 796), após dois dias o P30R50H (soma térmica de 766), e no sexto dia após início da semeadura o híbrido P32R48H (soma térmica 709), buscando florescimento em mesma época.

Foram comparados quatro métodos de inoculação de *F. graminearum* em espiga, e um tratamento controle com infecção natural. No estágio fenológico R1 – espigamento da escala de Ritchie et al (1993) foram feitas inoculações com injeção do inóculo no canal do estilo-estigma (ICEE), aspersão do inóculo no estigma (AIE) e deposição do inóculo na bainha da folha da espiga (DIBF). No estágio fenológico R2 – caracterizado pelo grão em estágio de bolha, a inoculação foi realizada por fermento dos grãos no centro da espiga (FGCE).

Utilizaram-se dois isolados de *F. graminearum* oriundos do Laboratório de Fitopatologia do CAV-UDESC (isolado MICOFIT0002 - isolado A) e do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre (isolado 09MI085 - isolado B). Os dois isolados foram identificados como espécie filogenética *F. meridionale* do genótipo tricoteceno nivalenol através de método molecular.

As suspensões macroconidiais de *F. graminearum* foram produzidas em colônias puras dos isolados em meio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar): 1,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de KNO_3 , 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO_4 , 0,2 g de Glucose, 0,2 g de Sacarose, 20 g de agar, diluídos em 1 L de água destilada. As colônias foram repicadas em placas de Petry de 9 cm de diâmetro, e mantidas em câmara de crescimento por dez dias a 25° C e fotoperíodo de 12 horas. Por raspagem, do meio de cultura foi obtida suspensão de inóculo, e posterior calibração da concentração mediante uso de hemacitômetro obtendo concentração final de 2×10^5 conídios por mL, e viabilidade dos conídios em meio de ágar-água de 90% de germinação para o isolado MICOFIT0002 e 85% para isolado 09MI085.

As inoculações dos diferentes métodos foram realizadas em 15 espigas superiores por tratamento, escolhidas aleatoriamente. Nos tratamentos de inoculação no canal do estilo-estigma e na bainha foliar foram depositados 2 mL da suspensão com o auxílio de seringas dosadoras com alimentação automática. Para o método de aspersão do

inóculo no estigma foi borrifado 2 mL da suspensão. O método de ferimento consistiu na perfuração dos grãos com técnica proposta por REID et al. (1996), utilizando quatro pinos de aço inoxidável dispostos em retângulo distanciados 7 mm x 5 mm na ponta de bastão de madeira de 2,5 cm x 50 cm que foi imerso na suspensão antes de cada ferimento.

Na área experimental de Cruz Alta/RS, foram realizadas irrigações de 15 mm de água a cada 48 h (durante o período da noite), desde a semeadura até a maturidade fisiológica da cultura, estas irrigações foram realizadas de acordo com as recomendações técnicas da Pioneer Sementes para suas áreas experimentais.

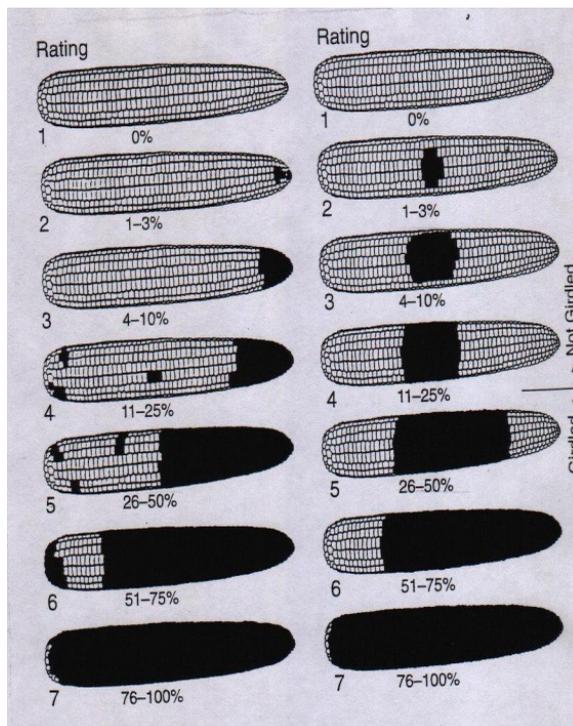
As unidades experimentais constaram de uma linha de 5,0 m de comprimento e espaçamento de 0,6 m entre linhas (isolado MICOFIT0002, 09MI085), com as populações (plantas ha⁻¹) recomendadas para cada híbrido: P30B30H (65.000), P30R50H (80.000), P32R48H (75.000) e P3989 (70.000).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com tratamentos arranjos num fatorial dentro dos blocos com quatro repetições.

Os tratos culturais realizados na região de Cruz Alta/RS foram três aplicações de 150 kg ha⁻¹ de uréia (45% N) nos estádios fenológicos V3, V5 e V7, duas aplicações de herbicidas (uma de atrazina e outra de atrazina+s-metolaclo), quatro aplicações de inseticidas (uma de metomil, duas de tiametoxan+lambd-cialotrina e uma de espinosade), e uma aplicação do fungicida azoxistrobina+ciproconazol em pré-ponderamento. Irrigações via sistema de pivô central foram feitas quando necessário de acordo com as exigências hídricas da cultura. No experimento de Lages/SC foram realizados duas adubações de cobertura de 200 kg ha⁻¹ de uréia nos estádios fenológicos V3 e V7 e duas aplicações de herbicida (uma de atrazina+simazina e outra de mesotriona).

As colheitas foram realizadas quando as espigas estavam com aproximadamente 22% de umidade dos grãos. As espigas foram colhidas manualmente, sendo despalhadas para identificação e quantificação da doença. A severidade foi avaliada com auxílio de escala diagramática proposta por REID et al. (1996) (Figura 4).

Figura 4: Escala diagramática para avaliação da severidade de giberela em espigas de milho inoculadas pelo estilo estigma e por ferimentos nos grãos.



Fonte: REID et al. (1996).

Nesse trabalho a escala de notas foi modificada para permitir sua utilização na equação integrada proposta por MCKINNEY (1923), para determinar a intensidade da giberela. A escala totalizou sete notas de severidade: 0 = ausência de sintomas; 1 = 1 a 3%; 2 = 4 a 10%; 3 = 11 a 25%; 4 = 26 a 50%; 5 = 51 a 75%; 6 = 76 a 100% de severidade na espiga.

$$\text{Intensidade de giberela} = \frac{\sum(\text{notas da escala} \times \text{frequência})}{(\text{n}^\circ \text{ plantas} \times 6)} \times 100$$

As espigas após as avaliações foram trilhadas e os grãos secos em secadores/estufa até a obtenção de peso constante. Os grãos foram pesados para obtenção da produtividade.

Os dados foram submetidos à análise de variância para cada ambiente e isolado do fungo e análise conjunta do ambiente e isolado, bem como suas interações com os demais fatores. Os valores de F para os efeitos principais e interações foram considerados significativos ao nível de significância de 5% ($P < 0.05$). As médias de cada tratamento foram comparadas entre si utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

3.5 RESULTADOS

Foram verificadas diferenças significativas ($P < 0.05$) para intensidade de giberela entre híbridos e entre métodos de inoculação nos três ambientes. Interações de métodos de inoculação com híbrido afetaram significativamente a intensidade da doença, para os dois isolados no ambiente 2, e para o isolado B no ambiente 3 (Tabela 1). Não houve diferença de isolados nos três ambientes conjuntamente analisados, demonstrando que ambos apresentaram níveis de agressividade semelhantes. Também não se evidenciou efeito significativo da interação método de inoculação versus isolado e híbrido versus isolado (Tabela 2).

Tabela 1: Resumo da análise de variância (ANOVA) quadrado médio do resíduo para os fatores de variação nos dados de intensidade de giberela e produtividade de grãos para métodos de inoculação, híbridos de milho e suas interações em três ambientes na safra agrícola de 2011/12.

| Fontes de variação | GL | Ambiente 1 | | Ambiente 2 | | Ambiente 3 | |
|--------------------|----|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|
| | | Intensidade de | Produtividade | Intensidade de | Produtividade | Intensidade de | Produtividade |
| | | Giberela | | Giberela | | giberela | |
| Isolado A | | | | | | | |
| Bloco | 3 | 78,78 | 2368400 | 65,10 | 411995 | 73,15 | 34229682* |
| Método (M) | 4 | 585,01* | 2222911 | 1254,20* | 13979740* | 1150,60* | 824850 |
| Híbrido (H) | 3 | 5170,43* | 70001801* | 14777,50* | 113909613* | 5183,41* | 67967621* |
| M x H | 12 | 43,18 | 1051304 | 149,30* | 3226611 | 97,50 | 6428398 |
| Isolado B | | | | | | | |
| Bloco | 3 | 127,77* | 4002043 | 131,40 | 4396891 | 60,61 | 18145365* |
| Método (M) | 4 | 568,01* | 6389438* | 2030,5* | 18059304* | 1453,92* | 5851729 |
| Híbrido (H) | 3 | 5730,39* | 66700171* | 13216,40* | 113288474* | 4139,43* | 62812947* |
| M x H | 12 | 66,56 | 2480194 | 163,40* | 2208890 | 235,61* | 4624741 |

*Significante $P < 0,05$.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Tabela 2: Resumo da análise de variância (ANOVA) conjunta dos três ambientes para intensidade de giberela.

| Fontes de variação | GL | Ambiente 1, 2, 3 |
|--------------------|-----|-------------------------|
| | | Intensidade de Giberela |
| Ambiente (A) | 2 | 88,45 |
| Bloco | 3 | 82,49 |
| Método (M) | 4 | 1910,40* |
| Híbrido (H) | 3 | 335,22* |
| Isolado (I) | 1 | 1,28 |
| A*M | 8 | 83,47 |
| A*H | 6 | 425,68* |
| A*I | 2 | 136,14 |
| M*H | 12 | 232,96* |
| M*I | 4 | 71,59 |
| H*I | 3 | 83,08 |
| M*H*I | 12 | 31,29 |
| A*M*I | 8 | 192,47* |
| Erro | 411 | 63,89 |

* Significante $P < 0,05$

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

As intensidades de giberela com a utilização do isolado A, variaram de 7,5% a 58,6% (ambiente 1), 2,20% a 73,3% (ambiente 2) e 6,0% a 55,4% (ambiente 3). Para avaliações com o isolado B, as intensidades da doença variaram de 7,2% a 58,3% (ambiente 1), 1,9% a 70,8% (ambiente 2) e 5,9% a 50,8% (ambiente 3) (Tabela 3). Considerando os híbridos, o P32R48H apresentou maior suscetibilidade à podridão de giberela. Os híbridos P30B30H, P30R50H e P3989 demonstraram menor intensidade média de doença, independente do local e isolado.

Para a variável intensidade da giberela em função dos métodos de inoculação com o isolado A não foram verificadas diferenças estatísticas significativas nos híbridos P32R48H e P30R50H no ambiente 1. Entretanto, para os híbridos P30B30H e P3989 foi verificado efeito. Para o isolado B, houve diferenças estatísticas em todos os híbridos utilizados em função dos métodos de inoculação. Nos ambientes 2 e 3 apenas o material P32R48H não apresentou diferença significativa. Fato que pode estar relacionado com o elevado grau de suscetibilidade apresentado por este híbrido em todos os ensaios, não possibilitando desta forma a diferenciação de métodos de inoculação.

O tratamento controle (infecção natural) apresentou os menores valores médios de intensidade de giberela, variando de 15,7% a 17,2% em todos os ambientes.

O método de aspersão de inóculo no estilo estigma permitiu simular a infecção natural. No entanto, foram encontradas intensidades médias de giberela semelhantes ao método de deposição de inóculo na bainha da folha da espiga.

De qualquer forma, nos três ambientes verificou-se que os métodos de injeção no canal do estilo-estigma e de ferimentos nos grãos no centro da espiga propiciaram maior intensidade média de doença. O método de ferimento nos grãos em ambos os ambientes incrementou a intensidade de giberela quando comparado ao controle (infecção natural) e o método de injeção no canal do estilo-estigma diferiu do controle somente no ambiente 3 (Figura 5).

Quanto à produtividade houve diferença significativa entre híbridos em todos os ambientes para os dois isolados estudados. Interações significativas não foram verificadas entre métodos de inoculação e híbridos em todos os ambientes (Tabela 1).

Para métodos de inoculação houve diferenças significativas somente no ambiente 2 nos híbridos P30R50H com isolado A e P30B30H e P30R50H com isolado B. O método de ferimento no centro dos grãos da espiga se destacou com efeito negativo na produtividade

com danos nestes híbridos de 20,8%, 15,1% e 20,7%, respectivamente. O método de injeção no canal do estilo-estigma também afetou a produtividade nos materiais P32R48H e P3989 (Tabela 4).

Os maiores valores de produtividades foram obtidos nos ambientes 1 e 2 com os materiais P3989 e P30B30H, seguidos pelos híbridos P30R50H e P32R48H (Tabela 4). Esta resposta deve-se possivelmente ao manejo utilizado nestas áreas, principalmente a utilização de irrigação.

Dentre os híbridos, o híbrido P30B30H apresentou maior estabilidade quanto à produtividade que os demais, quando submetido a diferentes métodos de inoculação artificial (Tabela 4).

No ambiente 3, foi verificado um comportamento diferente dos híbridos quanto à produtividade. O P30R50H apresentou maior produtividade média embora não tenha diferido dos híbridos P3989 e P30B30H (Tabela 4). O método de inoculação de fermento no centro dos grãos da espiga neste material não afetou negativamente a produtividade como ocorreu nos ambientes 1 e 2 (Tabela 4).

Tabela 3: Intensidade de giberela (%) em espigas de híbridos de milho comparando diferentes métodos de inoculação de dois isolados do fungo *Fusarium graminearum* em três ambientes conduzidos na safra agrícola de 2011/12.

(Contínua)

| Híbrido | Métodos de Inoculação | | | | | | CV (%) |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|-------|--------|
| | Natural | Injeção canal-estigma | Aspersão estigma | Ferimento Grãos | Deposição Foliar | Média | |
| Ambiente 1 | | | | | | | |
| Isolado A | | | | | | | |
| P32R48H | 34,2 A ns | 52,8 A | 47,2 A | 58,6 A | 50,0 A | 48,6 | 26,1 |
| P30B30H | 11,7 B b | 26,1 B a | 14,4 B ab | 19,7 B ab | 17,5 B ab | 17,9 | 30,4 |
| P3989 | 10,0 B b | 16,6 B b | 10,3 B b | 20,0 B a | 13,0 B ab | 14,0 | 25,2 |
| P30R50H | 7,5 B ns | 25,8 B | 15,3 B | 21,9 B | 19,7 B | 17,9 | 56,8 |
| Média | 15,8 | 30,2 | 21,8 | 30,1 | 25,1 | | |
| CV (%) | 35,2 | 24,5 | 33,5 | 18,1 | 58,3 | | |
| Isolado B | | | | | | | |
| P32R48H | 37,2 A b | 52,2 A ab | 42,2 A b | 58,3 A a | 49,4 A ab | 47,9 | 18,6 |
| P30B30H | 11,6 B c | 19,4 B ab | 13,3 B bc | 20,5 B a | 15,0 B abc | 16,0 | 19,4 |
| P3989 | 10,0 B b | 9,4 B b | 10,2 B b | 26,3 B a | 7,2 B b | 12,7 | 53,5 |
| P30R50H | 9,4 B b | 9,4 B b | 15,3 B ab | 25,3 B a | 9,4 B b | 13,8 | 37,1 |
| Média | 17,1 | 22,6 | 20,3 | 32,6 | 20,3 | | |
| CV (%) | 33,4 | 28,6 | 35,0 | 21,2 | 27,1 | | |
| Ambiente 2 | | | | | | | |
| Isolado A | | | | | | | |
| P32R48H | 58,1 A ns | 73,3 A | 60,3 A | 72,2 A | 68,9 A | 66,6 | 16,1 |
| P30B30H | 3,6 B c | 33,1 B a | 7,5 B bc | 20,6 B ab | 3,1 B c | 13,6 | 48,4 |
| P3989 | 4,4 B b | 12,5 C b | 5,0 B b | 32,5 B a | 6,6 B b | 12,2 | 40,6 |
| P30R50H | 2,20 B c | 15,0 B Cab | 9,40 B bc | 23,10 B a | 5,0 B bc | 10,9 | 44,5 |
| Média | 17,1 | 33,5 | 20,6 | 37,1 | 20,9 | | |
| CV (%) | 37,4 | 28,6 | 23,8 | 21,3 | 29,2 | | |

Tabela 3: Intensidade de giberela (%) em espigas de híbridos de milho comparando diferentes métodos de inoculação de dois isolados do fungo *Fusarium graminearum* em três ambientes conduzidos na safra agrícola de 2011/12.

(Conclusão)

| Híbrido | Métodos de Inoculação | | | | | | Média | CV (%) |
|-------------------|-----------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|--------|
| | Natural | Injeção | | Aspersão | Ferimento | Deposição | | |
| | | canal-estigma | estigma | estigma | Grãos | Foliar | | |
| Isolado B | | | | | | | | |
| P32R48H | 52,8 A ns | 70,8 A | 56,7 A | 70,6 A | 68,3 A | 63,8 | 21,2 | |
| P30B30H | 4,2 B b | 17,8 Bab | 5,0 B b | 29,4 B a | 3,1 B b | 11,9 | 57,1 | |
| P3989 | 3,9 B b | 7,2 B b | 8,1 B b | 40,8 B a | 7,8 B b | 13,6 | 33,1 | |
| P30R50H | 1,9 B b | 9,4 B b | 6,9 B b | 36,1 B a | 5,0 B b | 11,9 | 49,6 | |
| Média | 15,7 | 26,3 | 19,2 | 44,2 | 21,0 | | | |
| CV (%) | 57,2 | 28,1 | 25,5 | 28,5 | 28,7 | | | |
| Ambiente 3 | | | | | | | | |
| Isolado A | | | | | | | | |
| P32R48H | 41,3 A ns | 55,4 A | 45,0 A | 53,3 A | 44,2 A | 47,8 | 24,0 | |
| P30B30H | 10,0 B c | 18,7 B b | 13,7 B bc | 28,3 B a | 11,5 B bc | 16,5 | 23,6 | |
| P3989 | 8,7 B b | 14,6 B b | 9,3 B b | 42,3 AB a | 11,7 B b | 17,3 | 44,5 | |
| P30R50H | 8,7 B b | 14,8 B b | 6,0 B b | 27,1 B a | 11,6 B b | 13,6 | 38,2 | |
| Média | 17,2 | 25,9 | 18,5 | 37,8 | 19,7 | | | |
| CV (%) | 55,8 | 21,6 | 30,3 | 25,7 | 32,9 | | | |
| Isolado B | | | | | | | | |
| P32R48H | 41,7 A ns | 45,8 A | 49,6 A | 50,8 A | 44,2 A | 46,4 | 24,6 | |
| P30B30H | 11,5 B b | 29,3 A a | 14,0 B b | 26,2 B a | 13,5 B b | 18,9 | 26,6 | |
| P3989 | 8,5 B b | 38,7 A a | 10,3 B b | 48,7 A a | 10,4 B b | 23,3 | 45,5 | |
| P30R50H | 6,7 B b | 28,4 A a | 5,9 B b | 20,0 B ab | 8,3 B b | 13,9 | 61,6 | |
| Média | 17,1 | 35,6 | 19,9 | 36,5 | 19,1 | | | |
| CV (%) | 49,9 | 41,1 | 43,9 | 17,8 | 23,1 | | | |

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Tabela 4: Rendimento de grãos em quatro híbridos de milho comparando diferentes métodos de inoculação de dois isolados do fungo *Fusarium graminearum* em três ambientes conduzidos na safra agrícola de 2011/12.

