

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

JOSIEL PEREIRA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Gibberella zeae* EM ESPIGAS
DE MILHO**

Marechal Cândido Rondon

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

JOSIEL PEREIRA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE *Gibberella zeae* EM ESPIGAS
DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Nível Mestrado e Doutorado, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Elcio Silvério Klosowski

Marechal Cândido Rondon

2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

| | |
|-------|--|
| N244a | Nascimento, Josiel Pereira Avaliação de métodos de inoculação de <i>Gibberella zeae</i> em espigas de milho / Josiel Pereira Nascimento. - Marechal Cândido Rondon, 2010. 37 p. |
| | Orientador: Prof. Dr. Elcio Silvério Klosowski |
| | Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2010. |
| | 1. Milho safrinha. 2. Milho safrinha - podridão-vermelha-da-espiga 3. <i>Gibberella zeae</i> . 4. <i>Fusarium graminearum</i> . I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título. |
| | CDD 21.ed. 633.1 581.31 CIP-NBR 12899 |

Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 1008 - http://www.unioeste.br
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação do Biólogo **JOSIEL PEREIRA NASCIMENTO**. Aos vinte e seis dias do mês de agosto do ano de 2009, às 14:00 horas, sob a presidência do Prof. Dr. Elcio Silvério Klosowski, em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Dissertação do Biólogo JOSIEL PEREIRA NASCIMENTO, aluno do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agronomia - Nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em "**PRODUÇÃO VEGETAL**", visando à obtenção do título de "**MESTRE EM AGRONOMIA**", constituída pelos membros: Prof. Dr. Adilson Ricken Schuelter (PIONNER), Prof. Dr. José Renato Stangarlin e Prof. Dr. Elcio Silvério Klosowski (Orientador).

Iniciados os trabalhos, o candidato apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: "**Avaliação de métodos de inoculação de *Gibberella zeae* em espigas de milho**".

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof. Dr. Adilson Ricken Schuelter.....Aprovado
Prof. Dr. José Renato Stangarlin.....Aprovado
Prof. Dr. Elcio Silvério Klosowski (Orientador).....Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que o candidato foi habilitado, fazendo jus, portanto, ao título de "**MESTRE EM AGRONOMIA**", área de concentração: "**PRODUÇÃO VEGETAL**". Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 26 de agosto de 2009.

Prof. Dr. Adilson Ricken Schuelter

Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Prof. Dr. Elcio Silvério Klosowski (Orientador)

RESUMO

Avaliação de Métodos de inoculação de *Gibberella zeae* em espigas de milho.

O plantio direto e o cultivo de milho safrinha são fatores que podem proporcionar alterações no microclima e na biologia do agroecossistema, aumentando as populações de fungos como *Gibberella zeae*, agente etiológico da doença denominada giberela ou podridão-vermelha-da-espiga. Esse trabalho teve como objetivo identificar métodos de inoculação que auxiliassem na seleção e na caracterização de genótipos tolerantes à *G. zeae*. O experimento foi conduzido no município de Toledo/PR durante a safrinha de 2008. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com cinco repetições, em esquema fatorial tendo como primeiro fator os híbridos (2B710; 30F45; DKB 214; 30F98; DKB 390; AG 9020; 30F80; 30R50 e 30K73) e como segundo fator os métodos de inoculação. Os híbridos foram agrupados como suscetíveis (2B710; 30F45; DKB 214; 30K73), tolerantes (DKB 390; AG 9020; 30F80; 30R50) e moderadamente suscetível a giberela (30F98). Os 12 métodos avaliados consistiam em simular a infecção natural do fungo pelo estigma ou por danos causados por insetos nas laterais das espigas, variando ainda em ausência de cobertura (câmara úmida), cobertura por 24 horas e por 48 horas. Os métodos com inoculação de 2 mL na lateral da espiga sem cobertura (3), com cobertura por 24 horas (7) e com cobertura por 48 horas (11) se mostraram eficientes na caracterização de híbridos tolerantes e suscetíveis e poderão ser empregados em larga escala na identificação e seleção de variedades de milho tolerantes à doença. Mais do que isso, a sociedade poderá consumir produtos de milho com qualidade superior, com menos micotoxinas.

Palavras-chave: *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum*, métodos de inoculação, *Zea mays*.

ABSTRACT

Avaluation of Methods of inoculation of *Gibberella zeae* in maize. The non tillage planting and the cultivation of “safrinha” (short season) corn are factors that may provide alterations in the microclimate and in the biology of agro ecosystem, increasing the populations of fungus like *Gibberella zeae*, which is the etiologic agent of one of the maize ear rots. This work had the objective to identify inoculation methods that can be useful in the election and in the characterization of genotypes tolerant to *G. zeae*. The experiment was conducted in Toledo/PR during the 2008 “safrinha” season in a randomized complete block design with five replications, on a factorial scheme where hybrids were the first factor (2B710; 30F45; DKB 214; 30F98; DKB 390; GAC 9020; 30F80; 30R50 and 30K73) and the inoculation methods were the second factor. The hybrids had been grouped as susceptible (2B710; 30F45; DKB 214; 30K73), tolerant (DKB 390; GAC 9020; 30F80; 30R50) and moderately susceptible to giberela (30F98). The 12 evaluated methods consisted of simulating the fungus natural infection on the silk or on the damage caused by insects in the lateral of the ears, and also varying by the absence of covering on the ear (humid chamber), by covering the ear for 24 hours and by covering the ear for 48. The methods with inoculation of 2 mL in the lateral of the ear without covering (3), with covering for 24 hours (7) and with covering for 48 hours (11) had shown efficiency in the characterization of tolerant and susceptible hybrids and could be used on a large scale in the identification and selection of maize varieties with tolerance to ear rot caused by *G. zeae*. As a result, the seed industry can provide superior materials and the farmers will reduce their losses due to kernel quality. Moreover, the whole society will consume better maize products, with less mycotoxins.

Key words: *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum*, methods of inoculation, *Zea mays*.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 8 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 Obtenção de Isolados de <i>Gibberella zeae</i> | 20 |
| 3.1.1 Obtenção de isolados monospóricos..... | 20 |
| 3.2 Caracterização Morfológica..... | 20 |
| 3.3 Análise do Crescimento Micelial em Meio de Cultura Sólido..... | 20 |
| 3.4 Compatibilidade Vegetativa entre os Isolados de <i>Gibberella zeae</i> | 21 |
| 3.5 Métodos de Inoculação a Campo..... | 22 |
| 3.6 Análise dos dados..... | 24 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 26 |
| 4.1 Crescimento Micelial em Meio Sólido..... | 26 |
| 4.2 Compatibilidade Vegetativa dos Isolados..... | 27 |
| 4.3 Métodos de Inoculação a Campo..... | 27 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 35 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 36 |

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho é bastante difundida no território brasileiro, destacando-se o Paraná como um dos principais produtores nacionais e pioneiro no cultivo denominado safrinha. Conceitua-se como safrinha de milho ou 2º safra, a cultura do milho de sequeiro realizada fora do período normal, de janeiro a abril, em sucessão a uma cultura de primavera-verão.