(Contínua)

| Híbrido | Rendimento de grãos (kg.ha ⁻¹) | | | | | | Média | CV (%) |
|-------------------|--|-----------------------|------------------|-----------------|-----------|--------|-------|--------|
| | Natural | Métodos de Inoculação | | | foliar | | | |
| | | Injeção canal-estigma | Aspersão estigma | Ferimento grãos | | | | |
| Ambiente 1 | | | | | | | | |
| Isolado A | | | | | | | | |
| P32R48H | 13.059 B ns | 12.003 B | 12.624 B | 11.748 C | 12.059 B | 12.299 | 11,9 | |
| P30B30H | 16.071 A ns | 15.620 A | 15.812 A | 15.887 A | 16.567 A | 15.991 | 5,9 | |
| P3989 | 16.247 A ns | 16.847 A | 16.284 A | 14.829 AB | 16.240 A | 16.086 | 8,1 | |
| P30R50H | 13.264 B ns | 14.478 AB | 13.451 B | 12.835 BC | 13.689 AB | 13.543 | 8,8 | |
| Média | 14.660 | 14.737 | 14.543 | 13.825 | 14.634 | | | |
| CV (%) | 6,4 | 8,2 | 7,6 | 8,9 | 11,0 | | | |
| Isolado B | | | | | | | | |
| P32R48H | 13.417 B ns | 12.049 C | 13.026 B | 11.678 B | 12.412 B | 12.516 | 8,3 | |
| P30B30H | 16.371 A ns | 15.600 AB | 15.979 A | 16.187 A | 15.159 A | 15.859 | 8,1 | |
| P3989 | 17.086 A ns | 16.712 A | 15.728 A | 14.209 AB | 17.603 AB | 16.268 | 11,0 | |
| P30R50H | 13.729 B ns | 13.741 BC | 14.342 AB | 11.802 B | 13.639 B | 13.451 | 10,9 | |
| Média | 15.151 | 14.525 | 14.769 | 13.469 | 14.703 | | | |
| CV (%) | 7,8 | 9,4 | 8,6 | 13,3 | 9,9 | | | |

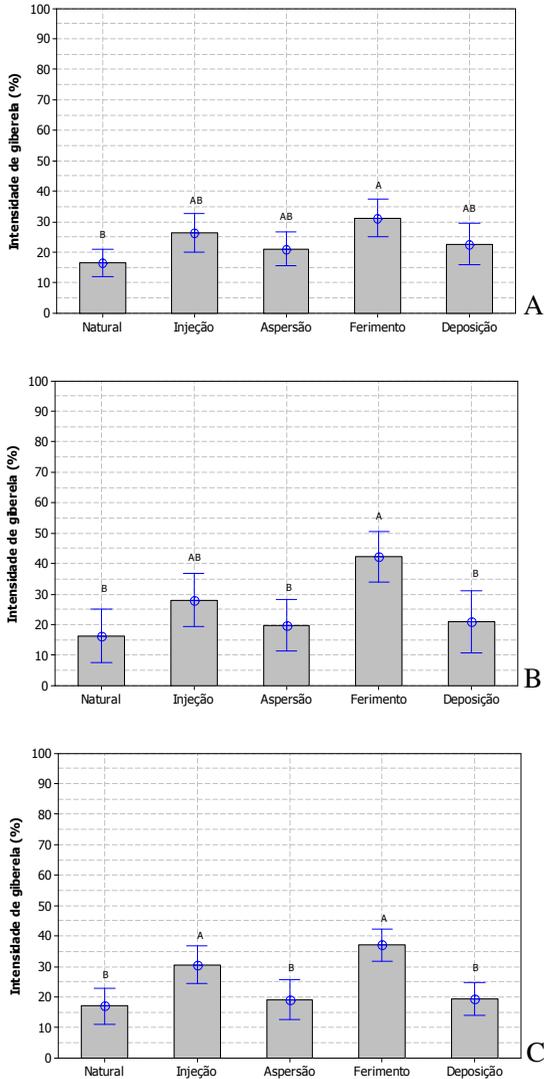
Tabela 4: Rendimento de grãos em quatro híbridos de milho comparando diferentes métodos de inoculação de dois isolados do fungo *Fusarium graminearum* em três ambientes conduzidos na safra agrícola de 2011/12.

| | | Rendimento de grãos (kg.ha ⁻¹) | | | | | | |
|-------------------|---------------|--|-------------|-------------|--------------|-----------|--------|--|
| | | Métodos de Inoculação | | | | | | |
| | | Injeção | Aspersão | | Ferimento | Deposição | | |
| Híbrido | Natural | canal-estigma | estigma | grãos | foliar | Média | CV (%) | |
| Ambiente 2 | | | | | | | | |
| Isolado A | | | | | | | | |
| P32R48H | 11.370 B ns | 9.292 A | 10.876 C | 11.289 A | 10.374 B | 10.640 | 21,5 | |
| P30B30H | 17.846 A ns | 15.180 A | 15.746 AB | 14.775 A | 15.220 A | 15.753 | 10,8 | |
| P3989 | 16.306 A ns | 14.130 A | 17.646 A | 14.237 A | 15.918 A | 15.648 | 16,5 | |
| P30R50H | 15.636 A a | 14.144 A ab | 14.171 B ab | 12.386 A b | 13.138 AB ab | 13.895 | 10,2 | |
| Média | 15.290 | 13.187 | 14.610 | 13.172 | 13.663 | | | |
| CV (%) | 6,9 | 22,7 | 9,4 | 19,9 | 10,6 | | | |
| Isolado B | | | | | | | | |
| P32R48H | 11.294 B ns | 10.121 B | 10.683 C | 9.878 B | 9.553 C | 10.306 | 17,4 | |
| P30B30H | 14.321 Ab ab | 14.793 AB a | 15.462 AB a | 12.162 AB b | 14.927 AB a | 14.333 | 6,9 | |
| P3989 | 17.562 A ns | 15.480 A | 17.008 A | 13.544 A | 16.231 A | 15.965 | 14,1 | |
| P30R50H | 14.603 A B ab | 14.677 AB a | 14.077 B ab | 11.578 AB b | 13.596 B ab | 13.706 | 10,3 | |
| Média | 14.445 | 13.768 | 14.308 | 11.791 | 13.577 | | | |
| CV (%) | 12,8 | 17,9 | 8,4 | 13,2 | 6,4 | | | |
| Ambiente 3 | | | | | | | | |
| Isolado A | | | | | | | | |
| P32R48H | 10.064 A ns | 8.271 B | 8.988 A | 8.600 B | 9.347 B | 9.054 | 20,3 | |
| P30B30H | 12.440 A ns | 12.430 AB | 11.994 A | 11.403 AB | 11.543 AB | 11.962 | 22,1 | |
| P3989 | 11.450 A ns | 13.947 A | 11.538 A | 10.315 AB | 10.142 AB | 11.478 | 23,4 | |
| P30R50H | 12.793 A ns | 1.2.332 AB | 12.304 A | 15.054 A | 15.016 A | 13.500 | 21,9 | |
| Média | 11.686 | 11.745 | 11.206 | 11.343 | 11.512 | | | |
| CV (%) | 18,3 | 21,1 | 26,1 | 23,4 | 22,2 | | | |
| Isolado B | | | | | | | | |
| P32R48H | 9.677 A ns | 9.938 A | 8.523 A | 8.319 A | 9.578 B | 9.207 | 15,8 | |
| P30B30H | 12.497 A ns | 12.642 A | 12.961 A | 12.043 A | 11.506 AB | 12.330 | 23,5 | |
| P3989 | 11.683 A ns | 10.065 A | 11.600 A | 9.745 A | 13.003 AB | 11.219 | 25,4 | |
| P30R50H | 13.365 A ns | 11.387 A | 12.711 A | 13.703 A | 15.553 A | 13.344 | 19,8 | |
| Média | 11.805 | 11.008 | 11.449 | 10.952 | 12.410 | | | |
| CV (%) | 22,9 | 16,9 | 24,3 | 23,9 | 20,9 | | | |

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. NS = não significativo.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Figura 5: Intensidade média de giberela para quatro métodos de inoculação e um tratamento controle (infecção natural) avaliados nos ambientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C).



Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

3.6 DISCUSSÃO

As diferenças de intensidade média da doença encontrada entre os híbridos, independente do ambiente e isolado, sugerem o envolvimento de mecanismos que inibem a infecção e a colonização de *F. graminearum*. ALI et al. (2005) relata a existência de dois mecanismos de resistência distintos que impedem a podridão de giberela. O primeiro refere-se à resistência do estigma que é a capacidade do genótipo em prevenir a infecção e colonização do fungo para o interior do canal do estilo-estigma. Porém, este mecanismo não é totalmente compreendido, e é mais complexo do que uma barreira física (REID Et al., 1992b; REID et al., 1994). O segundo refere-se à resistência do grão, que retarda a colonização do patógeno na espiga, uma vez que este tenha crescido para o interior do canal do estigma ou tenha sido introduzido por ferimento.

A maior severidade de espigas gibereladas com a utilização dos métodos de inoculação com injeção no canal do estilo-estigma e de ferimentos nos grãos do centro da espiga já havia sido relatada anteriormente em trabalhos realizados no Canadá, por CHUNGU et al. (1996), REID et al. (1996) e SCHAAFSMA et al. (1993). REID et al. (1992a) concluíram que o método de injeção no canal do estilo-estigma foi consistente, permitindo diferenciar genótipos resistentes de suscetíveis. No trabalho realizado por Chungu et al. (1996), os autores relataram que o método do ferimento nos grãos produziu elevada severidade da doença nos quatro ambientes avaliados. A área do sintoma de podridão foi dependente somente da resistência do grão à giberela. SCHAAFSMA et al. (1993) concluíram que métodos de inoculação artificial que utilizam injúrias nos grãos e aplicações de inóculo dentro das brácteas resultam em maior severidade de podridões de espiga. CLEMENTS et al. (2003) avaliaram quatro métodos de inoculação em Illinois, e somente o método de injeção de inóculo através das brácteas incrementou a severidade da fusariose e permitiu a diferenciação de genótipos. De acordo SCHAAFSMA et al. (1993) o sucesso da infecção de um método de inoculação é dependente do estágio fenológico da planta. Inoculações realizadas nas primeiras semanas após o espigamento e métodos que causam ferimentos na planta são menos dependentes do tempo. Os métodos de inoculação com injeção no canal do estilo estigma e de ferimentos nos grãos do centro da espiga apresentaram estas características, onde o inóculo foi depositado em contato direto com o estigma e grãos na fase inicial de desenvolvimento (estádio fenológico R1 e R2). No Brasil, NASCIMENTO (2010) testou

12 métodos de inoculação artificial com *F. graminearum* simulando a infecção via estilo-estigma e danos causados por insetos, variando em ausência de cobertura (câmara úmida), cobertura por 24e por 48 h, entretanto, não foram encontradas diferenças entre os métodos de inoculação não permitindo a diferenciação de reação entre os híbridos.

A severidade da doença verificada no tratamento controle (infecção natural) pode ser atribuída à disponibilidade de ascósporos no ambiente, devido ao acúmulo de restos culturais infectados de trigo que antecederam a cultura do milho nos três ensaios. De acordo com SUTTON (1982) e PEREYRA & DILL-MACKY (2008) as principais fontes de inóculo de *F. graminearum* são restos culturais de milho, principalmente colmos e espigas infectadas, e restos culturais de trigo. SCHAAFSMA et al. (2005) também apontam que a manutenção dos resíduos culturais no solo contribui para manutenção do inóculo de *F. graminearum* entre as estações de cultivo. STUMPF et al. (2013) relatam que possivelmente a maior quantidade de inóculo de *F. graminearum* no Sul do Brasil deve-se a sucessão trigo-milho.

A menor intensidade de doença com os métodos de deposição de inóculo na bainha da folha da espiga e aspersão no estigma deve-se provavelmente a ocorrência do secamento do inóculo concordando com trabalhos realizados por REID et al (1996) e CLEMENTS et al. (2003) em que verificaram baixa severidade de doença com o método de aspersão no estilo-estigma.

Infecções de espigas com *F. graminearum* provocaram danos na produtividade corroborando com BOUTIGNY et al. (2011) em que comprova que espigas infectadas por fungos reduzem o rendimento dos grãos, e com VIGIER et al. (2001) em que danos na produtividade foram estimados em até 48% em híbridos suscetíveis a podridão de giberela.

Dentre os métodos de inoculação os que proporcionaram consistência de resposta à intensidade da giberela foi o de fermento nos grãos e injeção no canal do estilo estigma. Contudo, o que resultou na maior eficiência e exequibilidade foi o método de fermento nos grãos, apesar de propiciar também a colonização de outros fungos saprófitas. O método de injeção no canal do estilo estigma pode propiciar o desperdício de inóculo, quando se trabalha com híbridos que apresentam um canal menor e um volume elevado e compactado de estigma, além de demandar mais tempo.

Os resultados de produtividade demonstraram estabilidade dos genótipos, independente do método de inoculação utilizado e isolado.

Demonstrando desta forma, que as companhias produtoras de sementes de milho estão produzindo materiais produtivos.

Atualmente existem poucas pesquisas relacionando resistência do estigma com resistência dos grãos e um número bem restrito de genótipos disponíveis com boa resistência a ambos os modos de infecção do fungo (REID et al., 2003). LÖFFLER et al. (2010) verificou variações genotípicas significativas para a resistência dos grãos e do estigma. As correlações entre estas resistências foram moderadas, porém houve genótipos com níveis de resistência muito distintos.

3.7 CONCLUSÃO

Os métodos de inoculação através de ferimento nos grãos e injeção no canal do estilo-estigma apresentaram resposta consistente à intensidade da giberela e devem ser utilizados conjuntamente para avaliar níveis de resistência e suscetibilidade de híbridos.

4 CAPÍTULO 2: INCIDÊNCIA DE PODRIDÃO DE GIBERELA, GRÃOS ARDIDOS E *Fusarium graminearum* NOS GRÃOS DE HÍBRIDOS DE MILHO COM INOCULAÇÃO DO FUNGO NO CANAL DO ESTILO ESTIGMA E POR FERIMENTO DOS GRÃOS.

4.1 RESUMO

As informações de resistência genética de híbridos de milho à podridão de giberela são escassas no Brasil. O objetivo deste estudo foi determinar a reação de 20 híbridos de milho à podridão de giberela com inoculações do fungo *F. graminearum* no canal do estilo-estigma (estádio fenológico R1) e por ferimento dos grãos no centro da espiga (estádio fenológico R2). Os híbridos foram semeados em dois ambientes na safra de 2012/13, no município de Cruz Alta, RS. O delineamento experimental foi blocos casualizados com tratamentos arranjos num fatorial dentro dos blocos com quatro repetições. Na colheita foi quantificada a incidência de espigas doentes, de grãos ardidos e de *F. graminearum* nos grãos. Houve efeito significativo do ambiente, método de inoculação e híbridos, com interações dupla e tripla, e correlações significativas entre as variáveis. O método de inoculação com ferimento dos grãos propiciou acréscimos de 41,5% na incidência de espigas gibereladas, 48,8% de grãos ardidos e 47,2% na incidência de *F. graminearum* nos grãos em relação ao método de injeção no canal do estilo-estigma. Houve efeito de híbridos na incidência de espigas giberelas com valores de 37,2% a 95,6%, incidência de grãos ardidos com valores 2,1% a 17,0% e incidência de *F. graminearum* nos grãos 4,0% a 29,3%. O híbrido P4285 apresentou os menores valores de incidência de espigas gibereladas (37,2 %), grãos ardidos (2,1%) e incidência de *F. graminearum* nos grãos (4,0%) considerando os dois ambientes e métodos de inoculação. A resistência para infecção via estigma não implicou em resistência para a infecção e colonização do grão. Correlações genotípicas podem ser utilizadas para seleção indireta de grãos ardidos com base na incidência de espigas gibereladas e seleção indireta de *F. graminearum* nos grãos com base nos dados de incidência de grãos ardidos após inoculação.

Palavras-chave: *Gibberella zeae*, incidência, mecanismos de resistência, métodos de inoculação, *Zea mays*.

4.2 ABSTRACT

The genetic resistance information of maize hybrids to gibberella ear rot is scarce in Brazil. The aim of this study was to determine the reaction of 20 corn hybrid gibberella ear rot with inoculations the fungus *F. graminearum* in silk-channel (pollination stage R1) and wounding the kernels in center of ear (pollination stage R2). The hybrids were planted in two environments in 2012/13, in Cruz Alta, Rio Grande do Sul. Experimental design was randomized complete blocks with treatments arranged in a factorial with four replications. At the harvest was quantified the incidence of gibberella ear rot of kernels rot and *F. graminearum* in kernel. There was a significant effect of environment, inoculation method and hybrid, with double and triple interactions, and significant correlations between variables. The method of inoculation wounding the kernels provided increase of over 41.5% in the incidence of gibberella ear rot, 48.8% of rot kernels and 47.2% in the incidence of *F. graminearum* in the kernels in relation to the injection method in the silk-channel. There was an effect of genotype on the incidence of gibberella ear rot with values of 37.2% to 95.6%, incidence of rot kernels with values 2.1% to 17.0% and the incidence of *F. graminearum* in the kernels to 4.0% 29.3%. The genotype P4285 had the lowest incidence gibberella ear rot (37.2%), rot kernels (2.1%) and incidence of *F. graminearum* in the kernels (4.0%) considering the two environments and methods of inoculation. The resistance to infection via silk not involved in resistance to infection and colonization of the kernel. Genotypic correlations may be used for indirect selection of rot kernels based on the incidence of gibberella ear rot and indirect selection of *F. graminearum* in kernel based on incidence data of rot kernel after inoculation.

Key-words: *Gibberella zeae*, incidence, mechanisms of resistance, methods of inoculation, *Zea mays*.

4.3 INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium graminearum* (Schwabe), teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein. Petch), causador da podridão de giberela, está entre os principais agentes causais de doenças da espiga do milho no Sul do Brasil (WORDELL FILHO & CASA, 2010). A doença reduz produtividade e qualidade de grãos em situações de cultivo onde ocorre

excesso de chuva nas fases de polinização e formação dos grãos do cereal.