A elevação dos preços de milho em decorrência do deslocamento de parte da produção do cereal nos Estados Unidos para a obtenção do etanol, provocaram aumento inusitado na semeadura de milho safrinha no Brasil na safra 2007/08, dada a expectativa de crescimento das exportações. Em 2008, a área e a produção de milho safrinha no Paraná atingiram, respectivamente, 1,4 milhões de ha e 5,1 milhões de toneladas, o que representa aumentos de 48% e 50% em relação à safra do ano precedente. De acordo com o 10º levantamento de avaliação da safra 2008/09, da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), realizado em julho de 2009, a área plantada se manteve, mas o clima ruim somado à queda de produtividade e aos baixos preços no mercado, entretanto, levaram a safrinha de milho a cair 13,4% em relação ao ciclo passado.

O plantio direto e a cultura de milho safrinha são fatores que proporcionam alterações no microclima e na biologia do agroecossistema, com reflexos nas populações dos agentes causais das doenças dessa cultura. Isso acontece porque essas práticas propiciam o aumento da quantidade de restos culturais sobre a superfície do solo que beneficia a sobrevivência de muitos fitopatógenos, fazendo com que doenças antigas ressurgam com maior intensidade e novas doenças se manifestem.

As estratégias de controle baseiam-se na aplicação de fungicidas na época de floração do milho, no entanto, além de ser economicamente inviável, a taxa de eficiência no controle é muito baixa, sendo o uso de cultivares tolerantes ao fitopatógeno e a rotação de culturas as alternativas de controle mais viáveis.

A caracterização de cultivares de milho com resistência à *G. zae* é dependente da metodologia empregada na seleção dos genótipos. Sendo assim, trabalhos visando o desenvolvimento de métodos de inoculação eficientes na diferenciação de genótipos de milho com resistência à *G. zae* são de fundamental importância dentro de programas de melhoramento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O requerimento perante água divide os fungos presentes nos grãos em dois grupos ecológicos, denominados de fungos de campo e armazenagem. Os grupos de fungos de campo invadem os grãos no estágio de pré-colheita, ou nas espigas pós-colheita antes de debulhamento. Este grupo requer alto teor de umidade (20-21%) e inclui os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Os grupos de fungos de armazenagem requerem teor de umidade na faixa de 16% para a invasão micelial e compreendem as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*. O fungo *Gibberella zeae* (Schwabe) Petch., cuja forma assexuada é *Fusarium graminearum* (Schwabe) é um requer alto teor de umidade e tem sido observado como o principal agente etiológico da doença denominada giberela (SANGOI et al, 2000). No caso de milho *G. zeae* causa a doença podridão-de-Gibberella ou podridão-vermelha-da-espiga..

O fungo *G. zeae* caracterizado pelo seu crescimento rápido, colônias com coloração pálida ou colorida (violeta à púrpura escuro ou do creme à laranja), com micélio aéreo e difuso. As duas principais formas de esporos são assexuais (microconídios e macroconídios) e esporos sexuais (ascósporos). Os macroconídios e microconídios são liberados e dispersos pela ação da chuva e do vento, podendo chegar até o dossel da cultura a ser parasitado. Os microconídios são unicelulares e uninucleados e os macroconídios multicelulares, mas cada célula tem somente um núcleo. Todos os núcleos de um macroconídio, contudo, são descendentes mitóticos de um mesmo núcleo progenitor e são, portanto geneticamente idênticos. Os ascósporos, formados dentro dos peritécios, sob condições de molhamento, são liberados para acima do dossel da cultura (DEL PONTE et al., 2004). Os ascósporos, por serem mais leves que os macroconídios, podem ser elevados por turbulência atmosférica e dispersados para longas distâncias da fonte de origem por meio de correntes de vento. Esse estado perfeito de *Gibberella* forma ascósporos multicelulares. Uma cultura de *Gibberella* recém isolada da natureza deve-se manter inalterada por repetidas subculturas em ágar, podendo mudar sua morfologia gradualmente ou ainda produzir repentinamente setores de crescimento radicalmente diferente na aparência do parental. (GEISER et al., 2004).

A infecção do fungo ocorre em órgãos florais de vários cereais de inverno e epidemias severas têm sido observadas com frequência em todas as regiões do

mundo (REIS, 1988). De maneira geral os ascósporos são considerados o mais importante tipo de inóculo na infecção (PARRY et al., 1995). Entretanto, DEL PONTE et al. (2004) acreditam haver motivos para considerar os macroconídios com importância no processo de inoculação. Esses autores destacaram inclusive que algumas espécies de *Fusarium* spp., que também causam giberela em outras regiões além do Brasil, principalmente na Europa, não apresentam a fase perfeita, ou esta raramente ocorre, como é o caso de *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae*, produzindo somente macroconídios. A giberela é uma doença monocíclica. Em trabalhos de quantificação de ascósporos versus macroconídios, MARKELL e FRANCL (2003) e PANISSON et al. (2002), encontraram respectivamente relações de 2:1, 9,8:0,2 e 9:1. Em outro experimento semelhante, OSBORNE et al. (2002), determinaram proporções de ascósporos versus macroconídios que variaram de 7:1 até 1:4. Nesse mesmo experimento os esporos foram recuperados a partir de tecidos não suscetíveis, como folha e colmo de trigo, chegando a recuperar até 1500 esporos por folha.

Com relação a formação de peritécios de *G. zae*, DUFAULT et al. (2002), trabalhando com palha de milho em ambiente controlado, determinaram que o desenvolvimento dos peritécios pode ser limitado por longos períodos em que a palha permanece seca ou com temperaturas acima de 30 °C. Segundo REIS (1988), encontraram-se peritécios de *G. zae* sob condições naturais em tecidos senescidos ou mortos nas seguintes espécies vegetais: *Andropogon bicornis* L., *Avena strigosa* Schreb., *Botriochloa* sp., *Brachiaria plantaginea* (LK) Hitch, *Bromus catharticus* Vahl., *Cortadeira selloana*, *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *D. ciliaris* (Letz.) Koel., *Lolium multiflorum* Lam.; *Oryza sativa* L., *Panicum maximum* Jacq., *Paspalum dilatatum* Poir., *P. notatum* Fluegge, *P. urvillei* Steud., *Pennisetum clandestinum* Chiov., *P. purpureum* Schumach., *Sorghum halepense* (L.) Pers. e *S. vulgare* L..

De acordo com Leslie M. Reid (apud CASA et al., 1998, p. 375), a infecção natural geralmente começa pela ponta da espiga e progride em direção a base, favorecida pelo clima, mau empalhamento, danos causados por pássaros, insetos ou por meio da germinação dos esporos e penetração através dos estigmas até os grãos e o sabugo. Segundo MUNSTOCK e BREDEMEIER (2006) a infecção pode se espalhar para o restante da espiga e a colonização dos grãos pode continuar até após a maturação e a armazenagem, se as condições continuarem favoráveis. A presença da *G. zae* é caracterizada pelo micélio avermelhado sobre e entre os

grãos e que também as brácteas estão freqüentemente aderidas umas às outras devido ao desenvolvimento do fungo entre elas e formação de um micélio cotonoso de coloração rosada sobre os grãos (FERNANDES e OLIVEIRA, 1997; REIS, E.M et al, 2004; PINTO, N.F.J.A, 1998).