A maior intensidade da doença ocorre onde há maior disponibilidade de inóculo do fungo, que sobrevive formando peritécios abundantemente nos resíduos culturais de muitas gramíneas, principalmente nos cereais de inverno que é cultivado antecedente ao cultivo do milho no sul do Brasil (REIS & CASA, 2004; STUMPF et al., 2013).

O processo de infecção do fungo nas espigas ocorre com maior frequência quando ocorrem dias cumulativos de chuva e temperatura entre 25°C e 32°C durante o florescimento do milho (Sutton, 1982; Reid et al., 1999; Munkvold, 2003). As principais vias de infecção são através do estilo estigma e de ferimentos nos grãos (KOEHLER, 1942; SUTTON, 1982; REID et al., 1996a).

As espigas infectadas apresentam redução no rendimento (VIGIER et al., 2001) e na qualidade dos grãos (BOUTIGNY et al., 2011). Pela colonização do fungo nos grãos, que podem exibir coloração rosada, configurando grão ardido ou grão avariado de acordo com a Instrução Normativa MAPA 60/2011 (BRASIL, 2011), ocorre desvalorização do cereal devido descontos de acordo com a incidência desses grãos. A percentagem de grãos ardidos é utilizada para classificar o milho quanto a qualidade, tipo 1 (até 1%), 2 (até 2%) e 3 (até 3%), acima de 5% os grãos são considerados fora do padrão de qualidade (BRASIL, 2011). A presença de ardidos também altera o valor nutricional dos grãos (NERBASS & CASA, 2007; STRINGHINI et al., 2000). A qualidade é comprometida, principalmente, pelo acúmulo de micotoxinas nos grãos infectados, os quais representam um perigo para a saúde humana e animal (D'MELLO, 1999; BEREK et al., 2001; CREPPY, 2002)

Isolados de *F. graminearum* podem produzir três importantes micotoxinas, como a zearalenona (ZEA), nivalenol e deoxinivalenol (DON) (LOGRIECO et al., 2002). As micotoxinas pertencentes ao grupo dos tricotecenos (nivalenol, deoxinivalenol) acarretam efeitos imunossupressores e hemorrágicos predispondo animais a várias doenças e mascarando outras toxicoses (PRELUSKY et al., 1994; PESTKA & BONDY, 1994; PESTKA, 2010). Em humanos efeitos imunossupressores dos tricotecenos foram provados por BEREK et al. (2001). A zearalenona foi relacionada a problemas reprodutivos em animais, por estimular receptores estrogênicos citoplasmáticos, como consequência se tem tamanho reduzido de animais, síndrome estrogênica e infertilidade masculina (PRELUSKY et al., 1994).

Enquanto em humanos, os efeitos de contaminação influenciam a produção hormonal em crianças (SZÜTS et al., 1997). Estudos de incidência de micotoxinas em milho no Brasil mostraram resultados elevados e positivos para DON e para zearalenona (MALLMANN et al., 2012).

A severidade de giberela e a concentração de micotoxinas produzidas em grãos infectados variam entre genótipos de milho e apresentam correlações positivas após inoculações artificiais (REID et al., 1996b; BOLDUAN et al., 2009; LÖFFLER et al., 2010).

Estudos avaliando intensidade de giberela em híbridos de milho foram realizados no Canadá (REID et al., 1993; SCHAAFSMA et al., 1997; PRESELLO et al., 2004; SCHAAFSMA et al., 2006). Porém, pouco se conhece sobre a reação dos genótipos cultivados no Brasil. Além disso, as companhias de sementes quando caracterizam seus materiais disponibilizam informações que envolvem o complexo de podridões das espigas e raramente informam a reação do híbrido para o patógeno específico. Assim, é importante caracterizar a reação de genótipos a infecção do fungo *F. graminearum* em espigas de milho bem como correlacionar a incidência de espigas gibereladas com a incidência de grãos ardidos e o patógeno nos grãos.

O objetivo deste estudo foi quantificar a reação de híbridos de milho à infecção e colonização de *F. graminearum* nos grãos em função de diferentes métodos de inoculação artificial do fungo.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram instalados na safra agrícola de 2012/2013 na área experimental da Empresa Du Pont do Brasil - Subdivisão Pioneer Sementes, situada no município de Cruz Alta na Região Noroeste do Rio Grande do Sul, altitude média de 452 metros ao nível do mar, coordenadas geográficas de 28° 38' 19" de latitude Sul e 53° 36' 23" de longitude Oeste e clima subtropical com as quatro estações bem definidas.

Cada híbrido foi semeado lado a lado dentro dos blocos, entretanto, as unidades experimentais constaram de quatro linhas de 4 m de comprimento com espaçamento de 0,60 m entre linhas para cada híbrido. Somente as duas linhas centrais de cada unidade experimental foram inoculadas (primeira linha central com inoculação no canal do estilo estigma e segunda linha central com ferimento dos grãos no centro da espiga). As duas linhas laterais foram utilizadas como bordadura. Foram semeadas aproximadamente 35 sementes de cada híbrido por

linha e no estádio fenológico V3 da escala de Ritchie foi realizado o desbaste deixando uma população de 65.000 plantas ha⁻¹.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições, arranjos num fatorial dentro dos blocos.

Foram realizadas sementeira em dois ambientes, a primeira iniciando em 06/11/2012 (ambiente 1) e a segunda iniciando em 26/11/2012 (ambiente 2). Os híbridos foram semeados de acordo com a quantidade de energia térmica exigido para o florescimento. Portanto, foram semeados em seis datas distintas em cada ambiente para que coincidissem o florescimento e as inoculações do fungo no mesmo momento e com condições ambientais semelhantes. As temperaturas foram gravadas diariamente e em intervalos de 2 horas, desde o primeiro dia de cada sementeira até o dia 11/02/2013 por um registrador de dados localizado dentro da área experimental da Pioneer Sementes.

Foram utilizados 20 híbridos comerciais: Dow2B587HX, AG1656PRO2, AG9040YG, AG8025PRO, AG9010PRO, DKB240PRO2, DKB250PRO2, AS1555PRO, Status 7205, BG7049H, 30K64HNSR, 30S31H, P4285, P1630H, P32R48H, P30F35YH, P3646H, P30S31HR, P30K64YH, P30S31YH. Estes foram escolhidos de acordo com a expressividade de cultivo fornecido pelas companhias de sementes na região Sul do Brasil.

Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com a exigência da cultura do milho e as indicações técnicas da Pioneer Sementes, onde foram realizadas três aplicações de 150 kg ha⁻¹ de uréia nos estádios fenológicos V3, V5 e V7 da escala de RITCHIE et al. (1993), duas aplicações de herbicidas (uma de atrazina na dose de 3.000 g ha⁻¹ e outra de atrazina + s-metolaclo 1.850 + 1.450 g ha⁻¹), quatro aplicações de inseticidas (uma de metomil 154,8 g ha⁻¹, duas de tiametoxan + lambda-cialotrina 42,3 + 31,8 g ha⁻¹ e uma de espinosade 48 g ha⁻¹).

Foram utilizados dois métodos de inoculação artificial, inoculados cada um em 15 espigas superiores por parcela. O primeiro método consistiu de injeção no canal do estilo-estigma (CHUNGU et al., 1996) de 2 ml de suspensão macroconidial com concentração de 1×10^5 esporos mL⁻¹, injetados com o auxílio de uma seringa dosadora com alimentação automática. O segundo método envolveu ferimento nos grãos e palha no centro da espiga (REID & HAMILTON 1996a) via perfuração com 4 pinos de aço inoxidável, montados em um retângulo, distanciados 7mm x 5mm sob um cilindro de madeira de 2,5cm x 50cm. Os pinos de aço do inoculador foram mergulhados em uma suspensão de macroconídios com concentração de 1×10^5 esporos/mL, antes do procedimento dos ferimentos na espiga. Desta forma, os

macroconídios foram transportados para dentro dos fermentos através dos pinos de aço ou por capilaridade.

As suspensões macroconidiais foram compostas pela mistura de dois isolados de *F. graminearum*, sendo obtidos de espigas naturalmente infectadas da região de Palotina - PR (isolado MICOFIT0005) e Uberlândia - MG (isolado MICOFIT0004).

Para a obtenção das suspensões macroconidiais foram produzidas colônias dos isolados em meio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), mantidas em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h (LESLIE & SUMMERELL, 2006), para posterior raspagem com o auxílio de água destilada estéril. Após a raspagem das placas de petri as suspensões foram filtradas em uma peneira para retirada de impurezas e em seguida a concentração de macroconídios foi medida e ajustada com auxílio de um hemacitômetro.

As inoculações da mistura de isolados ocorreram durante os estádios R1 – espigamento e R2 – grão em estágio de bolha (RITCHIE et al., 1993; REID et al., 1992; REID et al., 1996 a). Foram realizadas irrigações de 15 mm de água a cada 48 horas (durante o período da noite), desde a semeadura até a maturação fisiológica da cultura. Estas irrigações foram realizadas de acordo com as recomendações técnicas da Pioneer Sementes para suas áreas experimentais.

As colheitas da primeira e segunda época de semeadura foram realizadas aos 67 e 61 dias após as inoculações na fase de polinização.

As avaliações de patometria (incidência de espigas gibereladas, incidência de grãos ardidos, e incidência de *F. graminearum* nos grãos) foram realizadas em cada parcela. As espigas foram colhidas manualmente, sendo despalhadas para quantificação da infecção de giberela. A incidência foi calculada através da porcentagem de espigas inoculadas apresentando sintomas de podridão rosada da espiga.

As espigas após as avaliações de incidência foram secas em secadores experimentais, até atingirem peso constante e em seguida foram trilhadas na Unidade de Beneficiamento de Sementes da Pioneer, localizada em Santa Rosa – RS. Em uma amostra de 250 g foi determinado à incidência de grãos ardidos (ardidos = descoloração de mais de um quarto da superfície total do grão) no laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agroveterinárias, conforme critério estabelecido na portaria nº11, de 12/04/96 (BRASIL, 1996).

A incidência de fungos nos grãos foi determinada em cada tratamento pelo teste de sanidade em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Em cada caixa de acrílico, foram semeados 25 grãos, e um total de 400 grãos por tratamento. O material foi incubado em câmara de

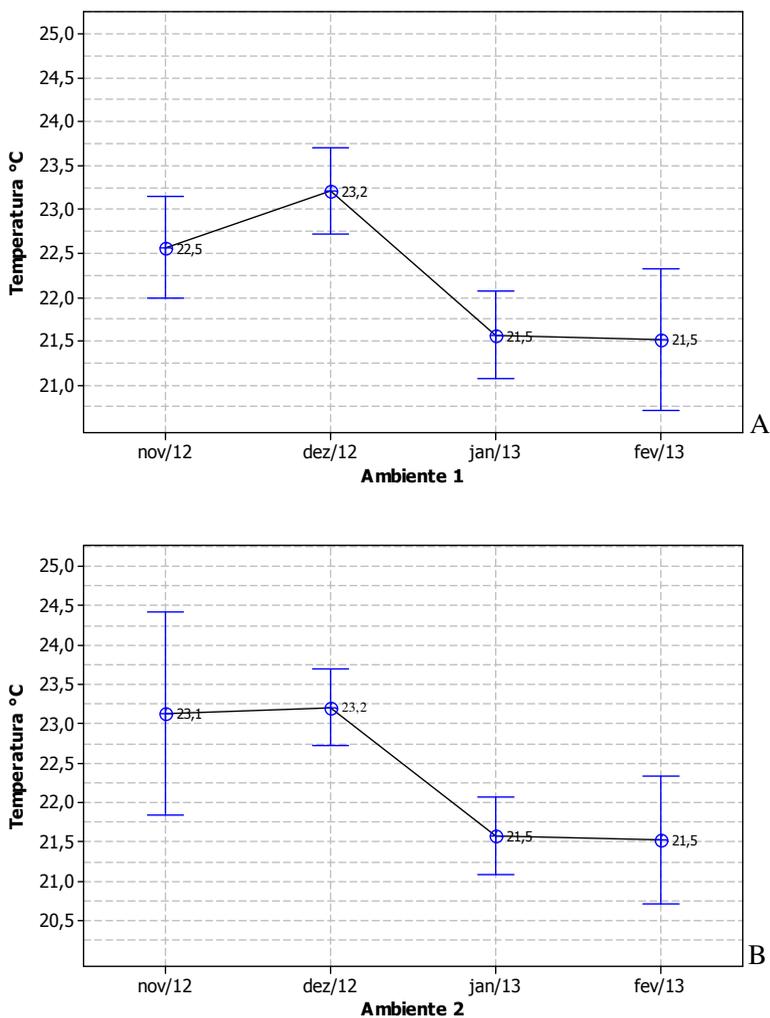
crescimento, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h, durante sete dias. Sob lupa estereoscópica e microscópio ótico foram identificados e quantificados os fungos presentes. Foi considerado infectado o grão sob os quais foram detectadas colônias, esporos e corpos de frutificação do fungo *F. graminearum*. Os dados foram expressos em incidência.

Os dados foram avaliados estatisticamente através da técnica de análise de variância. Os dados obtidos de incidência de grãos ardidos foram transformados utilizando $(x+1)^{1/2}$. Os resultados das médias foram comparados pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.5 RESULTADOS

A média de temperatura no mês de novembro no ambiente 1 foi mais baixa que a média de temperatura no ambiente 2 (Figura 6). Para todas as variáveis analisadas foi observado efeito significativo de ambiente, método de inoculação (injeção e ferimento), híbrido, interação dupla “ambiente x híbrido”, e de interação tripla de “ambiente x método de inoculação x híbrido”. Sendo a interação dupla “ambiente x método de inoculação” significativo somente para a variável incidência de espigas gibereladas. Para a interação dupla “método de inoculação x híbrido” o efeito significativo foi verificado para incidência de espigas gibereladas e incidência de *F. graminearum* nos grãos (Tabela 5).

Figura 6: Temperatura média referente ao período 06/11/12 a 11/02/13 (ambiente 1 - A) e 26/11/2012 a 11/02/2013 (ambiente 2 - B). Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13.



Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Tabela 5: Resumo da análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação nos dados de incidência de espigas giberelada, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em amostra homogênea de grãos para os ambientes 1 e 2, métodos de inoculação (injeção e ferimento), híbridos de milho e suas interações, safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.

| Causa de variação | Quadrado Médio do Resíduo | | | |
|--------------------------|---------------------------|---------------------|----------------------------|--|
| | GL | Incidência (%) | | |
| | | Espigas gibereladas | Grãos ardidos ¹ | <i>Fusarium graminearum</i> ¹ |
| Ambiente (A) | 1 | 1.236,5* | 14,897*** | 62,841*** |
| Bloco (B) | 3 | 157,4 | 0,6226 | 0,488 |
| Método de Inoculação (M) | 1 | 118.757,8*** | 5,1283*** | 128,349*** |
| Híbrido (H) | 19 | 3.178,7*** | 5,5427*** | 10,7*** |
| A x M | 1 | 2.703,6*** | 0,7834 | 1,928 |
| A x H | 19 | 353,3* | 1,8579*** | 5,365*** |
| M x H | 19 | 1.220,3*** | 0,4378 | 2,619** |
| A x M x H | 19 | 370,8* | 0,6226* | 4,834*** |
| Erro | 237 | 202,0 | 0,3497 | 1,132 |
| Total | 319 | | | |
| C.V. (%) | | 19,4 | 22,9 | 29,1 |

Diferença significativa pelo teste F *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

¹Dados transformados $(x+1)^{1/2}$

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

No ambiente 1 houve menor incidência de espigas gibereladas (5,1%) e de *F. graminearum* nos grãos (33,5%) em relação ao ambiente 2. Por outro lado, houve maior incidência de ardidos (33,7%) (Tabela 6). Uma das hipóteses para o fato foi à colonização dos grãos por outros patógenos presentes na área, como *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. e *Stenocarpella* sp. identificados e isolados nas amostras de grãos através do teste de sanidade.

Tabela 6: Efeito do ambiente na incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em amostra homogênea de grãos de vinte híbridos de milho na safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.

| Ambiente | Incidência (%) | | |
|-------------------------|---------------------|----------------------------|--|
| | Espigas gibereladas | Grãos ardidos ¹ | <i>Fusarium graminearum</i> ¹ |
| Ambiente 1 ^x | 71,5 | 8,0 | 12,1 |
| Ambiente 2 ^y | 75,4 | 5,3 | 18,2 |
| Diferença | 3,9* | 2,7** | 6,1** |
| C.V. (%) | 19,3 | 22,7 | 29,0 |

^xSemeadura a partir do dia 06/11/2012; ^ySemeadura a partir do dia 26/11/2012

Diferença significativa pelo teste *P < 0.05, **P < 0.001

¹Dados transformados (x+1)^{1/2}; valores de médias não transformados.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

O método de ferimento dos grãos no centro das espigas propiciou acréscimos de 41,5% na incidência de espigas gibereladas, 48,8% de grãos ardidos e 47,2% na incidência de *F. graminearum* nos grãos em relação ao método de injeção no canal do estilo-estigma (Tabela 7).

Tabela 7: Efeito de método de inoculação na incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em amostra homogênea de grãos de 20 híbridos de milho na safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.

| Métodos | Incidência (%) | | |
|-----------|---------------------|----------------------------|------------------------------------|
| | Espigas gibereladas | Grãos ardidos ¹ | <i>F. graminearum</i> ¹ |
| Injeção | 54,2 | 4,5 | 10,5 |
| Ferimento | 92,7 | 8,8 | 19,9 |
| Diferença | 38,5* | 4,3* | 9,4* |
| C.V. (%) | 19,3 | 22,7 | 28,9 |

Diferença significativa pelo teste F *P < 0.001

¹Dados transformados (x+1)^{1/2}; valores de médias não transformados.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

O método de injeção no canal do estilo-estigma propiciou incidência de espigas gibereladas semelhantes tanto no ambiente 1 quanto

no ambiente 2 com valores de 55,1% e 53,2%, respectivamente. Entretanto, o método de fermentos nos grãos propiciou um aumento de 9,8% na incidência de espigas gibereladas no ambiente 2 (Tabela 8).

Tabela 8: Interação entre ambiente 1 e 2 e método de inoculação na incidência média de espigas gibereladas de vinte híbridos de milho na safra agrícola de 2012/13. Cruz Alta, RS.

| Método de inoculação | Incidência (%) | |
|----------------------|----------------|------------|
| | Ambiente 1 | Ambiente 2 |
| Injeção | 55,1 | 53,2 |
| Ferimento | 87,8 | 97,6 |
| Diferença | 32,7* | 44,4* |
| C.V. (%) | 19,9 | 18,8 |

Diferença significativa pelo teste F *P < 0.001

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Nos dois ambientes o método de fermento dos grãos propiciou as maiores intensidades da doença (Tabela 9, 10). Na semeadura realizada na primeira quinzena de novembro (ambiente 1) a análise de médias deu origem a quatro grupos distintos quanto a incidência de espigas gibereladas após inoculação no canal do estilo-estigma, sendo que os híbridos P4285 e Status apresentaram as menores médias (0,0% e 15,6%), seguidos pelos híbridos AG9010PRO e DKB250PRO2 (28,7% e 33,4%) demonstrando menor suscetibilidade a doença. Enquanto os híbridos P1630H, P32R48H e P30F35YH apresentaram as maiores médias de espigas gibereladas (100,0% a 86,7 %). No meio destes dois grupos constam os híbridos com incidência de espigas gibereladas intermediária. Quando foi utilizado o método de fermento dos grãos a análise de médias deu origem a três grupos em que o híbrido P4285 (53,7%) foi o mais resistente à infecção e colonização dos grãos, seguido pelos híbridos AS1555PRO, AG9040YG, P30K64YH, Status, 30K64HNSR e AG8025PRO (70,0% a 82,6%). Entretanto, estes valores de incidência foram elevados. Em relação à incidência de grãos ardidos os híbridos P1630H e P32R48H apresentaram valores acima de 20% de incidência, enquanto os híbridos P4285, AG8025PRO, AG9040YG, 30K64HNSR e P30K64YH apresentaram os menores valores de grãos ardidos, considerando os dois métodos de inoculação. Entre os genótipos avaliados diferenças significativas na incidência de F.

graminearum nos grãos foram observadas em ambos os métodos de inoculação. O método de inoculação no canal do estilo estigma deu origem a três grupos distintos de híbridos e o de fermento nos grãos de milho a dois grupos. Os híbridos que obtiveram as menores incidências de *F. graminearum* nos grãos considerando os dois métodos de inoculação foram 30S31H, P4285, P30K64YH, P30S31YH, DKB250PRO2, P3646H, AG1656PRO2, AS1555PRO, Dow2B587HX, AG8025PRO, BG7049H e AG9040YG com valores variando de 1% a 9% após inoculação no canal do estilo-estigma e 4% a 18% após inoculação por fermento nos grãos (Tabela 9).

Na semeadura realizada na segunda quinzena de novembro (ambiente 2) a análise das médias deu origem a dois grupos distintos de híbridos quanto a incidência de espigas gibereladas, independente do método de inoculação, incidência de grãos ardidos e incidência de *F. graminearum* nos grãos após inoculação no canal do estilo estigma. Os híbridos P4285, Status, DKB250PRO2, AG8025PRO, DKB240PRO2, AG9010PRO, Dow2B587HX, AS1555PRO, AG9040YG, AG1656PRO2, 30K64HNSR e P30K64YH apresentaram os menores valores de incidência de espigas gibereladas após inoculação no canal do estilo estigma. Com a utilização do método de fermentos dos grãos somente o híbridos P4285 diferiu estatisticamente dos demais. O híbrido P32R48H foi o que apresentou maior incidência de grãos ardidos (9,3%) pelo o método de injeção no canal do estilo-estigma e não houve diferenças significativas entre os materiais quando submetidos ao método de inoculação de fermentos nos grãos. Houve diferenças significativas entre os híbridos avaliados na incidência de *F. graminearum* nos grãos independente do método de inoculação. Os híbridos P4285, Dow2B587HX e 30K64HNSR apresentaram as menores incidências de *F. graminearum* nos grãos considerando os dois métodos de inoculação (Tabela 10).

Os resultados apontam que houve diferenças entre mecanismos de resistência na planta, ou seja, um híbrido pode apresentar grau de resistência mais elevado quando submetido à inoculação via canal do estilo-estigma e apresentar suscetibilidade quando inoculado por fermentos nos grãos.

Tabela 9: Incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em grãos de híbridos de milho comerciais submetidos a dois métodos de inoculação do fungo em semeadura na primeira quinzena do mês de novembro de 2012 (ambiente 1). Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13.

| Híbrido | Espigas Gibereladas (%) | | Grãos Ardidos (%) ³ | | <i>Fusarium graminearum</i> (%) ³ | |
|------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|--|------------------------|
| | Estilo-estigma ¹ | Ferimento ² | Estilo-estigma ¹ | Ferimento ² | Estilo-estigma ¹ | Ferimento ² |
| Dow2B587HX | 58,9 b | 93,6 a | 5,1 c | 7,6 c | 2,0 c | 16,0 b |
| AG1656PRO2 | 57,8 b | 94,1 a | 3,8 c | 7,7 c | 8,0 c | 8,0 b |
| AG9040YG | 47,3 b | 71,7 b | 2,1 c | 6,8 d | 5,0 c | 18,0 b |
| AG8025PRO | 43,9 b | 82,6 b | 2,7 c | 3,5 d | 9,0 c | 10,0 b |
| AG9010PRO | 28,7 c | 91,1 a | 3,2 c | 11,3 c | 18,0 b | 7,0 b |
| DKB240PRO2 | 62,6 b | 98,2 a | 5,0 c | 9,9 c | 16,0 b | 20,0 b |
| DKB250PRO2 | 33,4 c | 91,7 a | 1,5 c | 7,9 c | 3,0 c | 11,0 b |
| AS1555PRO | 48,2 b | 70,0 b | 3,1 c | 10,0 c | 2,0 c | 16,0 b |
| Status | 15,6 d | 77,1 b | 2,1 c | 5,9 d | 15,0 b | 12,0 b |
| BG7049H | 55,6 b | 95,0 a | 3,1 c | 7,6 c | 5,0 c | 16,0 b |
| 30K64HNSR | 60,6 b | 78,7 b | 4,4 c | 4,5 d | 12,0 b | 9,0 b |
| 30S31H | 59,3 b | 96,9 a | 2,2 c | 9,7 c | 1,0 c | 6,0 b |
| P4285 | 0,0 d | 53,7 c | 0,6 c | 4,1 d | 4,0 c | 4,0 b |
| P1630H | 100,0 a | 100,0 a | 29,6 a | 25,3 a | 29,0 a | 45,0 a |
| P32R48H | 93,2 a | 96,4 a | 20,4 b | 21,1 a | 21,7 a | 29,0 a |
| P30F35YH | 86,7 a | 96,7 a | 13,2 b | 9,9 c | 11,0 b | 12,0 b |
| P3646H | 63,3 b | 100,0 a | 8,3 c | 16,6 b | 2,0 c | 13,0 b |
| P30S31HR | 68,5 b | 98,3 a | 3,1 c | 15,7 b | 1,0 c | 48,0 a |
| P30K64YH | 68,5 b | 75,9 b | 4,5 c | 5,5 d | 2,0 c | 8,0 b |
| P30S31YH | 57,6 b | 95,0 a | 3,3 c | 9,3 c | 2,0 c | 10,0 b |
| Média | 55,1 | 87,8 | 6,1 | 10,0 | 8,3 | 15,9 |
| C.V. (%) | 28,1 | 14,4 | 28,1 | 16,3 | 36,4 | 31,6 |

¹Suspensão macronidial de 2 mL de *F. graminearum* na concentração de 100.000 esporos/mL injetados dentro do canal do estilo-estigma.

² Ferimento nos grãos com pinos de aço mergulhados em uma suspensão macronidial de *F. graminearum* na concentração de 100.000 esporos/mL.

³ Dados transformados $(x+1)^{1/2}$; valores de médias não transformados.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Tabela 10: Incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em grãos de híbridos de milho comerciais submetidos a dois métodos de inoculação do fungo em semeadura na segunda quinzena do mês de novembro de 2012 (ambiente 2). Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13.

| Híbrido | Espigas | | Grãos | | <i>Fusarium graminearum</i> | |
|------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | Gibereladas (%) | | Ardidos (%) ³ | | (<i>%</i>) ³ | |
| | Estilo-estigma ¹ | Ferimento ² | Estilo-estigma ¹ | Ferimento ² | Estilo-estigma ¹ | Ferimento ² |
| Dow2B587HX | 39,7 b | 100,0 a | 0,9 b | 7,5 a | 5,0 b | 8,0 c |
| AG1656PRO2 | 48,8 b | 100,0 a | 2,9 a | 7,4 a | 13,0 b | 25,0 b |
| AG9040YG | 45,4 b | 98,3 a | 1,2 b | 10,0 a | 9,0 b | 30,0 a |
| AG8025PRO | 34,4 b | 100,0 a | 0,7 b | 5,5 a | 6,0 b | 18,0 b |
| AG9010PRO | 36,2 b | 98,3 a | 3,3 a | 7,9 a | 5,0 b | 32,0 a |
| DKB240PRO2 | 25,0 b | 100,0 a | 2,2 b | 6,7 a | 24,0 a | 21,0 b |
| DKB250PRO2 | 27,2 b | 95,0 a | 1,1 b | 6,3 a | 12,0 b | 21,0 b |
| AS1555PRO | 44,1 b | 100,0 a | 0,6 b | 4,9 a | 8,0 b | 16,0 b |
| Status | 26,6 b | 98,3 a | 1,1 b | 6,9 a | 6,0 b | 26,0 b |
| BG7049H | 77,5 a | 95,0 a | 2,1 b | 7,3 a | 32,0 a | 26,0 b |
| 30K64HNSR | 51,8 b | 95,5 a | 0,7 b | 5,1 a | 5,0 b | 12,0 c |
| 30S31H | 72,5 a | 100,0 a | 6,4 a | 10,8 a | 18,0 a | 35,0 a |
| P4285 | 17,1 b | 77,9 b | 0,8 b | 2,9 a | 6,0 b | 2,0 d |
| P1630H | 67,9 a | 100,0 a | 3,6 a | 9,6 a | 13,0 b | 30,0 a |
| P32R48H | 96,4 a | 96,4 a | 9,3 a | 12,2 a | 19,0 a | 26,0 b |
| P30F35YH | 87,9 a | 100,0 a | 3,8 a | 9,5 a | 8,0 b | 23,0 b |
| P3646H | 65,6 a | 100,0 a | 3,5 a | 8,4 a | 5,0 b | 29,0 a |
| P30S31HR | 69,6 a | 100,0 a | 6,1 a | 7,8 a | 29,0 a | 33,0 a |
| P30K64YH | 36,1 b | 98,2 a | 1,9 b | 5,5 a | 9,0 b | 25,0 b |
| P30S31YH | 84,2 a | 98,2 a | 6,5 a | 10,1 a | 20,0 a | 38,0 a |
| Média | 53,2 | 97,6 | 2,9 | 7,6 | 12,6 | 23,9 |
| C.V. (%) | 37,7 | 3,9 | 29,3 | 22,4 | 33,2 | 18,2 |

¹Suspensão macronidial de 2 mL de *F. graminearum* na concentração de 100.000 esporos/mL injetados dentro do canal do estilo-estigma.

² Ferimento nos grãos com pinos de aço mergulhados em uma suspensão macronidial de *F. graminearum* na concentração de 100.000 esporos/mL.

³ Dados transformados $(x+1)^{1/2}$; valores de médias não transformados.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Houve efeito de híbridos na incidência de espigas giberelas, incidência de grãos ardidos e incidência de *F. graminearum* nos grãos com valores que variaram de 37,2% a 95,6%, 2,1% a 17,0% e 4,0% a 29,3%, respectivamente. O híbrido P4285 apresentou o menor valor de incidência de espiga giberelada (37,2 %), seguidos pelos híbridos Status, DKB250PRO2, AG9010PRO, AG8025PRO, AS1555PRO, AG9040YG, P30K64YH e 30K64HNSR. Para incidência de grãos ardidos os híbridos P4285, AG8025PRO, 30K64HNSR, Status, DKB250PRO2, P30K64YH, AS1555PRO, AG9040YG e

Dow2B587HX apresentaram valores que variaram de 2,1% a 5,3%. Estes híbridos obtiveram valores de grãos ardidos inferiores a 6%, sendo este adotado como referência por empresas, para desconto no momento da comercialização do grão. A análise de médias quanto à incidência de *F. graminearum* nos grãos originou três grupos, sendo os híbridos P4285, Dow2B587HX e os que obtiveram os menores valores variando de 4% a 9,5% (Tabela 11).

Foram observadas correlações significativas e positivas nos dois ambientes, entre incidência grãos ardidos versus incidência de espigas gibereladas (IGA x IEG), incidência de *F. graminearum* versus incidência de espigas gibereladas nos grãos (IFG x IEG), incidência de *F. graminearum* nos grãos versus incidência grãos ardidos (IFG x IGA). No ambiente 1 as correlações entre (IGA x IEG), com injeção de inóculo no canal do estilo-estigma (i) e ferimento dos grãos no centro da espiga (f) foram respectivamente de 0,69i e 0,58f; e no ambiente 2 de 0,79i e 0,48f. As correlações entre (IFG x IEG) no ambiente 1 foram de 0,46i e no ambiente 2 de 0,50i e 0,55f. As correlação entre (IFG x IGA) no ambiente 1 foram de 0,73i e 0,75f e no ambiente 2 foram 0,51i e 0,71f, respectivamente (Figura 7).

Tabela 11: Incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* em amostra homogênea de grãos de vinte híbridos de milho (ambiente 1 e ambiente 2), na safra agrícola de 2012/13, Cruz Alta, RS.

| Híbrido | Incidência (%) | | |
|------------|---------------------|----------------------------|--|
| | Espigas gibereladas | Grãos ardidos ¹ | <i>Fusarium graminearum</i> ¹ |
| Dow2B587HX | 73,0 b | 5,3 d | 7,2 c |
| AG1656PRO2 | 75,2 b | 5,5 c | 13,5 b |
| AG9040YG | 65,6 c | 5,0 d | 15,5 b |
| AG8025PRO | 65,2 c | 3,1 d | 10,8 b |
| AG9010PRO | 63,6 c | 6,4 c | 16,0 b |
| DKB240PRO2 | 73,9 b | 6,0 c | 20,3 a |
| DKB250PRO2 | 61,8 c | 4,2 d | 11,8 b |
| AS1555PRO | 65,6 c | 4,7 d | 10,5 b |
| Status | 54,4 c | 4,1 d | 14,5 b |
| BG7049H | 80,8 b | 5,0 d | 19,8 a |
| 30K64HNSR | 71,7 c | 3,7 d | 9,5 c |
| 30S31H | 82,2 b | 7,3 c | 15,0 b |
| P4285 | 37,2 d | 2,1 d | 4,0 c |
| P1630H | 91,9 a | 17,0 a | 29,3 a |
| P32R48H | 95,6 a | 15,8 a | 23,9 a |
| P30F35YH | 92,8 a | 9,1 b | 13,5 b |
| P3646H | 82,2 b | 9,2 b | 12,3 b |
| P30S31HR | 83,8 b | 7,3 c | 17,5 a |
| P30K64YH | 67,8 c | 4,3 d | 11,0 c |
| P30S31YH | 83,8 b | 7,3 c | 17,5 b |
| C.V. (%) | 23,3 | 26,9 | 36,0 |

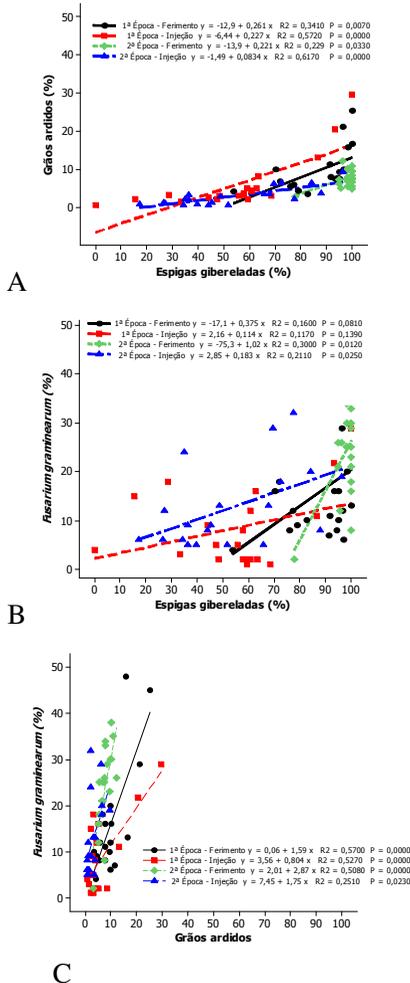
Diferença significativa pelo teste F *P < 0.001

¹Dados transformados $(x+1)^{1/2}$; valores de médias não transformados.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Figura 7: Correlação de Pearson entre incidência de grãos ardidos e espigas gibereladas (A), incidência de *Fusarium graminearum* nos grãos e espigas gibereladas (B), incidência de *Fusarium graminearum* nos grãos e grãos ardidos (C) em dois ambientes de semeadura em vinte híbridos de milho submetidos a dois métodos de inoculação. Cruz Alta, RS, safra agrícola de 2012/13.



Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

4.6 DISCUSSÃO

Em ambos os ambientes de semeadura a incidência de espigas gibereladas foi elevada (acima de 50%). O método de fermento nos grãos promoveu maior incidência quando comparado ao método de injeção no canal do estilo estigma corroborando com CHUNGU et al. (1996) que encontraram valores de incidência mais elevados com este método, devido a quebra da barreira fisiológica da planta. As barreiras fisiológicas envolvem estruturas físicas e compostos químicos que são importantes mecanismos de defesa das plantas contra patógenos. O método de fermento nos grãos provocou injúrias na palha e nos grãos facilitando o processo de infecção e colonização dos grãos. Pois, permitiu o contato direto do fungo com um ambiente rico em nutrientes e com elevada umidade. FARRAH & DAVIS (1991) relataram que genótipos portadores de palhas bem aderidas às espigas apresentaram menores sintomas de podridão de espiga por *Fusarium* quando comparadas a genótipos com empalhamento frouxo. De acordo com HOENISCH & DAVIS (1994) outro importante mecanismo de resistência ao processo de infecção do grão é a espessura do pericarpo, pois, pericarpos mais grossos resistem melhor ao ataque de insetos e previnem que fungos infectem e posteriormente colonizem os grãos através de ferimentos. SCHAAFSSMA et al. (2006) avaliando a severidade de giberela em híbridos, em Ontario no Canadá, após inoculação no canal do estilo-estigma e fermento dos grãos concluíram que o método de ferimentos propicia maior severidade, devido ser menos dependente de condições ambientais para infecção do que o realizado nos estigmas, uma vez que injúrias permitem a deposição direta de inóculo nos grãos em desenvolvimento. Além do fato, da infecção através do estigma deixar de ocorrer com a secagem destes (REID et al., 1992 a; REID & SINHA, 1998).

A resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a infecção e atividade de um patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Para avaliar a reação de híbridos é essencial levar em consideração os mecanismos de resistência do estigma e de resistência do grão. MESTERHÁZY et al. (2012) afirmam que a resistência aos dois modos principais de infecção do fungo na espiga, por meio do estigma ou através de ferimentos dos grãos, não se correlacionam em todos os genótipos.