Por ser uma doença de infecção floral, a giberela pode ser devastadora quando a antese dos cereais ocorre em épocas onde as temperaturas são superiores a 20°C e a duração do molhamento das espigas for maior que 72 horas. De acordo com WHITE (1999), os sintomas da doença podem ser aumentados quando as plantas são expostas a condições de estresse. Por isso, as epidemias variam de ano para ano, dependendo sempre das condições climáticas para o seu estabelecimento e intensidade (McMULLEM et al., 1997). Ainda segundo MUNSTOCK e BREDEMEIER (2006) o fungo, aparentemente não penetra no interior do grão, ficando aderido ao pericarpo e à camada de aleurona.

Os danos causados são quantitativos, com a redução do rendimento (PARRY et al., 1995) e qualitativos pela diminuição do peso hectolítrico, do teor de proteínas, do poder germinativo, do vigor das sementes e principalmente pela presença de micotoxinas nos grãos (BAI e SHANER, 1994; O' DONNEL et al., 2000; LESLIE et al., 2005; PIKANÇO, M.C et al, 2004).

Os grãos ardidos ou infectados com *G. zea* constituem-se num dos principais problemas de qualidade do milho, ocasionando perdas qualitativas dos grãos pela desvalorização do produto. A literatura indica que o percentual de grãos ardidos pode limitar a exportação e o preço do produto, influenciando na sua classificação, dependendo de vários fatores como impureza, umidade e percentual de grãos ardidos. Relatos recentes sobre a incidência de fungos e as respectivas micotoxinas preocupam as autoridades, requerendo medidas de controle eficaz, deflagrado principalmente pelos países fornecedores de produtos agrícolas. Atualmente, o Brasil inseriu no quadro de exportadores, porém apresenta deficiência no sistema de monitoramento e controle de micotoxinas (CONAB)

As micotoxinas produzidas por *Gibberella* spp. são prejudiciais tanto à humanos, animais e plantas e o consumo em longo prazo pode ser carcinogênico e fatal. No entanto, existem poucos trabalhos que explicam o papel da micotoxina junto ao patógeno. CHULZE (2006) afirmou que o crescimento de fungos toxigênicos e a produção de toxinas são influenciados por diferentes fatores tais como temperatura, disponibilidade de água e produtos químicos. Neste mesmo trabalho foi

determinado que várias espécies de fungos toxigênicos, tais como isolados de *F. graminearum*, são geneticamente diversas, o que poderia ser um fator de variação adicional.

Segundo SCUSSEL (1998), as principais micotoxinas encontradas nos alimentos e que comprovadamente tem propriedades tóxicas acentuadas são: toxinas do Ergot, aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina, zearalenona, tricotecenos, fumonisinas, patulina, toxinas produzidas no arroz, rubratoxinas, esporodesminas, ácido ciclopiazônico e micotoxinas tremorgênicas. Entretanto os principais grupos de micotoxinas produzidas a partir de *Fusarium* spp. e comumente encontrados em grãos são os do grupo do tricotecenos (incluindo a deoxinivalenol, toxina T-2, diacetoxiscirpenol, fusarenona X e nivalenol), zearalenona e as fumonisinas (BOTTALICO, 1998). Segundo o mesmo autor, as micotoxinas encontradas mais frequentemente em cereais de inverno com espigas gibereladas na Europa são DON e ZEA, produzidas por *F. graminearum* (região sul onde é mais quente) e por *F. culmorum* (região norte onde é mais frio). Na mesma revisão foi relatado a presença das micotoxinas ZEA, DON, nivalenol e fusarenona X em milho com podridão vermelha da espiga causada por *F. graminearum*. Devido a importância relatada em diversos trabalhos revisados até o momento, as micotoxinas DON e ZEA serão mais destacadas na continuação desta revisão.

O DON é um composto do grupo dos tricotecenos e segundo MOLIN (1999), pode ser biosintetizado em ambientes com temperaturas constantes entre 12 e 28°C, com ótimo entre 25 e 28°C, em substratos com umidade entre 22 e 50% (ótimo 50%), não ocorrendo a produção dos mesmos em grãos com umidade entre 13 e 14%. EVANS et al. (2000) não conseguiram encontrar DON em macroconídios de *F. graminearum*, antes de utilizá-los para inocular espigas de cevada. Não obstante, esses mesmos isolados de macroconídios de *F. graminearum* foram patogênicos para as cultivares Robust (moderadamente suscetível) e Chevron (moderadamente tolerante) e produziram teores de DON entre zero a 3,69 $\mu\text{g g}^{-1}$, indicando que essa toxina só é produzida pelo fungo após inoculação na espiguetas hospedeira. Nesse mesmo trabalho, DON foi detectado nas espiguetas 48 horas após a inoculação e apresentou um incremento dramático 72 horas após inoculação não apresentando diminuição dos teores a partir daquele momento.

DON é também forte inibidor de síntese de proteína e induz a “morte programada de células” (sigla PCD programmed cell death em inglês) em células

animais (BUSHNELL e SEELAND, 2002). Esses autores acharam indícios que DON também induz PCD em tecidos foliares e deve ter o mesmo efeito nos tecidos das espigas contaminadas com giberela. REID et al. (1996) destacou que DON é mais provável de ser produzido no campo do que durante a armazenagem.

SCUSSEL (1998) relatou que os principais alimentos passíveis de contaminação por tricotecenos são o milho (onde o tricoteceno mais encontrado é o DON), cevada e outros cereais, além de feno, palha e ração animal. Segundo a mesma autora, os tricotecenos afetam os centros de produção do sangue, caracterizada por danos no sistema nervoso, no trato gastrointestinal e cardiovascular. Tricotecenos causam hemorragias ao redor e por dentro da boca, no reto, na mucosa do intestino delgado e estômago, seguindo-se de gastroenterite, bem como vômitos, recusa de alimentos com vômito principalmente em suínos, aborto em gado, diarréia, grande depressão, seguido de morte. A mesma autora destacou que bovinos e aves são menos sensíveis ao DON e aceitam milho com DON que tenha sido anteriormente rejeitado por suínos. Nas aves ocorre também formação de ovo com casca fina e diminuição da produção de ovos.

BOTTALICO (1998) e REID (1996) relataram que os tricotecenos causam uma variedade de efeitos tóxicos em animais de laboratório e domésticos, dentre esses efeitos destacam-se: inflamação de pele, desordens digestivas, hemorragias em órgãos internos, desordens nervosas diminuição do ganho de peso. Na Tabela 1 são apresentados os limites de tolerância para DON em diferentes produtos em diversos países. Observa-se que alguns países tem especificações de limites mais baixos de tolerância para DON em produtos destinados para suínos e para bebês, indicando que esses consumidores são mais sensíveis a essa toxina. Já o limite de 5 ppm para bovinos nos dá uma indicação que esta espécie é mais tolerante ao DON. Observa-se também que, infelizmente, não existe legislação brasileira para esta toxina. No Brasil existe legislação somente para aflatoxinas.

A ZEA, juntamente com os tricotecenos, são produzidos por diferentes espécies de *Fusarium* spp., dentre elas o *F. graminearum*. A estrutura química da ZEA é semelhante ao hormônio sexual feminino estrogênio e tem como alvo os órgãos reprodutivos. Milho, sorgo, trigo, cevada, malte de cevada, café cru, rações e outros cereais são os alimentos mais passíveis de contaminação por ZEA (SCUSSEL, 1998).