No ambiente 2, o método de fermento nos grãos diferenciou somente o híbrido P4285 dos demais em relação à incidência de espigas gibereladas e não diferenciou geneticamente genótipos quanto a grãos

ardidos. Provavelmente isto ocorreu devido, as condições ambientais em cada ambiente após as inoculações, principalmente de temperatura, uma vez que foram utilizadas as mesmas quantidades de água nas irrigações posteriores as inoculações. REID et al. (1999) afirmam que *F. graminearum* requer temperaturas entre 26 - 28 °C e umidade relativa do ar contínua durante os estádios de floração e início do desenvolvimento de grãos. MUNKVOLD (2003b) relata que o desenvolvimento de epidemias é dependente da coincidência entre condições ambientais favoráveis e condições favoráveis à infecção do hospedeiro. O ambiente 2 favoreceu o processo de infecção de *F. graminearum*, pois apesar de obtidos os menores valores de incidência de grãos ardidos, houve maior recuperação do patógeno nos grãos através da análise de patologia.

Estudos foram realizados no Brasil avaliando a incidência de grãos ardidos em híbridos de milho em função do aumento da densidade de plantas, sistemas de manejo e aplicação de fungicidas foliares (TRENTO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005; CASA et al., 2007; JULIATTI et al., 2007; BRITO et al., 2012). Com relação ao uso de métodos de inoculação com *F. graminearum* e avaliações de reação de genótipos de milho através da análise de incidência de espigas gibereladas, incidência de grãos ardidos e incidência do fungo nos grãos e suas correlações o presente estudo foi pioneiro.

A incidência de grãos ardidos após inoculação no canal do estilo-estigma e ferimentos nos grãos foi correlacionada com a incidência de espigas em ambos os ambientes. Mas com a utilização do método de injeção foi obtido maior grau de dependência linear entre as variáveis. As correlações entre incidência de *F. graminearum* nos grãos e espigas gibereladas foram significativas com exceção do ambiente 1 com inoculação via fermento dos grãos. Também houve correlação positiva significativa entre incidência de *F. graminearum* nos grãos e incidência de grãos ardidos nos grãos nos dois ambientes e independentes do método de inoculação utilizado. Porém o método de injeção no canal do estilo estigma e o de fermento dos grãos no ambiente 1 apresentaram correlações (acima de $r = 0,70$). A incidência de *F. graminearum* nos grãos foi acrescida em 0,80% e 1,59% a cada unidade de acréscimo na incidência de grãos ardidos.

Pelos resultados obtidos nesse trabalho verificou-se que houve variações genotípicas entre os genótipos avaliados com relação à infecção e colonização de *F. graminearum* corroborando com MUNKVOLD (2003b); REINPRECHT et al. (2008); LOFFLER et al. (2010). A maioria dos híbridos avaliados apresentou suscetibilidade ao patógeno, e baixa sanidade de grãos. As correlações foram significativas e positivas.

Correlações genotípicas entre IFG x IGA ($r \geq 0,70$) podem ser utilizadas na seleção indireta de incidência de *F. graminearum* nos grãos com base na incidência de grãos ardidos após inoculação.

Este trabalho enfatiza a utilização dos métodos de inoculação artificial através de injeção no canal do estilo estigma e fermento nos grãos para avaliar os dois principais mecanismos de resistência envolvidos com a podridão de giberela em espigas. Pois, os resultados de incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos e *Fusarium graminearum* nos grãos demonstraram que existem diferentes níveis de suscetibilidade entre os genótipos para infecção via estigma e para a infecção e colonização do grão e que a resistência para infecção via estigma não implica em resistência para a infecção e colonização do grão.

4.7 CONCLUSÕES

Entre os híbridos avaliados P4285 foi o menos suscetível a podridão de giberela demonstrando menor incidência de espigas gibereladas, grãos ardidos, e incidência de *Fusarium graminearum* nos grãos independente do ambiente e métodos de inoculação.

5 CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À PODRIDÃO DE GIBERELA EM ESPIGA DE MILHO DE HÍBRIDOS COMERCIAIS, ATRAVÉS DE DOIS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE *Fusarium graminearum*

5.1 RESUMO

O fungo *Fusarium graminearum* é considerado um dos principais agentes causadores de podridão de espiga de milho no Sul do Brasil, podendo causar reduções no rendimento e na qualidade de grãos. Atualmente, a maioria dos híbridos comerciais disponibilizados no mercado são suscetíveis. No Brasil, raramente há informação específica de um híbrido para um patógeno específico. Os objetivos do trabalho foram: (1) Avaliar a resistência de híbridos de milho comerciais e à infecção de giberela, após inoculação artificial com os métodos de injeção de suspensão macronidial no canal do estilo estigma e ferimento dos grãos no centro da espiga; (2) Caracterizar híbridos quanto aos níveis de resistência à giberela, através do desenvolvimento de uma escala de classes correlacionada com a intensidade de doença; (3) Determinar se a intensidade de giberela e a produtividade de grãos com inoculação através de injeção no canal do estilo estigma e ferimento dos grãos no centro da espiga podem ser correlacionadas. Os experimentos foram conduzidos na safra agrícola de 2012/13, em dois ambientes de semeadura no município de Cruz Alta, RS. Foi avaliada a resistência de 20 híbridos comerciais, submetidos a dois métodos de inoculação artificial que avaliaram a resistência do estigma e dos grãos. A intensidade de giberela foi afetada pelos métodos de inoculação, híbrido, e interações dupla e tripla. Para o rendimento de grãos houve efeito somente de híbrido. O método de inoculação através de ferimentos nos grãos propiciou maior intensidade de giberela. Os resultados mostraram que existe variabilidade entre híbridos para intensidade de doença e produtividade de grãos. O híbrido P4285 apresentou intensidade de giberela inferior aos demais materiais, independente do ambiente e método de inoculação. Os híbridos comerciais AG8025PRO, DKB250PRO2, AS1555PRO, Status, 30K64HNSR e P4285 foram classificados como moderadamente resistentes e os híbridos P1630H e P32R48H como suscetíveis ao fungo. Os híbridos BG7049H, P30K64HNSR, P30K64YH e P30F35YH foram os mais produtivos, independente do ambiente. A intensidade de giberela e a produtividade de grãos após injeção de inóculo no canal do estilo estigma e ferimento dos grãos apresentaram relação. As correlações foram positivas entre produtividade com injeção

de inóculo no canal do estilo estigma e produtividade com fermento dos grãos com correlações de $r = 0.93$ e $r = 0.94$ para os ambientes 1 e 2. A utilização dos dois métodos de inoculação permitiu avaliar a intensidade de giberela e criar de uma escala de reação que foi uma ferramenta importante para caracterizar híbridos comerciais, permitindo evidenciar de forma clara e objetiva os níveis de resistência e suscetibilidade.

Palavras-chave: *Fusarium graminearum*, intensidade de doença, melhoramento, métodos de inoculação, *Zea mays*.

5.2 ABSTRACT

Fusarium graminearum is considered a major causative agent of maize ear rot in southern Brazil, may cause reductions in yield and grain quality. Currently, most of the commercial hybrids available on the market are susceptible. In Brazil there is seldom specific information from a hybrid to a specific pathogen. The objectives of this study were : (1) to assess the resistance of commercial maize hybrids giberella ear rot after artificial inoculation with methods of injection macronidial suspension in silk-channel and wounding of the kernel in the ear center ; (2) to characterize hybrids in the degree of resistance and susceptibility to giberella ear rot, through the development of a classes scale correlated with the intensity of disease; (3) to determine whether the giberella intensity and kernel yield with inoculation through injection in silk-channel and wounding of the kernel in the ear center can be correlated. The experiments were conducted in the 2012/13 harvest in two sowing environment in Cruz Alta, RS. It was evaluated resistance of 20 hybrids submitted to two methods of artificial inoculation that assessed the resistance of silk and kernels. The intensity of giberella was affected by inoculation methods, hybrid, and double and triple interactions. For kernel yield there was effect only hybrid. The method of inoculation through wounds in the kernels produced greater intensity of giberella ear rot. The results showed that variability exists among maize hybrids for disease intensity and yield. The hybrid P4285 had intensity lower of giberella than the other materials, regardless of sowing environment and inoculation method. The commercial hybrids AG8025PRO, DKB250PRO2, AS1555PRO, Status, 30K64HNSR and P4285 were classified as moderately resistant and hybrids P1630H and P32R48H as susceptible to the fungus. The hybrids BG7049H, P30K64HNSR, P30K64YH and P30F35YH were the most productive, regardless of the environment. The intensity of giberella ear rot and

yield after injection of inoculum in silk-channel and wounding of the kernels were positively correlated. Correlations were positive between inoculum injection with productivity-silk-channel and productivity with wounding of the kernel correlation of $r = 0.93$ and $r = 0.94$ for environment 1 and 2. The use of two methods of inoculation allowed to evaluate the intensity of gibberella ear rot and create a reaction scale that was an important tool to characterize commercial hybrids, allowing disclose in a clear and objective levels of resistance and susceptibility.

Key words: *Fusarium graminearum*, disease intensity, breeding, methods of inoculation, *Zea mays*.

5.3 INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium graminearum* (Schwabe), teleomorfo *Gibberella zeae* (Schwein. Petch) está entre os principais agentes causadores de podridão de espiga de milho no Sul do Brasil (STUMPF et al., 2013). A podridão de giberela ou podridão vermelha da ponta da espiga é frequente em regiões com elevada umidade relativa do ar (> 80%) durante o período de florescimento e maturação (SUTTON, 1982), seguidos de temperaturas de 24°C - 26°C (BOOTH, 1971; CASA et al, 2011), ou em torno de 28°C (REID et al., 1999). As principais vias de infecção do fungo em espigas de milho são através do estilo-estigma e de ferimentos nos grãos (KOEHLER, 1942; SUTTON, 1982; REID et al., 1996).

As espigas infectadas por *F. graminearum* causam redução no rendimento (VIGIER et al., 2001), e na qualidade dos grãos, principalmente pelo acúmulo das micotoxinas deoxinivalenol e zearalenona (PRELUSKY et al., 1994; BOUTIGNY et al., 2011) que representam um perigo para a saúde humana e animal (BEREK et al., 2001; CREPPY, 2002).

A severidade de giberela e a concentração de micotoxinas produzidas em grãos infectados variam entre genótipos de milho e apresentam correlações positivas após inoculações artificiais (REID et al. 1996).

Avaliações de reação de resistência de híbridos de milho à giberela foram realizadas no Canadá e somente dois híbridos comerciais foram classificados como moderadamente resistentes, após inoculação através de injeção no canal do estilo-estigma e fermento dos grãos (SCHAAFSMA et al., 1997). Quando pesquisadores avaliaram doze linhagens, cinco híbridos comerciais e seis linhagens (QPM) em relação

à severidade de giberella após inoculação no canal do estilo-estigma com três isolados verificaram que apenas duas linhagens e dois híbridos comerciais apresentaram maior nível de resistência e todas as linhagens (QPM) foram suscetíveis (REID et al., 1993).

Estudos conduzidos com germoplasma de milho argentino como fontes de resistência a fusariose e a giberela demonstraram que vários acessos exibiram resistência após inoculação artificial, com maior frequência para *F. verticillioides* do que para *F. graminearum* (PRESELLO et al., 2004). Avaliações de resistência de híbridos de milho a *F. graminearum* e *F. verticillioides* também foram feitas em Ontário com diferentes híbridos, anos e dois métodos de inoculação (SCHAAFSMA et al., 2006). Porém, no Brasil, pouco se conhece sobre a reação dos genótipos e dificilmente há relatos sobre a resistência de híbridos de milho a podridão de giberela. No Estado do Paraná nove híbridos de milho foram classificados quanto à reação, sendo que quatro materiais foram considerados suscetíveis, quatro tolerantes e um moderadamente suscetível (NASCIMENTO, 2010).

Apesar dos esforços dos programas de melhoramento no mundo para desenvolver materiais resistentes à doença, atualmente a maioria das linhagens e híbridos comerciais avaliados são suscetíveis (MUNKVOLD, 2003b; REINPRECHT et al., 2008; MESTERHÁZY et al., 2012).

Nos estudos realizados até o presente momento, verificou-se que não existem especificações de metodologia sobre o que é considerado um híbrido resistente, moderadamente resistente, moderadamente suscetível, e suscetível. As companhias de sementes quando caracterizam seus genótipos para o complexo de podridões das espigas, disponibilizam de forma subjetiva informações e raramente há informação específica de um híbrido para um patógeno específico.

Portanto é importante avaliar a resistência de híbridos a infecção do fungo *F. graminearum*, uma doença frequente e pouco explorada do ponto de vista do fitomelhoramento.

Os objetivos deste estudo foram: (1) Avaliar a resistência de 20 híbridos de milho comerciais cultivados no Sul do Brasil à infecção de giberela, através da análise de intensidade de doença, inoculados artificialmente com os métodos de injeção de suspensão macronidial no canal do estilo stigma e ferimento dos grãos no centro da espiga; (2) Caracterizar híbridos quanto ao grau de resistência à giberela, através do desenvolvimento de uma escala de classes correlacionada com a intensidade de doença; (3) Verificar se existe correlação entre intensidade de giberela e produtividade de grãos com inoculação através

de injeção no canal do estilo estigma e ferimento dos grãos no centro da espiga.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram semeados no mês de novembro na safra agrícola de 2012/2013 na área experimental da Du Pont do Brasil - Subdivisão Pioneer Sementes, situada no Município de Cruz Alta no Noroeste-Rio Grandense, com altitude média de 452 metros do nível do mar e coordenadas geográficas de 28° 38' 19" de latitude Sul e 53° 36' 23" de longitude Oeste, e clima subtropical com as quatro estações bem definidas.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com quatro repetições, e tratamentos arrançados num fatorial dentro dos blocos.

Foram utilizados 20 híbridos comerciais (Tabela 12) e realizadas semeaduras em dois ambientes. Os híbridos foram semeados de acordo com a quantidade de energia térmica exigido para o florescimento. Portanto, foram semeados em seis datas distintas, dentro de cada ambiente de semeadura, para que coincidissem o florescimento e as inoculações do fungo no mesmo momento, e com condições ambientais semelhantes.

A semeadura no ambiente 1 iniciou em 06/11/2012 com a semeadura dos híbridos (BG7049H, P30K64YH), seguidos pelas semeaduras do P30K64HNSR, P30F35YH (07/11/2012), AG8025PRO, AG1656PRO2, DKB240PRO2, DKB250PRO2, Status (12/11/2012), AS1555PRO, Dow2B587HX (13/11/2012), AG9040YG, AG9010PRO, P4285, P1630H, 30S31YH, P3646H, 30S31H P30S31HR (16/11/2012), e P32R48H (21/11/2012). A semeadura no ambiente 2 iniciou no dia 26/11/2012 com os híbridos (BG7049H, P30K64YH), seguidos pelas semeaduras do P30K64HNSR, P30F35YH (27/11/2012), AG8025PRO, AG1656PRO2, DKB240PRO2, DKB250PRO2, Status (30/11/2012), AS1555PRO, Dow2B587HX (03/12/2012), AG9040YG, AG9010PRO, P4285, P1630H, 30S31YH, P3646H, 30S31H P30S31HR (05/12/2012), e P32R48H (11/12/2012).

Cada híbrido foi semeado lado a lado dentro dos blocos, entretanto, as unidades experimentais constaram de quatro linhas de 4 m de comprimento com espaçamento de 0,60 m entre linhas para cada híbrido. Somente as duas linhas centrais de cada unidade experimental foram inoculadas (primeira linha central com inoculação no canal do estilo estigma e segunda linha central com ferimento dos grãos no centro

da espiga). As duas linhas laterais foram utilizadas como bordadura. Foram semeadas aproximadamente 35 sementes de cada híbrido por linha e no estádio fenológico V3 da escala de Ritchie foi realizado o desbaste deixando uma população de 65.000 plantas ha⁻¹.

Os híbridos foram escolhidos de acordo com o grau de expressividade fornecido pelas companhias de sementes na região Sul do Brasil.

Tabela 12: Híbridos de milho submetidos à avaliação da reação a giberela, safra agrícola 2012/13. Cruz Alta, RS.

| Híbrido | Características Agrônômicas | | |
|------------|-----------------------------|--------------|-----------------|
| | Tipo | Ciclo | Textura do Grão |
| Dow2B587HX | Simple | Precoce | Semidentado |
| AG1656PRO2 | Simple | Precoce | Semiduro |
| AG9040YG | Simple | Superprecoce | Duro |
| AG8025PRO | Simple | Precoce | Dentado |
| AG9010PRO | Simple | Superprecoce | Duro |
| DKB240PRO2 | Simple | Precoce | Dentado |
| DKB250PRO2 | Simple | Precoce | Semidentado |
| AS1555PRO | Simple | Precoce | Semiduro |
| Status | Simple | Precoce | Duro |
| BG7049H | Tripló | Precoce | Semiduro |
| 30K64HNSR | Simple | Precoce | Semiduro |
| 30S31H | Simple | Precoce | Semiduro |
| P4285 | Simple | Precoce | Duro |
| P1630H | Simple | Superprecoce | Semidentado |
| P32R48H | Simple | Superprecoce | Semiduro |
| P30F35YH | Simple | Precoce | Semiduro |
| P3646H | Simple | Precoce | Semiduro |
| P30S31HR | Simple | Precoce | Semiduro |
| P30K64YH | Simple | Precoce | Semiduro |
| P30S31YH | Simple | Precoce | Semiduro |

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com a exigência da cultura do milho e as indicações técnicas da Pioneer Sementes, onde foram realizadas três aplicações de 150 kg/ha de ureia nos estádios fenológicos V3, V5 e V7 da escala de RITCHIE (1993), duas aplicações de herbicidas (uma de atrazina na dose de 3.000 g ha⁻¹ e outra de

atrazina+s-metolaclopro 1.850+1.450 g ha⁻¹), quatro aplicações de inseticidas (uma de metomil 154,8 g ha⁻¹, duas de tiametoxan+lambdialotrina 42,3+31,8 g ha⁻¹ e uma de espinosade 48 g ha⁻¹).

Foram utilizados dois métodos de inoculação artificial, inoculados cada um em 15 espigas primárias por parcela. O primeiro método consistiu de injeção no canal do estilo estigma (CHUNGU et al., 1996) de 2 ml de suspensão macroconidial com concentração de 1×10^5 esporos mL⁻¹, injetados com o auxílio de uma seringa dosadora com alimentação automática. O segundo método envolveu fermento nos grãos e palha no centro da espiga (REID & HAMILTON 1996a) via perfuração com 4 pinos de aço inoxidável, montados em um retângulo, distanciados 7mm x 5mm sob um cilindro de madeira de 2,5cm x 50cm. Os pinos de aço do inoculador foram mergulhados em uma suspensão de macroconídios com concentração de 1×10^5 esporos mL⁻¹, antes do procedimento dos fermentos na espiga. Desta forma, os macroconídios foram transportados para dentro dos fermentos através dos pinos de aço ou por capilaridade.

As suspensões macroconidiais foram compostas pela mistura de dois isolados de *F. graminearum*, sendo obtidos de espigas naturalmente infectadas da região de Palotina - PR (isolado MICOFIT0005) e Uberlândia - MG (isolado MICOFIT0004).

As suspensões macroconidiais foram obtidas a partir de culturas do isolado presentes em placas de Petri contendo meio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), previamente incubadas em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h (LESLIE & SUMMERELL, 2006) durante 15 dias. Após este período foi depositado sobre as colônias 10 mL de água destilada estéril, seguido de raspagem superficial com pincel de cerdas macias para a liberação dos conídios. Após filtragem em uma peneira para retirada de impurezas, a suspensão obtida teve sua concentração de macroconídios medida e calibrada com auxílio de um hemacitômetro.

As inoculações da mistura de isolados ocorreram durante os estádios R1 – espigamento e R2 – grão em estágio de bolha (RITCHIE et al., 1993; REID et al., 1992; REID et al., 1996a). Foram realizadas irrigações de 15 mm de água a cada 48 horas (durante o período da noite) via sistema de pivô central, desde a semeadura até a maturidade fisiológica da cultura. Estas irrigações foram realizadas de acordo com as recomendações técnicas da Pioneer Sementes.

As colheitas no ambiente 1 e ambiente 2 foram realizadas aos 67 e 61 dias após as inoculações na fase de polinização, quando as espigas estavam com aproximadamente 22% de umidade dos grãos. As espigas foram colhidas manualmente, sendo despalhadas para

identificação e quantificação da doença. A severidade foi avaliada com auxílio de escala diagramática proposta por REID et al. (1996), modificada neste trabalho para utilização na equação integrada proposta por MCKINNEY (1923), para determinar a intensidade da giberela. A nova escala totalizou sete notas de severidade: 0 = ausência de sintomas; 1 = 1 a 3%; 2 = 4 a 10%; 3 = 11 a 25%; 4 = 26 a 50%, 5 = 51 a 75%; 6 = 76 a 100% de severidade na espiga.

$$\text{Intensidade de giberela} = \frac{\sum(\text{notas da escala} \times \text{frequência})}{(\text{n}^\circ \text{ plantas} \times 6)} \times 100$$

As espigas após as avaliações de severidade foram secas em secadores experimentais, até atingirem peso constante e em seguida foram trilhadas. Os grãos foram pesados para obtenção da produtividade.

Os dados foram submetidos à análise de variância. Os valores de F para os efeitos principais e interações foram considerados significativos ao nível de significância de 5% ($P < 0.05$). As médias de cada tratamento foram comparadas entre si utilizando-se o teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5%.

5.5 RESULTADOS

A análise de variância demonstrou que métodos de inoculação (injeção no canal do estilo estigma e ferimento dos grãos), híbrido, interação dupla “ambiente x híbrido”, “métodos de inoculação x híbrido” e interação tripla de “ambiente x métodos de inoculação x híbrido” afetaram a intensidade de giberela. No entanto, os efeitos principais (método de inoculação e híbrido) foram mais importantes que os efeitos das interações. Para rendimento de grãos houve efeito somente de híbrido (Tabela 13). Não houve efeito de ambiente para todas as variáveis avaliadas.

Na Tabela 14 constam os dados de intensidade de giberela e produtividade de grãos em função dos ambientes, métodos de inoculação artificial e híbridos. A inoculação artificial através de ferimentos nos grãos propiciou maior intensidade de giberela com acréscimos de 41,8% no ambiente 1 e de 48,9% no ambiente 2 em relação ao método de injeção no canal do estilo estigma.

Diferenças fenotípicas foram observadas tanto para intensidade de doença como para produtividade de grãos. A análise de médias deu origem

a quatro grupos distintos quanto à intensidade de giberela no ambiente 1, com o método de injeção no canal do estilo estigma. O híbrido P4285 foi o mais resistente, seguido pelos híbridos Status, DKB250PRO2 e AG9010PRO. No ambiente 2, os híbridos P4285, DKB250PRO2, Status, AG8025PRO, DKB240PRO2, AG9040YG, AG9010PRO, Dow2B587HX, AG1656PRO2, P30K64YH e AS1555PRO não diferiram entre si e obtiveram valores de intensidade de giberela variando de 3,2% a 9,9%. O método de inoculação através de fermento nos grãos propiciou menor nível de resistência com intensidade de giberela variando de 15,4% a 65,2% no ambiente 1. Os híbridos P4285, AG9040YG, P30K64YH, Status, 30K64HNSR, AS1555PRO, AG8025PRO, DKB250PRO2 tiveram as menores intensidades de doença no ambiente 1. Os híbridos P4285, DKB240PRO2, 30K64HNSR, AS1555PRO, DKB250PRO2, AG8025PRO, P30F35YH, BG7049H, P30K64YH, AG1656PRO2, Status, P30S31YH, P3646H, Dow2B587HX e P30S31H no ambiente 2 com valores variando de 18,5% a 28,9%. Independente do ambiente e da combinação de todos os tratamentos o híbrido P4285 apresentou intensidade de giberela significativamente inferior aos demais (Tabela 14).

Tabela 13: Resumo da análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação nos dados intensidade de giberelada e produtividade de grãos para os ambientes 1 e ambiente 2, métodos de inoculação (injeção e fermento), híbridos de milho, e suas interações na safra agrícola de 2012/13.

| Causa de variação | df | Quadrado médio do resíduo | |
|---------------------------|-----|-----------------------------|------------------|
| | | Intensidade de giberela (%) | Rendimento Kg/ha |
| Ambiente (A) | 1 | 79,9 | 402397 |
| Bloco (B) | 3 | 66,7 | 2662941 |
| Método de inoculação (MI) | 1 | 12785,1* | 4472576 |
| Híbrido (H) | 19 | 1127,2* | 34721247* |
| A x MI | 1 | 72,5 | 1441497 |
| A x H | 19 | 396,5* | 2141395 |
| I x H | 19 | 150,1* | 496168 |
| A x MI x H | 19 | 125,3* | 916023 |
| Erro | 237 | 49,7 | 1864204 |
| Total | 319 | | |
| C. V. | | 32,7 | 11,8 |

* Diferença significativa pelo teste F (0,05).

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Não houve efeito significativo dos métodos de inoculação sobre o rendimento de grãos (Tabela 13), porém no ambiente 1 a produtividade média de grãos dos 20 híbridos inoculados através do método de fermento sofreu decréscimos de 0,88%, e de 3,14% no ambiente 2 em relação ao método de injeção no canal do estilo estigma (Tabela 14).

As produtividades nos híbridos inoculados através de injeção no canal do estilo estigma variaram de 9.567 Kg ha⁻¹ a 14.319 Kg ha⁻¹ no ambiente 1 e 8.394 Kg ha⁻¹ a 15.556 Kg ha⁻¹ no ambiente 2. Quando foi utilizado método de fermento dos grãos os valores de produtividade variaram de 8.823 Kg ha⁻¹ a 14.789 Kg ha⁻¹ no ambiente 1 e de 8.749 Kg ha⁻¹ a 13.503 Kg ha⁻¹ no ambiente 2. Os híbridos P1630H, P32R48H, DKB240PRO2 e DKB250PRO2 foram os menos produtivos no ambiente 1 quando submetidos à inoculação através de injeção no canal do estilo estigma e os genótipos P30F35YH, BG7049H, P30K64YH, P30K64HNSR, AD1656PRO os que apresentaram superioridade (Tabela 14). E no ambiente 2 os híbridos P30S31H, P4285, P1630H, P32R48H, P30S31YH, AG9040YG, Dow2B587HX, AG8025PRO e AG1656PRO2 foram os que apresentaram menor produtividade. Quando foi utilizado o método de fermento dos grãos a análise de médias deu origem a quatro grupos distintos de híbridos no ambiente 1 e a dois grupos no ambiente 2. Os híbridos BG7049H, P30K64HNSR, P30K64YH e P30F35YH foram os mais produtivos, independente do ambiente. Entretanto os híbridos mais produtivos foram classificados como moderadamente suscetível à giberela independente do método de inoculação (Tabela 16).

Tabela 14: Intensidade de giberela e produtividade de grãos em híbridos de milho comerciais inoculados artificialmente pelo método de injeção no canal do estilo estigma e fermento no centro dos grãos da espiga no ambiente 1 e ambiente 2, Cruz Alta, RS.

(Contínua)

| Híbrido | Intensidade de giberela (%) ¹ | | Rendimento (Kg ha ⁻¹) | |
|-------------|--|----------|-----------------------------------|----------|
| | Injeção no canal-estigma | Fermento | Injeção no canal-estigma | Fermento |
| Ambiente 1 | | | | |
| Dow2B587HX | 20,1 b | 28,4 b | 11.823 b | 11.912 c |
| AG1656PRO2 | 15,6 b | 28,9 b | 13.415 a | 11.795 c |
| AG9040YG | 8,7 b | 15,8 c | 11.127 c | 10.784 c |
| AG8025PRO | 8,5 b | 19,5 c | 12.468 b | 12.708 b |
| AG9010PRO | 6,2 c | 26,5 b | 11.112 c | 10.833 c |
| DKB240PRO2 | 12,9 b | 41,1 b | 9.567 d | 8.823 e |
| DKB250PRO2 | 5,9 c | 22,8 c | 9.663 d | 9.223 e |
| AS1555PRO | 8,9 b | 19,2 c | 12.416 b | 11.508 c |
| Status 7205 | 2,9 c | 16,8 c | 11.275 c | 11.765 c |
| BG7049H | 13,1 b | 25,3 c | 13.757 a | 14.789 a |
| 30K64HNSR | 14,8 b | 17,4 c | 13.493 a | 14.284 a |

Tabela 14: Intensidade de giberela e produtividade de grãos em híbridos de milho comerciais inoculados artificialmente pelo método de injeção no canal do estilo estigma e ferimento no centro dos grãos da espiga no ambiente 1 e ambiente 2, Cruz Alta, RS.

| Híbrido | (Conclusão) | | | |
|-------------------|--|-----------|-----------------------------------|-----------|
| | Intensidade de giberela (%) ¹ | | Rendimento (Kg ha ⁻¹) | |
| | Injeção no canal-estigma | Ferimento | Injeção no canal-estigma | Ferimento |
| 30S31H | 11,1 b | 34,5 b | 10.244 c | 9.891 d |
| P4285 | 0,0 d | 15,3 c | 10.356 c | 10.340 d |
| P1630H | 62,7 a | 65,2 a | 9.157 d | 9.808 d |
| P32R48H | 45,9 a | 33,1 b | 9.320 d | 9.882 d |
| P30F35YH | 24,2 b | 32,5 b | 14.319 a | 13.857 a |
| P3646H | 19,6 b | 29,8 b | 12.482 b | 12.001 c |
| P30S31HR | 16,6 b | 37,6 b | 11.102 c | 11.204 c |
| P30K64YH | 14,8 b | 16,6 c | 13.706 a | 13.881 a |
| P30S31YH | 12,9 b | 31,2 b | 10.984 c | 10.451 d |
| Média | 16,3 | 27,9 | 11.589 | 11.487 |
| C.V. (%) | 20,9 | 11,4 | 7,3 | 6,7 |
| Ambiente 2 | | | | |
| Dow2B587HX | 8,9 b | 28,6 b | 12.216 a | 11.138 b |
| AG1656PRO2 | 9,3 b | 27,5 b | 13.207 a | 12.670 a |
| AG9040YG | 8,7 b | 35,4 a | 11.771 a | 11.367 b |
| AG8025PRO | 7,1 b | 25,8 b | 12.249 a | 12.708 a |
| AG9010PRO | 8,8 b | 30,1 a | 10.962 b | 10.407 b |
| DKB240PRO2 | 7,8 b | 21,4 b | 10.497 b | 9.878 b |
| DKB250PRO2 | 5,6 b | 25,0 b | 10.572 b | 10.630 b |
| AS1555PRO | 9,9 b | 24,0 b | 12.478 a | 12.287 a |
| Status 7205 | 5,8 b | 28,1 b | 11.818 a | 11.201 b |
| BG7049H | 23,3 a | 26,7 b | 15.556 a | 13.659 a |
| 30K64HNSR | 11,1 b | 22,7 b | 12.972 a | 12.457 a |
| 30S31H | 22,9 a | 28,9 b | 8.394 b | 8.749 b |
| P4285 | 3,2 b | 18,5 b | 10.413 b | 10.454 b |
| P1630H | 20,0 a | 32,8 a | 10.587 b | 10.249 b |
| P32R48H | 35,8 a | 39,6 a | 10.683 b | 10.466 b |
| P30F35YH | 24,9 a | 26,0 b | 14.098 a | 13.503 a |
| P3646H | 16,9 a | 28,3 b | 11.899 a | 12.423 a |
| P30S31HR | 18,6 a | 32,0 a | 11.720 a | 11.070 b |
| P30K64YH | 9,8 b | 27,5 b | 12.731 a | 12.472 a |
| P30S31YH | 26,6 a | 28,1 b | 11.068 b | 10.687 b |
| Média | 14,2 | 27,8 | 11.794 | 11.424 |
| C.V. (%) | 27,4 | 9,6 | 14,7 | 15,9 |

¹Dados transformados transformados $(x+1)^{1/2}$; valores de médias não transformados.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Na Tabela 15 consta a escala de reação à giberela em que foi correlacionada uma escala de classes com intensidade de giberela, após inoculação artificial com injeção no canal do estilo estigma e ferimento dos grãos no centro da espiga. A escala de classes foi gerada através da modificação das classes da escala diagramática proposta por REID et al. (1996). A intensidade de giberela foi obtida através da utilização das notas

da nova escala de classes na equação integrada proposta por MCKINNEY (1923). Os intervalos de intensidade de giberela foram gerados relacionando os seus valores com suas respectivas classes. Através da criação da escala de reação foi possível classificar híbridos quanto aos níveis de resistência.

Tabela 15: Escala de reação à giberela correlacionando intensidade de doença e escala de classes, após inoculação artificial com injeção no canal do estilo estigma e fermento dos grãos no centro da espiga.

| Classes | Intensidade de giberela (%) | Reação |
|---------|-----------------------------|--------------------------|
| 0 | 0 | Resistente |
| 1 | 1 - 16,6 | Moderadamente Resistente |
| 2 | 16,7 - 33,2 | Moderadamente Suscetível |
| 3 | 33,3 - 49,9 | Suscetível |
| 4 | 50,0 - 100,0 | Altamente Suscetível |

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Dos 20 híbridos comerciais avaliados 12 foram classificados como moderadamente resistentes (Dow2B587HX, AG1656PRO2, AG9040YG, AG8025PRO, AG9010PRO, DKB240PRO2, DKB250PRO2, AS1555PRO, Status, 30K64HNSR, P4285, P30K64YH), após inoculação no canal do estilo estigma. No entanto, quando os híbridos foram submetidos ao método de fermento nos grãos 17 híbridos comerciais foram classificados como moderadamente suscetível e os híbridos P1630H, P32R48H e P30S31HR como suscetível. A diferença de reação existente entre os genótipos e entre os métodos de inoculação reforçam o envolvimento de mecanismos que inibem a infecção e a colonização de *F. graminearum* (Tabela 16).

Resultados da análise conjunta de intensidade de giberela envolvendo os dois principais mecanismos de resistência (resistência do estigma e resistência do grão) classificaram os híbridos comerciais AG8025PRO, DKB250PRO2, AS1555PRO, Status, 30K64HNSR e P4285 como moderadamente resistente. Os híbridos Dow2B587HX, AG1656PRO2, AG9040YG, AG9010PRO, AG240PRO, BG7049H, P30F35YH, P3646H, P30S31HR, P30K64YH, P30S31YH como moderadamente suscetíveis e os híbridos P1630H e P32R48H como suscetíveis ao fungo (Tabela 17).

Em relação ao tipo de ciclo 80% dos híbridos avaliados são considerados de ciclo precoce e 20% superprecoce. Destes 20% apresentam grão duro, 55% semiduro, 15% semidentado e 10% dentado

(Tabela 12). Os dois híbridos mais resistentes são de ciclo precoce e grão duro e os dois genótipos mais suscetíveis são de ciclo superprecoce e grão semidentado e semiduro.