Tabela 1: Limites de tolerância para DON em diferentes produtos e diversos países.

| País | Produto | Limite | | Fonte |
|---------|--|----------------------------|-----|---|
| | | Unidade divulgação | ppm | |
| Canadá | Trigo mole | 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 2,0 | FAO (1997) |
| | Grãos de trigo para alimentos de bebê | 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ | 1,0 | |
| | Rações para o gado e aves | 5000 ppb | 5,0 | |
| | Rações para suínos, novilhas e animais em lactação | 1000 ppb | 1,0 | |
| EUA | Alimentos prontos de trigo | 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 1,0 | FAO (1997) |
| Áustria | Rações para suínos | 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 0,5 | www.lamic.efsm.br www.micotoxinas.com.br |
| | Rações para o gado corte, poedeiras e matrizes | 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 1,0 | |
| | Rações aves de corte | 1500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 1,5 | |
| Rússia | Café | 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 1,0 | www.lamic.ufsm.br www.micotoxinas.com.br |
| Brasil | Inexistente* | | | |

Unidades de conversão: $\mu\text{g kg}^{-1} = \text{ppb}$ e $\mu\text{g g}^{-1} = \text{ppm}$.

*Existe legislação somente para aflotoxinas.

Segundo SCUSSEL (1998), a temperatura ótima de desenvolvimento de *Fusarium* spp. é diferente da temperatura ótima para produção de ZEA. Os *Fusarium* spp. crescem na faixa de 0 e 40 °C, sendo que a temperatura ótima é entre 20 e 25 °C. Entretanto a ZEA é produzida a 12 °C e o tricoteceno T-2 a 8 °C, inferindo que *Fusarium* spp. produz essas toxinas sob efeito de um choque térmico. Já segundo MOLIN (1999) ZEA pode ser sintetizada em milho em ambiente com temperaturas constantes ou alternada e com alta umidade. O desenvolvimento de *F. graminearum* e a produção de ZEA em milho é possível a partir de 7 °C com 24% de umidade de substrato de grão de milho, 12 a 18 °C com 16 % de umidade e 25 °C com 14% de umidade, sendo que a umidade e as temperaturas ótimas são de 40% e 25 °C alternando com 14 °C. REID et al. (1996) destacaram que ZEA tem a tendência de ser acumulada em maior proporção nas espigas de milho armazenadas, do que a nível de campo.

Os animais mais suscetíveis a ZEA são suínos, gado leiteiro, carneiros, galinhas, perus, entre outros. Os sintomas de intoxicação mais característicos são inflamação do útero, mamas e vulva (causando o prolapso vaginal) em fêmeas púberes, atrofia testicular e inflamação de mamas em machos jovens, infertilidade de machos adultos e redução do tamanho da leitegada (SCUSSEL, 1998; REID,

1996). O conjunto desses sintomas é denominado hiper estrogenismo (SCUSSEL, 1998) ou síndrome estrogênica (REID, 1996).

Como ZEA e DON e outros tricotecenos são produzidos pelos mesmos fungos, misturas dessas toxinas podem ocorrer numa mesma amostra, ocasionando acúmulo de sintomas. Os limites de tolerância para ZEA em diferentes produtos em diversos países estão na Tabela 2. Alimentos para crianças na Itália apresentam os mais baixos limites de tolerância para ZEA (20 ppb) seguido de rações para suínos na Áustria, indicando que esses consumidores são os mais sensíveis a essa toxina. A exemplo dos limites para DON, ainda não existe legislação brasileira para ZEA.

GALLI et al. (2005) incubando espigas de milho híbrido com isolados de *F. graminearum*, determinaram que períodos de 32 horas de incubação foram suficientes para obter espigas com sementes infectadas. Embora as infecções não tenham causado efeito na germinação das sementes, ocorreu diminuição do vigor (envelhecimento acelerado e teste de germinação a frio) das mesmas, quando comparadas com sementes de espigas não incubadas. No mesmo trabalho foi possível medir a quantidade e a distribuição de DON. Os maiores teores de DON foram encontrados no sabugo, seguido pelos teores encontrados nos grãos com sintoma da doença. Também ocorreu correlação entre nível de DON e avaliação visual de severidade da doença. Como os sabugos e grãos de milho menores e infectados, aderidos ou não aos sabugos, saem durante a trilha, pode-se inferir que estes resíduos podem contribuir para o aumento de potencial de inóculo deste fungo.

Tabela 2: Limite de tolerância para ZEA em diferentes produtos em diversos países.

| País | Produto | Limite | | Fonte |
|---------|--------------------------|----------------------------|------|---|
| | | Unidade divulgação | ppb | |
| Uruguai | Milho e cevada | 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 200 | www.lamic.ufsm.br www.micotoxinas.com.br |
| Áustria | Rações para matrizes | 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 50 | www.lamic.ufsm.br |
| França | Cereais e óleos vegetais | 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 200 | www.lamic.ufsm.br www.micotoxinas.com.br |
| Itália | Alimentos para crianças | 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 20 | www.lamic.ufsm.br |
| | Cereais e produtos | 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 100 | www.micotoxinas.com.br |
| Rússia | Café | 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | 1000 | www.lamic.ufsm.br www.micotoxinas.com.br |
| Brasil | Inexistente* | | | |

Unidades de conversão: $\mu\text{g kg}^{-1} = \text{ppb}$ e $\mu\text{g g}^{-1} = \text{ppm}$.

*Existe legislação somente para aflotoxinas.

Em humanos a doença mais conhecida causada pela ingestão de micotoxinas é a aleuquia tóxica alimentar – ATA (WANNEMACHER e WIENER, 1997; SCUSSEL, 1998; BOTTALICO, 1998). Esta doença ocorreu na Rússia em 1913 e 1944 pelo consumo de grãos de milho, trigo e cevada contaminados e mais recentemente na China pelo consumo de arroz contaminado. Esta doença causa leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos), hemorragia da gengiva, nariz e garganta, agranulocitose (diminuição das granulações no citoplasma das células), apresentando alta mortalidade. SCUSSEL (1998) relatou que espécies de *Fusarium* spp., principalmente *F. sporotrichiella* var. *sporotrichoides* produzem as micotoxinas responsáveis por esta doença, dentre elas do grupo dos tricotecenos (toxina T- 2, HT e neosolaniol) e zearalenona. O consumo de trigo e cevada com a “doença do fungo vermelho”, onde *F. nivale* foi isolado a partir de grãos contaminados com nivalenol, DON e fusarenona-X causou intoxicações em humanos no Japão. Nesse sentido, Leslie et al. (2005) afirmam que no sul da África altos índices de câncer de esôfago em humanos foram atribuídos aos tipos e quantidades de toxinas de *Gibberella* ingeridos com a alimentação.