Tabela 16: Intensidade média de giberela e reação de híbridos de milho comerciais após inoculação artificial de *Fusarium graminearum* através de injeção no canal do estilo estigma e de ferimento dos grãos no centro das espigas no ambiente 1 e ambiente 2, safra agrícola 2012/13. Cruz Alta, RS.

| Híbridos | Intensidade de giberela (%) | Reação à giberela | Intensidade de giberela (%) | Reação à giberela |
|----------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| | Estilo-estigma | | Ferimento | |
| Ambiente 1 e 2 | | | | |
| Dow2B587HX | 14,5 | Moderadamente Resistente | 28,5 | Moderadamente Suscetível |
| AG1656PRO2 | 12,5 | Moderadamente Resistente | 28,2 | Moderadamente Suscetível |
| AG9040YG | 8,7 | Moderadamente Resistente | 25,6 | Moderadamente Suscetível |
| AG8025PRO | 7,8 | Moderadamente Resistente | 22,7 | Moderadamente Suscetível |
| AG9010PRO | 7,5 | Moderadamente Resistente | 28,3 | Moderadamente Suscetível |
| DKB240PRO2 | 10,4 | Moderadamente Resistente | 31,3 | Moderadamente Suscetível |
| DKB250PRO2 | 5,8 | Moderadamente Resistente | 23,9 | Moderadamente Suscetível |
| AS1555PRO | 9,4 | Moderadamente Resistente | 21,6 | Moderadamente Suscetível |
| Status 7205 | 4,4 | Moderadamente Resistente | 22,4 | Moderadamente Suscetível |
| BG7049H | 18,2 | Moderadamente Suscetível | 26,0 | Moderadamente Suscetível |
| 30K64HNSR | 12,9 | Moderadamente Resistente | 20,1 | Moderadamente Suscetível |
| 30S31H | 17,0 | Moderadamente Suscetível | 31,7 | Moderadamente Suscetível |
| P4285 | 1,6 | Moderadamente Resistente | 16,9 | Moderadamente Suscetível |
| P1630H | 41,4 | Suscetível | 49,0 | Suscetível |
| P32R48H | 40,8 | Suscetível | 36,4 | Suscetível |
| P30F35YH | 24,5 | Moderadamente Suscetível | 29,3 | Moderadamente Suscetível |
| P3646H | 18,3 | Moderadamente Suscetível | 29,1 | Moderadamente Suscetível |
| P30S31HR | 17,6 | Moderadamente Suscetível | 34,8 | Suscetível |
| P30K64YH | 12,3 | Moderadamente Resistente | 22,0 | Moderadamente Suscetível |
| P30S31YH | 19,0 | Moderadamente Suscetível | 29,7 | Moderadamente Suscetível |
| Média | 15,2 | | 13,8 | |
| CV (%) | 27,5 | | 25,3 | |

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

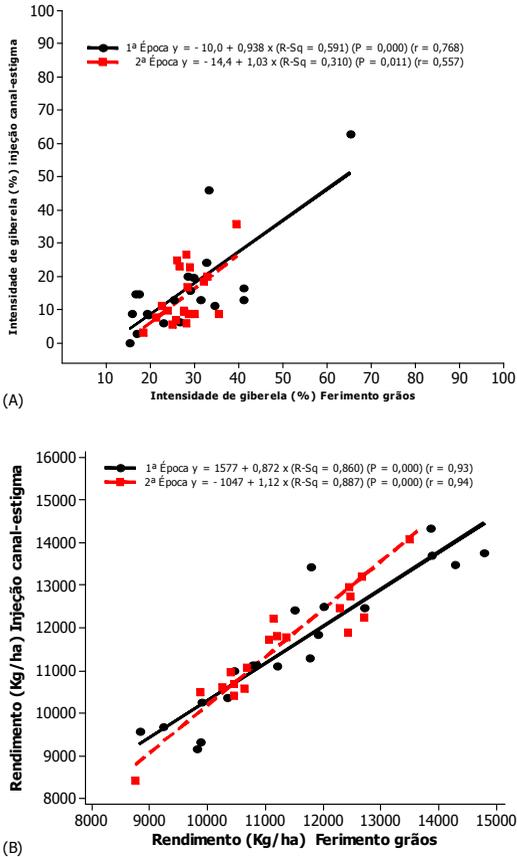
Tabela 17: Intensidade média de giberela e reação de híbridos de milho comerciais após a utilização conjunta dos métodos de inoculação de injeção no canal do estilo estigma e de fermento dos grãos no centro das espigas.

| Híbrido | Intensidade média de giberela (%) ¹ | Reação à podridão de giberela |
|----------------|--|----------------------------------|
| | Injeção canal-estigma + Ferimento | |
| Ambiente 1 e 2 | | |
| Dow2B587HX | 21,5 | Moderadamente Suscetível |
| AG1656PRO2 | 20,4 | Moderadamente Suscetível |
| AG9040YG | 17,2 | Moderadamente Suscetível |
| AG8025PRO | 15,3 | Moderadamente Resistente |
| AG9010PRO | 17,9 | Moderadamente Suscetível |
| DKB240PRO2 | 20,8 | Moderadamente Suscetível |
| DKB250PRO2 | 14,8 | Moderadamente Resistente |
| AS1555PRO | 15,5 | Moderadamente Resistente |
| Status 7205 | 13,4 | Moderadamente Resistente |
| BG7049H | 22,1 | Moderadamente Suscetível |
| 30K64HNSR | 16,5 | Moderadamente Resistente |
| 30S31H | 24,4 | Moderadamente Suscetível |
| P4285 | 9,3 | Moderadamente Resistente |
| P1630H | 45,2 | Suscetível |
| P32R48H | 38,6 | Suscetível |
| P30F35YH | 26,9 | Moderadamente Suscetível |
| P3646H | 23,7 | Moderadamente Suscetível |
| P30S31HR | 26,2 | Moderadamente Suscetível |
| P30K64YH | 17,2 | Moderadamente Suscetível |
| P30S31YH | 24,3 | Moderadamente Suscetível |
| CV (%) | 21,1 | |

Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

Houve correlações significativas e positivas nos dois ambientes entre intensidade de giberela com injeção de inóculo no canal do estilo estigma e intensidade de giberela com fermento dos grãos com $r = 0,77$ no ambiente 1 e de $r = 0,56$ no ambiente 2. E correlações entre produtividade com injeção de inóculo no canal do estilo estigma e produtividade com fermento dos grãos com correlações de $r = 0,93$ e $r = 0,94$ para o ambiente 1 e 2, respectivamente (Figura 8).

Figura 8: Correlação entre intensidade de giberela em híbridos inoculados através de injeção de inóculo no canal do estilo estigma e intensidade de giberela com o método de ferimento dos grãos (A), produtividade em híbridos inoculados através de injeção de inóculo no canal do estilo estigma e produtividade com o método de ferimento dos grãos (B), em dois ambientes.



Fonte: Produção do Próprio Autor (2014).

5.6 DISCUSSÃO

De acordo com os dados obtidos nos experimentos foi observado que híbridos e métodos de inoculação influenciaram significativamente a intensidade de giberela como verificado por SCHAAFSMA et al. (2006) e PRESELLO et al. (2004), demonstrando desta forma, que existem diferenças genotípicas entre híbridos e o envolvimento de diferentes tipos de resistência à doença como verificado por CHUNGU et al. (1996) e REID et al. (1992). Estes autores apontam que a resistência do estigma evita que o fungo infecte os grãos através dos estigmas e a resistência do grão evita a infecção e colonização do fungo de grão a grão. ALI et al. (2005) e REINPRECHT et al. (2008) concluíram que a resistência do estigma e do grão para podridão de giberela são características independentes em milho, apresentando diferenciado controle genético.

Neste trabalho os métodos de inoculação tiveram maior efeito corroborando com SCHAAFSMA et al. (1997) que também encontraram menores contribuições das interações entre “híbrido x método”, “híbrido x ano” e “híbrido x método x ano” no erro total. Foram classificados 12 híbridos como moderadamente resistentes, seis como moderadamente suscetíveis e dois suscetíveis quando foi avaliada a resistência do estigma através do método de injeção e quando utilizado o método de ferimento que visou avaliar a resistência do grão, 17 híbridos foram moderadamente suscetíveis e três suscetíveis. Foi concluído através dos resultados que os híbridos disponibilizados pelas companhias de sementes no Brasil apresentam maior fonte de resistência do estigma do que dos grãos, fato que corrobora com PRESELLO et al. (2005), que afirmam que as fontes para essa resistência do grão são muito limitadas em comparação com fontes de resistência do estigma. REID et al. (2003) concluíram que existem poucos híbridos com boa resistência para ambas as vias de infecção do fungo.

De acordo com SCHAAFSMA et al. (1997) a maioria dos híbridos comerciais testados no Canadá são suscetíveis ou altamente suscetíveis à giberela, independente da utilização do método de injeção ou ferimento dos grãos. Estes autores classificaram somente dois híbridos como moderadamente resistente para ambos os métodos de inoculação.

A intensidade de giberela após inoculação no canal do estilo estigma e ferimento dos grãos foi similar entre os ambientes, 16,3% e 28,0% (ambiente 1) e de 14,2% e 27,8% (ambiente 2) e maior severidade foi verificada quando se utilizou o método de ferimento dos

grãos. SCHAAFSMA et al. (2006) avaliando a suscetibilidade de genótipos de milho destinados a alimentação em Ontario, constataram o mesmo comportamento quando avaliaram 37 genótipos em 1999, oito genótipos em 2000 e 24 genótipos em 2001.

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

Os híbridos hiper e superprecoces são normalmente mais exigentes em condições edáficas e climáticas favoráveis para expressarem o seu potencial produtivo (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000). Em regiões quentes e úmidas, eles podem apresentar maiores problemas com doenças, pois possuem maior quantidade de gens de linhagens de clima temperado (BLUM et al., 2003). Esta tendência foi observada neste trabalho, pois os híbridos mais suscetíveis a giberela são de ciclo superprecoce.

Quanto à textura do grão os dois híbridos mais resistentes apresentaram grão duro. DOKO et al. (1996), assim como CZEMBOR AND OCHODZKI (2009) encontraram maior resistência a podridões de espiga causada por *Fusarium* spp. em híbridos de milho com endosperma do tipo duro quando comparado a híbridos de endosperma do tipo dentado. WIT et al. (2011) reportaram que *Zea mays* var. *indentata* foi mais suscetível a *F. graminearum* do que *Z. mays* var. *indurata*, contudo a resposta do hospedeiro foi dependente do método de inoculação utilizado. Neste estudo, diferenças significativas na severidade de giberela foram encontradas somente com a utilização do método de inoculação no estilo estigma. O método que utilizou ferimentos não diferenciou genótipos de endosperma duro e dentado.

A intensidade de giberela entre os híbridos avaliados após injeção no canal do estilo estigma foi correlacionada positivamente com intensidade de doença após inoculação com o método de ferimentos. O mesmo comportamento foi relatado por LOFFLER et al. (2010) com $r = 0,66$ e PRESELLO et al. (2004) com $r = 0,64$ em 1999 e $r = 0,64$ em 2000. Entretanto houve híbridos com intensidade de doença muito diferente em ambos os métodos de inoculação, ou seja, apresentaram

maior resistência para o método de injeção no estilo estigma e quando utilizado o método de fermento nos grãos foram suscetíveis.

Para avaliar a reação de híbridos de milho a giberela faz-se necessário à utilização conjunta dos métodos de injeção de inóculo no estigma e fermento nos grãos, e a partir da média de intensidade de doença é permitido classificar híbridos quanto ao nível de resistência e suscetibilidade. A escala de reação à giberela desenvolvida neste trabalho permitiu correlacionar intensidade de doença e escala de classes e determinar com clareza o que é um híbrido resistente, moderadamente resistente, suscetível, e moderadamente suscetível. Com a utilização desta metodologia, apenas seis híbridos foram classificados como moderadamente resistentes. Estes resultados corroboram com MUNKVOLD (2003b) e REINPRECHT et al. (2008) em que apontam que a maioria dos híbridos comerciais não apresentam resistência a podridão de giberela.

O único fator que interferiu na produtividade de grãos foi híbrido. Os dados demonstraram a busca e evolução por parte das companhias de sementes por híbridos mais produtivos. Percebemos que mesmo materiais suscetíveis à giberela, como o P1630H e o P32R48H não diferiram estatisticamente do híbrido P4285, que obteve o maior nível de resistência, independente do método de inoculação e época de semeadura. ROSSET et al. (2013) avaliando a performance do P4285HX no Paraná, quanto a podridão da base do colmo e de espiga concluíram que este genótipo apesar de ter sido assintomático as doenças formou um grupo inferior quanto ao rendimento de grãos.

Os métodos de inoculação artificial não provocaram interferência na produtividade de grãos. MARIO et al. (2003) avaliaram a reação de seis híbridos de milho a *Diplodia maydis* inoculados artificialmente e concluíram que os métodos de inoculação não afetaram significativamente o rendimento de grãos nos dois anos de condução dos ensaios. Através dos dados obtidos foi concluído que o método de inoculação foi um fator redutor mais da qualidade do que da quantidade. Pois, independente do ambiente o método de fermento dos grãos propiciou a maior intensidade da doença.

Foi encontrado nos dois ambientes um elevado grau de dependência estatística linear entre a variável produtividade com o método de injeção de inóculo no canal do estilo estigma e produtividade com o método de fermento dos grãos, o que significa que elas foram estatisticamente dependentes. A produtividade com injeção de inóculo no canal do estilo estigma foi acrescida em 0,872 Kg a cada Kg acrescido na produtividade com fermento dos grãos no ambiente 1 e

1,12 Kg no ambiente 2. A determinação da relação existente entre estas variáveis é extremamente importante, uma vez que ao avaliar a produtividade de grãos com um método de inoculação é possível prever indiretamente a produtividade com outro método. Isto possibilita a redução de custos operacionais e de tempo em ensaios de reação de híbridos.

Os resultados deste estudo demonstraram que existem diferenças genotípicas de resistência entre os híbridos à podridão de giberela e que o conhecimento da reação de híbridos a esta doença pode auxiliar no seu controle, uma vez que práticas culturais que envolvem rotação e sucessão de culturas, adubação equilibrada, épocas escalonadas de semeadura, arranjo e população de plantas, não tem tido sucesso satisfatório como estratégias de controle da doença (MUNKVOLD, 2003b; WORDELL FILHO & CASA, 2010; REIS et al., 2011).

5.7 CONCLUSÕES

A metodologia empregada no presente trabalho pode ser útil em programas de melhoramento do milho para encontrar possíveis fontes de resistência do estigma e dos grãos, pois a utilização conjunta destes dois métodos de inoculação visou aumentar a pressão de seleção e confiabilidade nos resultados por envolver os dois principais mecanismos de resistência a giberela. Além de ser uma ferramenta importante para as companhias de sementes caracterizarem seus materiais comerciais, possibilitando desta forma, elucidar de forma clara e objetiva aos produtores de milho, técnicos e pesquisadores os níveis de resistência e suscetibilidade dos híbridos para giberela.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A podridão de giberela tem se tornado uma das doenças de maior frequência e importância na cultura do milho, além de causar problemas em outras gramíneas cultivadas no Brasil, em virtude de manutenção do inóculo do fungo nos resíduos culturais, presente no sistema de Plantio Direto, sendo denominada de “doença do plantio direto”. A dificuldade de controle da doença por práticas culturais faz com que a caracterização de híbridos de milho a infecção de *F. graminearum* seja imediata e de fundamental prioridade dentro de programas de melhoramento genético.

Com base nos resultados deste trabalho pode-se concluir que não há resistência completa a podridão de giberela nos híbridos avaliados. Porém, existem diferentes níveis de suscetibilidade. Desta forma, mais estudos visando avaliação de diferentes híbridos, isolados e diferentes condições ambientais devem ser conduzidos para maiores informações de resistência à giberela.

Os métodos de inoculação artificial através de injeção de inóculo no canal do estilo estigma e de ferimento nos grãos foram eficazes para avaliar híbridos de milho para resistência a *Fusarium graminearum* e devem ser utilizados em conjunto para discriminar resistência do estigma e resistência dos grãos. Estes métodos também poderão ser utilizados em estudos para avaliar resistência de híbridos a contaminação de micotoxinas, distribuição destes contaminantes nos tecidos dos grãos, e identificar híbridos resistentes e locus de características quantitativas associados com resistência a podridões de espigas.

Ainda há necessidade de pesquisas relacionando a intensidade da podridão de giberela com perdas na cultura do milho, tanto no aspecto quantitativo como qualitativo.

7. REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J. **Introductory mycology**. 2 ed. New York: Wiley & Sons. 1962, 613p.
- ALI, M. L.; TAYLOR, J. H.; JIE, L.; SUN, G.; WILLIAM, M.; KASHA, K. J.; REID, L. M.; PAULS, K. P. Molecular mapping of QTLs for resistance to *Gibberella* ear rot, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. **Genome**, v. 48, p. 521–533, 2005.
- ANDERSEN, A. L. The development of *Gibberella zeae* head- blight of wheat. **Phytopathology**, Iowa, v. 38, p. 599-611, 1948.
- ANDRIOLI, C. F.; CASA, R. T.; SANGOI, L. ; NERBASS, F. R.; WEBER, G. C.; STOLTZ, J. C.; FINGSTAG, M. Severidade da giberela nas espigas de milho em resposta a aplicação de fungicida durante o estágio do espigamento. In: **IX Reunião Técnica Catarinense de Milho**. Campos Novos, v. 1, p. 1-4, 2013.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. **Mycologia**, v. 91, p. 597-609, 1999.
- ASSABGUI, R. A.; REID, L. M.; HAMILTON, R. I.; ARNASON, J. T. Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. **Phytopathology**, Iowa, v. 83, p. 949-953, 1993.
- ASTOLFI, P. et al. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 197-201, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511003023>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- ASTOLFI, P. et al. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. **Plant Pathology**, v. 61, p. 289-295, 2012. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365059.2011.02515.x/full>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F. da; SANGOI, L. Arranjo de plantas em milho: análise do estado da arte. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 1075-1084, 2001.

AYERS, J. E.; PEMYPACKER, S. P.; NELSON, P. E.; PEMYPACKER, B. W. Environmental factors associated with airborne ascospores of *Gibberella zeae* in corn and wheat fields **Phytopathology**, Iowa, v. 65, p. 835, 1975.

BAKAN, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D.; CAHAGNIER, B. Fungal growth and Fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 728-731, 2002.

BEREK L.; PERTI I. B.; MESTERHÁZY A.; TÉREN J., MOLNÁR J. Effect of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 25-30, 2001.

BERGVINSON, D. J.; REID, L. M. Phytochemical mechanism of resistance to ear rots. **MNL**, v. 69, p.114-115, 1995.

BLUM, L. E.; SANGOI, L.; AMARANTE, C. V. T.; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L. S. Desfolha, população de plantas e precocidade do híbrido afetam a incidência e severidade de podridões de colmo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 805-811, 2003.

BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Kew: **Commonwealth Mycological Institute**, 1971. 237p.

BOLDUAN C.; MIEDANER T.; SCHIPPRACK W.; DHILLON B. S.; MELCHIGER A. E. Genetic variation for resistance to ear rots and mycotoxins contamination in early European maize inbred lines. **Crop Science**, Madison, v. 49, p. 2019-2028, 2009.

BOUTIGNY, A.; WARD, T. J.; VANCOLLER, G. J.; FLETT, B.; LAMPRECHT, S. C.; O'DONNELL, L.; VILJOEN, A. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. **Fungal Genetics and Biology**. Article In Press, 2011.

BRASIL. Portaria nº 11 de 12 de abril de 1996. Estabelece critérios complementares para classificação do milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 72, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011. Estabelece o regulamento Técnico do Milho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 dez. 2011, nº 246, Seção 1, p. 3-5. 2011.

BRITO A. H.; PEREIRA J. L. A. R.; GARCIA R.; PINHO V.; BALESTRE M. Controle químico de doenças foliares e grãos ardidos em milho (*Zea mays* L.) **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, p. 49-59, 2012.

CARTER, J. P.; REZANOOR, H. N.; HOLDEN, D.; DESJARDINS, A. E.; R. D. PLATTNER, R. D.; NICHOLSON, P. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 573-583, 2002.

CASA, R. T., REIS, E. M.; MEDEIROS, C. A.; MOURA, F. B. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicidas, na proteção de fungos do solo, no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 633-638, 1995.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; SEVERO, R.; DENTI, E.; TRENTO, S.; BLUM, M. M. C. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: Sandini, I.A. & Fancelli, A.L. **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. **Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis***. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 355-361, 2003.

CASA, R. T.; MOREIRA E. M.; 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**, Botucatu, v. 33, p. 353-357, 2007.

CASA, R. T.; SACHS, C.; AGOSTINETTO, L., CECCON, G. Produção de peritécios de *Gibberella zeae* em táxons de gramíneas. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 35, p. 136, 2010.

CASA, R. T.; KUHNEM JÚNIOR, P. R. Danos causados nos hospedeiros. In: **Seminário sobre Giberela em Cereais de Inverno**, Passo Fundo: Berthier, p. 131-164., 2011.

CHRISTENSEN, I. I.; SCHNEIDER, C. L. European corn borer (*Pyrausta nubilalis*), in relation to shank, stalk and ear rots of corn. **Phytopathology**, Iowa, v. 40, p. 284-291, 1950.