Um uso não convencional das micotoxinas, principalmente do grupo dos tricotecenos, é na confecção de armas biológicas. WANNEMACHER e WIENER (1997) fizeram um amplo relato a respeito deste tipo de uso. Uso real de armas químicas, confeccionadas a partir de micotoxinas do grupo dos tricotecenos, foi comprovado por meio de levantamentos epidemiológicos e de inteligência realizados no sudeste asiático e Afeganistão. No sudeste asiático, os ataques da chamada “Chuva amarela”, referente a coloração de poeira ou neblina formada, foram realizados com aviões e helicópteros, na forma de pulverização, bombas e foguetes ar-terra. Níveis elevados de uma mistura naturalmente rara de tricotecenos foram recuperadas a partir de superfície de plantas, de fragmentos de plásticos e de pedras localizadas nas áreas atacadas, bem como foram detectadas no sangue de sobreviventes e em tecidos dos mortos.

Os sintomas em humanos incluem vômitos, dor, fraqueza, tontura, ataxia, anorexia, diarreia, sangramento, avermelhamento da pele, formação de bolhas na pele, irritação da pele e olhos, gangrena, bem como morte dentro de minutos ou horas. Na Tabela 4 são apresentadas micotoxinas dos tricotecenos que são tóxicas aos humanos, inclusive a DON, com respectiva toxicidade aguda para diferentes mamíferos testados. Por meio de fermentação de substrato sólido, pode-se obter

aproximadamente 9 g da toxina T-2 por quilo de substrato, rendendo 2 a 3 g de produto cristalino. A única maneira de se proteger contra ataques é com o uso de máscara e roupa de proteção que evita contato com essa micotoxina. Ataques que foram letais ocorreram contra soldados e população civil que não estavam usando proteção (WANNEMACHER e WIENER,1997).

Tabela 3: Toxicidade parenteral aguda relativa, em dose letal a 50 % da população exposta - LD₅₀, dos tricotecenos mais freqüentes

| Tricotecenos | Mamíferos testados | | | |
|---|--------------------|----------|-----------|-----------|
| | Camundongo | Rato | Coelho | Suíno |
| LD ₅₀ (mg kg ⁻¹) | | | | |
| Toxina T-2 | 5,2 (IV)* | 0,9 (IV) | 1,0 (IM) | 1,2 (IV) |
| Toxina HT-2 | 9,0 (IP) | - | - | - |
| Diacetoxiscirpenol | 12,0 (IV) | 1,3 (IV) | 1,0 (IV) | 0,38 (IV) |
| Nivalenol | 6,3 (IV) | - | - | - |
| DON | 43 (SC) | - | - | - |
| Verrucarina A | 1,5 (IV) | 0,8 (IV) | 0,54 (IV) | - |
| Roridina A | 1,0 (IV) | - | - | - |
| Satratoxina H | 1,0 (IP) | - | - | - |

* Rotas de administração das micotoxinas: IV=intravenoso; IM=intramuscular; SC=subcutâneo; IP=intraperitoneal.

Fonte: WANNEMACHER e WIENER (1997).

ZEA isoladamente também causa efeitos em humanos, alterando a idade em que as crianças atingem a puberdade. BOTTALICO (1998) relatou casos ocorridos na Hungria onde ZEA foi encontrado em alimentos a base de grãos e no sangue de jovens consumidoras com desenvolvimento precoce de seios. Contudo, a *G. zeae* também é fermentada e então comercializada como um estimulante do crescimento dos bovinos e como microproteína suplementar ao alimento para consumo humano sob a marca comercial Quorn (BOWDEN e LESLIE, 1999), porém, a identificação da microproteína do fungo foi questionada (O' DONNELL et al., 1998).

O milho cultivado no estado do Paraná está sujeito a uma grande variabilidade de condições climáticas, o que possibilita o desenvolvimento de *Gibberella* spp. Na safra 2008/2009 observou-se grande incidência e severidade de podridão das espigas em diferentes localidades, causando grandes prejuízos aos produtores de milho e, conseqüentemente, a toda a cadeia produtiva da avicultura, suinocultura e de outros animais devido ao aumento de micotoxinas nos grãos. No milho safrinha o aumento da incidência da doença pode ser atribuído a época de plantio não definida, acompanhada de fatores como as constantes sucessões

soja/milho, ao contrário das rotações, estresses climáticos e a escolha inadequada dos híbridos. O plantio de safrinha expõe a cultura do milho a condições climáticas distintas daquelas que predominam na safra normal e o deslocamento da cultura para novas regiões contribuem para agravar a incidência e a severidade da doença nessa cultura (FERNANDES e OLIVEIRA, 1997; TSUNECHIRO A., GODOY, R.C.B; 2001). O agente causal, por ser um patógeno que possui habilidade de competição saprofítica, formando peritécios em diferentes substratos senescidos, provavelmente tenha aumentado inóculo em relação à época anterior ao uso generalizado do plantio direto (REIS, 1988; PANISSON et al., 2002).

A prática agrícola da semeadura direta, ou “plantio direto”, tem efeito sobre a sobrevivência, multiplicação e infecção dos fitopatógenos necrotróficos ou que possuem habilidade de competição saprofítica, como é o caso de *Gibberela zeae*. Por isso, em geral, as doenças são mais severas sob o plantio direto do que quando os restos culturais são parcial ou totalmente incorporados ao solo. Deve ser lembrado que, sob plantio direto, a totalidade dos restos culturais são deixados na superfície do solo. É tão grande a dependência de muitos fitopatógenos pela planta cultivada que, na natureza, eles procuram não se separar do hospedeiro. Hospedeiro, neste caso, pode ser a planta viva cultivada, a planta voluntária ou hospedeiros secundários, como milhã [*Digitaria sanguinalis* L. (Scop.)], papuã [*Brachiaria plantaginea* L. (Hitche)], capim-arroz (*Echinochloa* sp.) e paspalo (*Paspalum* sp.) (DENTI, 2000), por longo tempo em sementes de milho, arroz, trigo, cevada, aveia, centeio e outras gramíneas ou resto da cultura.

Por isso, a presença dos restos de cultura na lavoura significa, quase sempre, a presença de fitopatógenos necrotróficos ou com habilidade de competição saprofítica (FERNANDES e OLIVEIRA, 1997). Podemos, então, concluir que o plantio direto possibilita as condições ideais para a sobrevivência, multiplicação e infecção dos fitopatógenos. Devemos acrescentar ainda, que as populações dos fitopatógenos aumentam ou diminuem em função da disponibilidade alimentar e da favorabilidade do ambiente (CASA et al, 2006). Sob o plantio direto, é a máxima a disponibilidade de substrato e, em decorrência, a densidade de inóculo. Os patógenos necrotróficos e com habilidades de competição saprofíticas desprovidos de estruturas de resistência sobrevivem mais seguramente sob plantio direto do que sob plantio convencional.

Os prejuízos ocasionados pela *Gibberella* em milho podem ser também constatados na diminuição de população de lavouras instaladas com sementes infectadas e a palha, sabugo e grãos descartados na colheita tem potencial para aumentar o inóculo do *G. zeae* na região. A rotação de culturas, a prática mais antiga no controle de doenças, continua sendo a mais eficiente entre os métodos culturais de controle, de acordo com DENTI e REIS (2001). Segundo MUNKVOLD (2003), o maior potencial de possibilidades para resolver a questão de micotoxinas em milho, direta ou indiretamente, reside na resistência genética.