CHUNGU C.; MATHER D. E.; REID L. M.; HAMILTON R. I. Comparison of techniques for inoculating maize silk, kernel, and cob tissues with *Fusarium graminearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 81-84, 1996.

CLEMENTS M. J.; KLEINSCHMIDT C. E.; MARAGOS C. M.; PATAKY J. K.; WHITE D. G. Evaluation of inoculation techniques for *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination of corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 147-153, 2003.

CONAB. **Indicadores agropecuários**: extraído de www.conab.gov.br – setembro de 2013.

CREPPY E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

CULLEN, D., CALDWELL, R. W., SMALLEY, E. B. Cultural characteristics, pathogenicity and zearalenone production by strains of *Gibberella zeae* isolated from corn. **Phytopathology**, Iowa, v. 72, p. 1415-1418, 1982.

CZEMBOR E., OCHODZKI P., Resistance of flint and dent maize forms for colonization by *Fusarium* spp. and mycotoxins contamination. **Maydica**, Bergamo, v. 54, p. 263–267, 2009.

DESJARDINS, A. E.; JAROSZ, A. M.; PLATTNER, R. D.; ALEXANDER, N. J.; BROWN, D. W.; JURGENSON, J. E. Patterns of trichothecene production, genetic variability, and virulence to wheat of

Fusarium graminearum from smallholder farms in Nepal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6341- 6346, 2004.

DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R. H. Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. **Fungal Biology**, v. 115, p. 38-48, 2011.

DILL-MACKY R.; JONES R. K. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 71-76, 2000.

D'MELLO J. P. F. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science Technology**, v. 80, p. 183-205, 1999.

DOKO M. B., CANET C., BROWN N., SYDENHAM E. W., MPUCHANE S., SIAME B. A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 44, p. 3240–3243, 1996.

EMBRAPA Milho e Sorgo – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do milho**, 2011.

EMYGDIO B. M.; ROSA A. P. S. A.; TEIXEIRA M. C. C. **Indicações técnicas para o cultivo de milho e de sorgo no Rio Grande do Sul safras 2013/2014 e 2014/2015**. Embrapa, Brasília, DF. 2013. 124p.

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

FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Milho: estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba. ESALQ/USP. 208p. 2003.

FAOSTAT. Statistical databases and data-sets of the Food and Agriculture organization of the United Nation, extraído de www.faostat.fao.org – abril de 2011.

FARRAH, J. J.; DAVIS, R. M. Relationship among ear morphology, western flower thrips and fusarium ear rot of corn. **Phytopathology**, Iowa, v. 81, p. 661-666, 1991.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2000. 80p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 26);

FERNANDEZ, M. R.; FERNANDES, J. M. C. Survival of wheat pathogens in wheat and soybean residues under conservation tillage systems in southern and central Brazil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 12, p. 289-294, 1990.

FRANCIS, R. G.; BURGESS, L. W. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* "Graminearum" in Eastern Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 68, (3), p. 421-427, 1977.

GULYA, T. J., JR., C. A. MARTINSON; P. J. LOESCH, J. R. Evaluation of inoculation techniques and rating dates for *Fusarium moniliforme* ear rot of *opaque-2* maize. **Phytopathology**, Iowa, v. 70, p. 1116-1118, 1980.

HOENISCH, R. W., DAVIS R. M. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in field corn. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 517-519, 1994.

JULIATTI F. C.; ZUZA, J. L. M. F.; SOUZA, P. P.; POLIZEL A. C. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, p. 34-41, 2007.

KIESSLING, K. H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 327-338, 1986.

KOEHLER B. Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infections. **Journal of Agricultural Research**, v. 64, p. 421-442. 1942.

KHONGA E. B.; SUTTON J. C. Inoculum production and survival of *Gibberella zeae* in maize and wheat residues. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 10, p. 232-239, 1988.

LANGSETH, W.; RUNDBERGET, T. Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. **Journal of Chromatography**, v. 815, p. 103-121, 1998.

LAZZARI, F. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Ed. do autor, Curitiba, PR. 2ª ed., 134p. 1997.

LEW, A., ADLER, A., EDINGER, W. Moliniformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). **Mycotoxin Research**, Giessen, v. 7, p. 71-76, 1991.

LESLIE, J. F.; SUMMEREL, B. A. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell. **Professional Publishing**, Ames, Iowa, USA, 2006.

LOESCH, P. J, FOLEY, D. C., COX, D. F. Comparative resistance of *opaque-2* and normal inbred lines of maize to ear-rotting pathogens. **Crop Science**, Saint Paul, v. 16, p. 841-842, 1976.

LÖFFLER, M.; MIEDANER, T.; KESSEL, B.; OUZUNOVA, M. Mycotoxin accumulation and corresponding ear rot rating in three maturity groups of European maize inoculated by two *Fusarium* species. **Euphytica**, Wageningen, v. 174, p. 153-164, 2010.

LOGRIECO A.; MULE G.; MORETTI A.; BOTTALICO A. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 597-609, 2002.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria: Sociedade Vicente Pallotti, 2009. 240p.

MALLMANN, C. A., MARCHIORO, A., SILVEIRA, V. G., DILKIN, P. Principais micotoxinas no milho e dimensão do problema no mercado brasileiro. In: **Diversidade e Inovação na Cadeia Produtiva de Milho e Sorgo na era dos Transgênicos**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2012. p. 233-250.

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

MARTINELLI, J. A.; BOCCHESI, C. A. C.; ROSEWICH GALE, L.; XIE, W.; O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C. Soybean is a host for *Fusarium graminearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 132, agosto, 2002, Suplemento.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195-217, 1923.

MEDINA, P. F.; TANAKA, M. A. S.; PARISI, J. J. D. Potencial fisiológico de sementes de triticale (X. tritico-secale Wittmack) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n. 4, p. 17-26, 2009.

MESTERHÁZY, A.; BÁRTOR, T. Control of Fusarium head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the grains. **Pflanzenschutz-nachrichten Bayer**, Leverkusen, v. 49, p. 181-198, 1996.

MESTERHÁZY, Á.; LEMMENS, M.; REID, L. M. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize – a review. **Plant Breeding**, v. 131, p. 1-19, 2012.

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

MUNDSTOK, C. M. **A evolução genética e da tecnologia de cultivo de milho no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Evangraf, 2004. 34p.

MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; RICE, L. G. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p.130-138, 1999.

MUNKVOLD, G. P.; HELLMICH, R. L.; SHOWERS, W. B. Reduced Fusarium ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. **Phytopathology**, Iowa, v. 87, p. 1071-1077, 1997.

MUNKVOLD, G. P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 99-116, 2003a.

MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 705-713, 2003b.

NASCIMENTO, J. P. **Avaliação de métodos de inoculação de *Gibberella zeae* em espigas de milho**. 37 p. (Dissertação Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2010.

NERBASS, F. R., CASA, R. T. Teores de gordura bruta e proteína bruta em grãos ardidos comparados a grãos regulares de milho, destinados a alimentação animal In: **VI Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão**, Concórdia, 2007, p. 80-83.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; TACKE, B. K.; CASPER, H. H. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 97, p. 7905-7910, 2000.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; GEISER, D. M.; KISTLER, H. C.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 600-623, 2004.

PANISSON, E., HOFFMANN, L. L.; REIS, E. M. Ocorrência de *Fusarium graminearum* em sementes de soja. **Anais... Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul, XXVIII**. Santa Maria, 2000.

PANISSON, E., REIS, E. M., BOLLER, W. Quantificação de propágulos de *Gibberella zeae* no ar e infecção de anteras em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 484-488, 2002.

PARLEVLJET, J. E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 7-15, 1997. Suplemento.

PASCHOLATE, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. Ed. São Paulo: Ceres, 1995f, v. 1, p.417-453.

PEREYRA, S. A.; DILL-MACKY, R.; SIMS, A. L. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 88, p. 724-730, 2004.

PEREYRA, S. A., DILL-MACKY, R. Colonization of the residues of diverse plant species by *Gibberella zeae* and their contribution to *Fusarium* head blight inoculum. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 92, p. 800-807, 2008.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 663-679, 2010.

PESTKA, J. J.; BONDY, G. S. Immunotoxic effects of mycotoxins. In: Miller JD, Trenholm HL (Eds.) *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*. Saint Paul MN. **The American Phytopathological Society**, pp. 339-358. 1994.

PINTO, N. F. J. de A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Milho. In: VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L. (Eds). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. p.821-863.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; BATTILANI, P.; PIVA, G. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 927-931, 2009.

PRESELLO, D. A., REID, L. M.; MATHER, D. E.: Resistance of Argentine maize germplasm to *Gibberella* and *Fusarium* ear rots. **Maydica**, Bergamo, v. 49, p. 73-81. 2004.

PRESELLO, D. A.; BOTTA, G.; IGLESIAS, J.; EYHÉRABIDE, G. H. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of

maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. **Crop Protection**, v. 27, p. 572-576, 2008.

PRELUSKY, D. B.; ROTTER, B. A.; ROTTER, R. G. Toxicology of mycotoxins. In: Miller JD, Trenholm HL (Eds.) *Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin*. Saint Paul MN. **The American Phytopathological Society**. pp. 359-403. 1994.

REID, L. M.; BOLTON, A. T.; HAMILTON, R. I.; WOLDEMARIAN, T.; MATHER, D. E. Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 14, p. 293-298, 1992a.

REID, L. M.; MATHER, D. E.; HAMILTON, R. I. Observation of silk resistance to *Fusarium graminearum* in germplasm with resistance to *Aspergillus flavus* and *Heliothis zea*. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 66, p. 85-86, 1992b.

REID, L. M.; MATHER, D. E.; HAMILTON, R. I.; BOLTON, A. T. Genotypic differences in the resistance of maize silk to *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 14, p. 211-214, 1992c.

REID, L. M.; SPANER, D.; MATHER, D. E.; BOLTON, A. T.; HAMILTON, R. I. Resistance of maize hybrids and inbreds following silk inoculation with three isolates of *Fusarium graminearum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 1248-1251, 1993.

REID, L. M., MATHER, D. E., BOLTON, A. T., HAMILTON R. I. Evidence for a gene for silk resistance to *Fusarium graminearum* Schwabe ear rot of maize. **Journal of Heredity**, v. 85, p. 118-121, 1994.

REID, L. M., HAMILTON, R. I., MATHER, D. E. Screening maize for resistance to gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON. **Technical Bulletin** 1996-5E. 1996.

REID, L. M.; HAMILTON, R. I. Effects of inoculation position, timing, macroconidial concentration and irrigation on resistance of maize to *Fusarium graminearum* infection through kernels. **Can. J. Plant Pathology**, v. 18, p. 279-285, 1996a.

REID, L. M.; STEWART, D. W.; HAMILTON, R. I. A. 4-year study of the association between *Gibberella* ear rot severity and deoxynivalenol concentration. **Jounal of Phytopathology**, v. 144, p. 431-436, 1996b.

REID, L. M.; SINHA, R. C.: Maize maturity and the development of *Gibberella* ear rot symptoms and deoxynivalenol after inoculation. **European Journal Plant Pathology**, v. 104, p. 147-154, 1998.

REID, L. M.; NICOL, R.W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J. D.; YOUNG, J. C.; STEWART, D. W.; SCHAAFSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, Iowa, v. 89, p. 1028-1037, 1999.

REID, L. M.; MCDIARMID, G.; PARKER, A. J.; WOLDEMARIAM, T. CO441 corn inbred line. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 83, p. 79-80, 2003.

REIS, E. M. Perithecial formation of *Gibberella zeae* on senescent stems of grasses under natural conditions. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, p. 52-54. 1990.

REIS, E. M. Quantificação de propágulos de *Gibberella zeae* no ar através de armadilhas de esporos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 324-327, 1988.

REIS, E. M.; CASA, R. T. Controle de doenças fúngicas na cultura do milho em plantio direto. In: Borges, G. & Borges, L.D. **Seminário sobre tecnologia de produção e comercialização do milho**, 2000. Passo Fundo - RS. Resumo de Palestras. Editora Aldeia Norte, Passo Fundo, RS. pp. 62-71.

REIS, E. M.; CASA, R. T. Sobrevivência de fitopatógenos. In: VALE, F.X.R., JESUS JUNIOR, W.C. & ZAMBOLIM, L. (Org.). **Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte, MG, 2004 (a). p. 337-364.

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

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Doenças dos cereais de inverno: diagnose, epidemiologia e controle**. 2ed. Rev. Atual. Lages: Graphel, 2007. 176p.

REIS, E. M.; BARUFFI, D.; REMOR, L.; ZANATTA, M.
Decomposition of corn and soybean residues under field conditions and their role as inoculum source. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 37, p. 65-67, 2011a.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BIANCHIN, V. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, p. 85-91, 2011b.

REINPRECHT, Y.; WU, X. G.; YAN, S.; LABEY, L.; DASILVA, E.; MARTIN, J. C.; PAULS, K. P. A microarray-based approach for identifying genes for resistance to *Fusarium graminearum* in maize (*Zea mays* L.). **Cereal Research Communications**, v. 36, p. 253-259, 2008.

RIBEIRO, N. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA E. M.; 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, v. 35, p. 1003-1009, 2005.

RONEY, J. The Beginnings of Maize Agriculture. **Archaeology Southwest**, v. 23, n. 1, p. 4, 2009.

SANDINI, I. E.; FANCELLI, A. L. **Milho**: estratégias de manejo para a região Sul. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária. 2000. 209 p.

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

SANGOI, L. et al. Arranjo espacial de plantas: como otimizá-lo para o rendimento de grãos. Congresso Brasileiro de Milho e Sorgo, XXV, 2004, Cuiabá, MT. **Anais ... Sete Lagoas: ABMS**, 2004. CD-ROM.

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

- SANGOI, L.; SILVA, P. R. F.; ARGENTA, G.; RAMBO, L.
Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos. Lages: Graphel, v. 1, 2010. 87p.
- SARVER, B.; WARD, T. J.; GALE, L. R.; BROZ, K.; KISTLER, H. C.; AOKI, T.; NICHOLSON, P.; CARTER, J.; O'DONNELL, K. Novel Fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 1096-1107, 2011.
- SCHAAFSMA, A. W.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E.; EWING, R. J. Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method, corn hybrid, and species of *Fusarium*. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 15, p. 185-192, 1993.
- SCHAAFSMA, A. W.; NICOL, R. W.; REID, L. M.; Evaluating commercial maize hybrids for resistance to Gibberella ear rot. **European Journal Plant Pathology**, v. 103, p. 737-746, 1997.
- SCHAAFSMA, A. W.; HOOKER, D. C.; BAUTE, T. S.; ILLINCIC-TAMBURIC, L. Effect of Bt corn hybrids on deoxynivalenol content in grain at harvest. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p.1123-1126, 2002.
- SCHAAFSMA, A. W.; TAMBURIC-ILLINCIC, L.; HOOKER, D. C. Effect of previous crop, tillage, field size, adjacent crop, and sampling direction on airborne propagules of *Gibberella zeae/Fusarium graminearum*, fusarium head blight severity, and deoxynivalenol accumulation in winter wheat. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 27, p. 217-224, 2005.
- SCHAAFSMA, A. W.; TAMBURIC-ILLINCIC, L.; REID, L. M. Fumonisin B₁ accumulation and severity of fusarium ear rot and gibberella ear rot in food-grade corn hybrids in Ontario after inoculation according to two methods. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 28, p. 548-557, 2006.
- SCUSSEL, V. M. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem qualitativa de grãos II** Organizado e editado por Vildes Maria Scussel. Florianópolis: Ed. ABMAG, 2008. 589p.:il.

SCUSSEL, V. M. Consequências da contaminação e controle da formação de micotoxinas em grãos. In: LORINI, I.; MIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. (Ed.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 2002. p. 757-774.

SEGALIN, M.; REIS, E. M. Semi-selective medium for *Fusarium graminearum* detection in seed sample. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 4, p. 338-341, 2010.

STACK, R. W. A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *Gibberella zeae*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, p. 137-142, 1989.

STRAZZI, S. Qualidade de milho – Moagem a seco. In: Encontro nacional de micotoxinas e simpósio em armazenagem qualitativa de grãos do mercosul. 1998, Florianópolis, SC. **Resumos...** 1998, p. 53.

STRINGHINI, J. H.; MOGYCA, N. S.; ANDRADE, M. A.; ORSINE, G. F.; CAFÉ, M. B.; BORGES, A. S. Efeito da Qualidade do Milho no Desempenho de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 191-198, 2000.

STUMPF, R.; SANTOS, J.; GOMES, L. B.; SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J.; FERREIRA, F. D.; MACHINSKI JUNIOR M.; DEL PONTE, E. M. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 89-95, 2013.

SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 4, p. 195-209, 1982.

SUTTON, J. C.; BALIKO, W.: Methods for quantifying resistance to *Gibberella zeae* in maize ears. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 3, p. 26-32, 1981.

SUTY, A.; MAULER-MACHNIK, A. *Fusarium* head blight on wheat – new findings on the epidemiology and control of *Gibberella zeae* the teleomorph of *Fusarium graminearum* with Folicur. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer.**, v. 49, n. 1, p. 55-70, 1996.

SZÜTS, P.; MESTERHÁZY, A.; FALKAY, G.; BARTÓK, T. Early telarche symptoms in children and their relations to zearalenone contamination in foods tuffs. **Cereal Research Communications**, v. 25, p. 429-436, 1997.

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

TSCHANZ, A. T.; HORST, R. K.; NELSON, P. E. Ecological aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, Iowa, v. 65, p. 597-599, 1975.

United States Department of Agriculture (USDA). Prospective plantings. Available at <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/ProsPlan/ProsPlan-pdf>. Accessed on august 05, 2013.

VIGIER, B.; REID, L. M.; DWYER, L. M.; STEWART, D. W.; SINHA, R. C.; ARNASON, J. T.; BUTLER, G. Maize resistance to *Gibberella* ear rot: Symptoms, deoxynivalenol, and yield. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, p. 99–105, 2001.

WARREN, H. L. Comparison of normal and high-lysine maize inbreds for resistance to kernel rot caused by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, Iowa, v. 68, p. 1331-1335, 1978.

WIESE, M. V. Compendium of wheat diseases. **American Phytopathological Society**, Saint Paul. 2ed. 1987.

WHITE, D. G. Compendium of corn diseases. 3th Ed. **The American Phytopathological Society**. APS Press. 1999.

WIT, M.; WARZECHA, R.; MIRZWA-MRÓZ, E.; OCHODZKI, P.; WASKIEWICZ, A.; WAKULINSKI, W. Susceptibility of flint and dent maize ears to *Fusarium* species. **Phytopathologia**, v. 60, p. 35-45, 2010.

WORDELL FILHO, J.; CASA, R. T. Doenças na cultura do milho. In: Wordell Filho J, Elias HT (Eds). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Florianópolis. Epagri. pp. 207-273. 2010.

WU, F. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 363-374, 2007.

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