Fontes de resistência genética convencional para fungos toxigênicos já existem. Entretanto essas fontes de resistência não tem sido utilizadas com mais frequência devido a sua natureza poligênica e baixa performance agrônômica. Ferramentas de melhoramento genético molecular, como mapeamento genético e seleção assistida com marcadores moleculares, já estão auxiliando melhoristas a utilizar fontes de resistência convencional, mas os híbridos obtidos ainda não têm níveis de resistência adequados. Estratégias para obtenção de milhos híbridos com resistência transgênica contra a acumulação de micotoxinas nos grãos têm sido intensivamente estudadas, mas os resultados demorarão para aparecer. Resistência genética indireta contra a produção de micotoxinas foi obtida por meio de híbridos transgênicos Bt devido a associação entre o dano de inseto, penetração do fungo e acumulação de micotoxinas. Infelizmente a estratégia do Bt não tem sido suficiente para constituir uma solução de longo prazo, pois os inóculos de *Fusarium* spp. podem entrar nos grãos de milho de outras formas, além dos danos dos insetos (MUNKVOLD, 2003).

O princípio de controle envolvido na rotação de culturas é a supressão ou eliminação do substrato apropriado para o patógeno. A ausência da planta cultivada anual (inclusive as planta voluntárias e os restos culturais) leva à erradicação total ou parcial dos patógenos que dela são nutricionalmente dependentes. A eliminação dos resíduos culturais, durante a rotação de culturas, é devida à sua decomposição pelos microrganismos do solo. Durante o processo de decomposição, os fitopatógenos associados aos resíduos são destruídos pela microbiota. Sob este ponto de vista, a rotação de culturas constitui-se, também, numa medida de controle biológico (DENTI e REIS, 2001; SILVA et al, 2001).

A maioria, senão a totalidade dos fitopatógenos, provavelmente, morreria de inanição ou de velhice, independentemente de qualquer fator biológico caso não

tivessem acesso ao hospedeiro ou a outro substrato adequado. Conclui-se deste fato que, durante a rotação de culturas, os fitopatógenos são eliminados parcial ou completamente, enquanto que, sob monocultura, eles são estimulados e mantidos numa concentração de inóculo suficiente para a continuidade de seu ciclo biológico, podendo causar, eventualmente, severas epidemias. Dessa forma, a estratégia de controle economicamente viável no milho, baseia-se na rotação de culturas e no uso de cultivares tolerantes (CASA et al., 2004). CHU et al. (2002) afirmam que existe o *RNA double-stranded mycovirus* de *G. zea* que está relacionado com a baixa virulência, sendo até proposto como agente de controle biológico. No entanto, a giberela pode ser considerada como uma doença de difícil controle e de difícil quantificação, o que dificulta à caracterização de genótipos de milho quanto à resposta a infecção deste patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de Isolados de *Gibberella zeae*

Os isolados de *G. zeae* foram obtidos de espigas de milho com sintomas de podridão, e apresentando massa cotonosa avermelhada no ápice, provenientes de regiões produtoras de milho do estado do Paraná. O isolamento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade do Oeste do Paraná, utilizando meio BDA (20% de batata, 2% de dextrose e 2% de ágar em água). Grãos contendo micélio de giberela foram desinfestados com hipoclorito de sódio (3:1), álcool 70% e transferidos para placas de petri contendo meio de cultura BDA e incubados a 25 °C. Após 48 horas, as colônias foram repicadas e purificadas, sendo transferidas para outras placas contendo meio BDA.

3.1.1 Obtenção de isolados monospóricos

A partir das colônias puras de *G. zeae* cultivadas em meio de cultura BDA foi preparada suspensões de esporos a concentração de 10^4 esporos mL^{-1} , que foi inoculada em meio ágar-água por um período de 24 horas de incubação. Esporos germinados isoladamente foram transferidos com o auxílio de microscópios óticos para placas contendo meio BDA e incubados a temperatura de 25 °C por sete dias no escuro.

3.2 Caracterização Morfológica

Os isolados de *Gibberella zeae* foram identificados ao nível de espécie com base em caracteres morfológicos e morfométricos.

3.3 Análise do Crescimento Micelial em Meio de Cultura Sólido

Para o estudo das características fisiológicas, foram separados dois isolados, um coletado em lavouras contaminadas na cidade de Candói – PR (Isolado 01) e

outro em Toledo (Isolado 02). Discos de micélio e meio de cultura (<5.0 mm de diâmetro), oriundos das colônias jovens de culturas monospóricas desses isolados, foram transferidos para o centro da placa de Petri, contendo meio BDA, as quais foram incubadas em estufa do tipo *Biochemistry Oxygen Demand* (B.O.D) em temperatura de 25 °C e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 h. Foi observado o crescimento do micélio, medindo-se o diâmetro da colônia em intervalos de 24 horas, com auxílio de uma régua milimetrada, tomando-se duas medições, em sentidos diametralmente opostos. Em seguida, foi estabelecida a média de crescimento linear para cada placa. Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991):

$$IVCM = \Sigma (D - D_a) / N$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

D_a= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação.

As leituras foram iniciadas 24 horas após a instalação do experimento, estendendo-se até a colonização de toda a superfície do meio de cultura, o que correspondeu a seis dias de incubação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dez repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. As médias dos dados obtidos foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 Compatibilidade Vegetativa entre os Isolados de *G. zeae*

A compatibilidade vegetativa entre os isolado 01 e isolado 02 foi avaliada em placas de Petri. Um disco (<5.0 mm) de cada isolado foi transferido para placas contendo BDA e pareados em posições opostas e equidistantes um do outro. A incubação (B.O.D) foi feita à temperatura de 25 °C, em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas quatro repetições de cada tratamento. As placas foram incubadas e durante seis dias foram avaliadas macroscopicamente

observando-se a presença ou não de antagonismo (zona de aversão) na região de contato micelial.

3.5 Métodos de Inoculação a Campo

O desenvolvimento do experimento foi em Toledo - Paraná no ano agrícola de 2008 (em época de safrinha), em uma área pertencente a estação experimental da Du Pont do Brasil S/A - Divisão Pioneer Sementes que possui a seguinte localização geográfica: latitude 24,78°, longitude 53,71° e altitude de 516 metros, situada na estrada para Novo Sobradinho, s/nº. O solo é de textura argilosa, originado do basalto, denominado de Latossolo Vermelho (EMBRAPA, 1999). A semeadura foi realizada com plantadeira manual, distribuindo-se as sementes a uma profundidade média de 6 cm. Vinte e dois dias após a semeadura realizou-se um desbaste, de tal forma que as plantas remanescentes ficaram espaçadas entre si de 20 cm. A adubação de base, a nitrogenada em cobertura e os tratos culturais foram feitos de acordo com as recomendações técnicas para a cultura do milho do departamento de Pesquisa Milho da Dupont do Brasil Du Pont do Brasil S/A - Divisão Pioneer Sementes.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com cinco repetições, em esquema fatorial tendo como primeiro fator os híbridos (2B710; 30F45; DKB 214; 30F98; DKB 390; AG 9020; 30F80; 30R50 e 30K73) e como segundo fator os métodos de inoculação (Figura 1). Dentre os híbridos citados, 4 foram considerados parâmetro de suscetibilidade (2B710; 30F45; DKB 214; 30K73), 4 tolerantes (DKB 390; AG 9020; 30F80; 30R50) e 1 híbrido moderadamente suscetível a giberela (30F98). Os métodos consistiram em inocular uma suspensão de esporos tentando simular a infecção natural do fungo pelo estigma ou por danos causados por insetos nas laterais das espigas, variando ainda a ausência de cobertura (câmara úmida), cobertura por 24 e 48 horas.

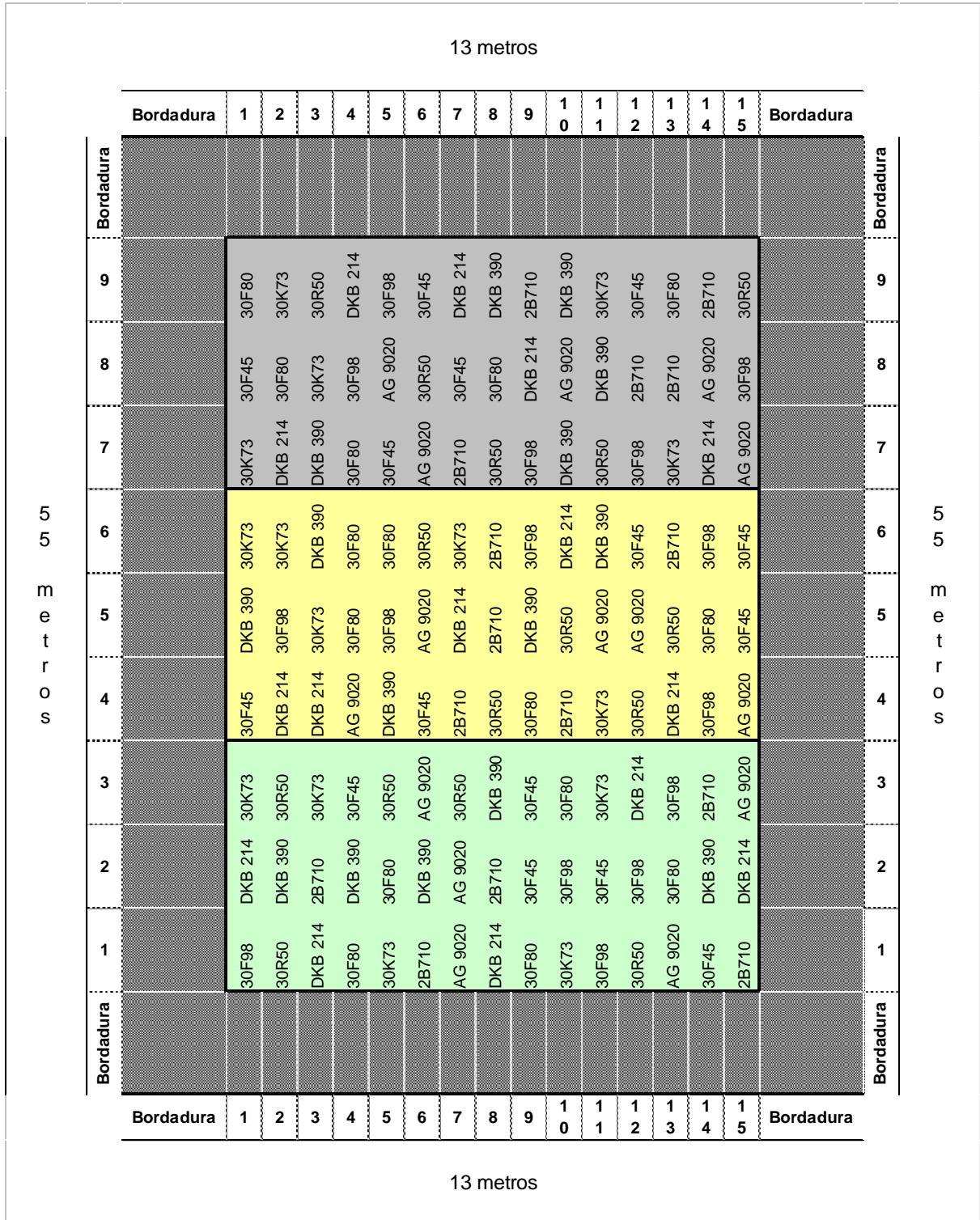


Figura 1: Croqui da área do experimento desenvolvido na estação experimental da Pioneer Sementes em Toledo no ano agrícola de 2008 – Safrinha.

No período da floração feminina foram realizadas as inoculações com o auxílio de seringas dosadoras com alimentação automática, injetando 2 ou 4 mL dependendo do método, de suspensão de esporos na espiga com concentração de $2,5 \times 10^5$ esporos mL^{-1} . Os métodos foram: 1) 2 mL no estigma após a antese sem cobertura da espiga; 2) 4 mL no estigma, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma sem cobertura da espiga; 3) 2 mL na lateral após a antese sem cobertura da espiga; 4) 4 mL na lateral, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma sem cobertura da espiga; 5) 2 mL no estigma após a antese com cobertura da espiga por 24 horas; 6) 4 mL no estigma, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma com cobertura da espiga por 24 horas; 7) 2 mL na lateral após a antese com cobertura da espiga por 24 horas; 8) 4 mL na lateral, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma com cobertura da espiga por 24 horas; 9) 2 mL no estigma após a antese com cobertura da espiga por 48 horas; 10) 4 mL no estigma, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma com cobertura da espiga por 48 horas; 11) 2 mL na lateral após a antese com cobertura da espiga por 48 horas; 12) 4 mL na lateral, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma com cobertura da espiga por 48 horas.

Ao início do florescimento do milho, a área experimental foi submetida a molhamento de espigas com formação de neblina por 5 min consecutivos, a intervalos de 25 a 30 minutos, em dias sem precipitação pluvial. A presença de água livre nas espigas (condição essencial para a ocorrência da doença) é obtida através de sistema de aspersão constituído de: reservatório de água com capacidade de 10000 litros, motobomba com potência de 50 cv, canos de 50 mm de diâmetro. O sistema de aspersão é instalado na superfície do solo. Ao cano de 100 mm, usado para distribuição de água, é conectada a cada 4 metros, uma haste de aspersão.

3.6 Análise dos dados

Realizou-se a avaliação das espigas inoculadas quando elas estavam no estádio (11) de maturação fisiológica (NEL e SMIT, 1978) adaptada por FANCELLI et al. (1996), estando os grãos com umidade média de 19%. A severidade média foi estimada através da escala diagramática utilizada pelo departamento técnico da

empresa Du Pont do Brasil S/A – Divisão Pioneer Sementes e adaptada para este trabalho. Essa escala estabelece índices de 1 a 7, sendo que: 7= ausência de sintomas da doença; 6= 1-10% de grãos afetados; 5= 11-20% de grãos afetados; 4=21-30% de grãos afetados; 3= 31-40% de grãos afetados; 2= 41-50% de grãos afetados; 1= 51% ou mais de grãos afetados por espiga (Figura 2). Os resultados da incidência de grãos ardidos nos dois sistemas de cultivo foram submetidos à análise de variância. Os resultados das médias foram comparados teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA AVALIAÇÃO DE GIBERELA

| Porcentagem de Grãos Afetados | Notas |
|-------------------------------|-------|
| Não infectado | 7 |
| 1 - 10% | 6 |
| 11 - 20% | 5 |
| 21 - 30% | 4 |
| 31 - 40% | 3 |
| 41 - 50% | 2 |
| Acima de 51% | 1 |

Figura 2: Escala diagramática utilizada para avaliação de resistência em híbridos de milho à *Gibberella zeae*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi possível isolar espécies diferentes de *Gibberella zeae* onde foram coletadas as espigas de variedades de milho afetadas em condições de campo no estado do Paraná como se esperava. Entretanto, pelos experimentos realizados no presente trabalho, cujos resultados seguem abaixo, não foi possível identificar essas diferenças. Logo, não foi possível observar se a patogenicidade estava diretamente relacionada com as diferentes condições ambientais e estresse fisiológico.

4.1 Crescimento Micelial em Meio Sólido

Pela análise de variância no experimento para o crescimento micelial em meio de cultura BDA não se detectou diferença significativa entre os isolados para as variáveis índice de velocidade de crescimento micelial de 0 a 3 dias (IVCM03), índice de velocidade de crescimento micelial de 3 a 6 dias (IVCM36), índice de velocidade de crescimento micelial de 0 a 6 dias (IVCM06) e área final (AF), com coeficientes de variação (CV%) de 11,31%; 10,10%; 7,79% e 8,38%, respectivamente (Tabela 4). Esses resultados indicam que os isolados testados apresentam comportamento semelhante para as condições experimentais empregadas. Também pode ser um indicador de qualidade experimental, comprovando que os dados do presente experimento são confiáveis.

Tabela 4: Resumo da análise de variância para Índice de Velocidade do Crescimento Micelial (IVCM) de dois isolados de *Gibberella zeae* em meio BDA a temperatura de 25 °C.

| Fonte de variação | GL | Quadrados Médios | | | |
|-------------------|----|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | | IVCM03 | IVCM36 | IVCM06 | AF |
| Isolado | 1 | 0,501 ^{ns} | 4,125 ^{ns} | 0,333 ^{ns} | 30,012 ^{ns} |
| Resíduo | 18 | 5,525 | 1,800 | 5,164 | 11,868 |
| Média | - | 20,774* | 13,284* | 29,159* | 41,075* |
| CV % | - | 11,314 | 10,100 | 7,793 | 8,387 |

^{ns} Não significativo pela análise de variância

* Média do IVCM em milímetros.

Embora não tenha sido detectada variação entre os isolados pela análise de variância, o valor médio do índice de velocidade de crescimento para o isolado 01 foi superior (1,373 cm), em relação ao isolado 02 (1,283 cm), no período de 3 a 6 dias de incubação. Outros autores que estudaram o crescimento micelial de isolados de *Gibberella* spp afirmam que o crescimento *in vitro* é substancialmente maior quando cultivado em escuro contínuo (TEIXEIRA et al., 2001; DEVI e SINGH, 1994). Nesse sentido, as condições de luz utilizadas neste trabalho (12 horas de fotoperíodo) diferem dos trabalhos mencionados, podendo ter efeito no resultado final do crescimento dos isolados.

4.2 Compatibilidade Vegetativa dos Isolados

Os resultados referentes à compatibilidade vegetativa mostraram que as hifas do isolado 01 e do isolado 02 formaram anastomose, ou seja, houve superposição de uma colônia sobre a outra. Isto indica que esses isolados podem ser agrupados em um mesmo GCV (grupo compatível vegetativamente). Alguns autores consideram que, nesse caso, há similaridade genética entre os isolados e uma provável origem geográfica comum, tendo também, diferentes atributos biológicos, fisiológicos e patogênicos (KATAN et al., 1991; HARLTON et al. 1995). Quando pareados os dois isolados, não ocorreu uma zona de aversão entre os mesmos, indicando compatibilidade e, provavelmente similaridade genética.

4.3 Métodos de Inoculação a Campo

O ano agrícola de 2008, período safrinha apresentou uma distribuição pluviométrica elevada na região Oeste do Paraná, principalmente durante o período reprodutivo da cultura. Nesse sentido, foi registrada na estação experimental da Pioneer Sementes nos meses de março a agosto uma precipitação total de 716 mm (Figura 3). Essas precipitações pluviais não foram distribuídas uniformemente e durante a antese (início em 13/05) ocorreram períodos de secas superiores a 20 dias, como pode ser constatado nas Figuras 4 e 5. Geralmente as prodrições de espigas têm seu potencial aumentado quando após a antese acontece períodos de

chuvas superiores a 72 horas com temperaturas médias acima de 20 °C (McMULLEM et al., 1997).

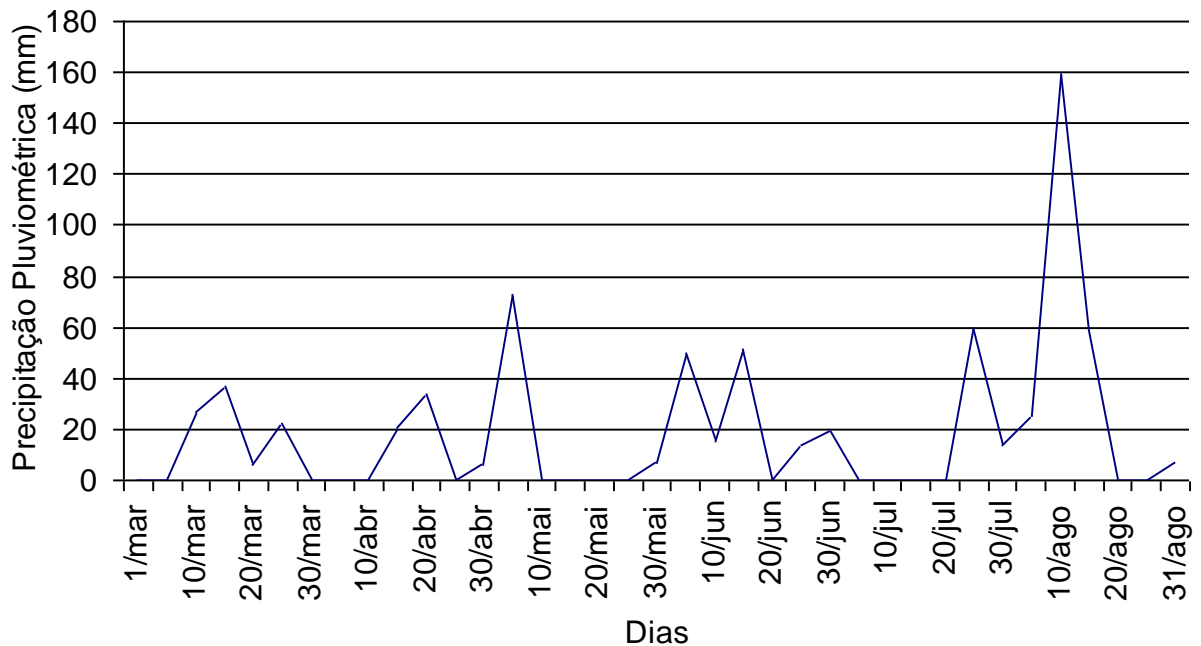


Figura 3: Distribuição pluviométrica diárias da Estação Experimental da Pioneer Sementes em Toledo no período de Março a Agosto de 2008.

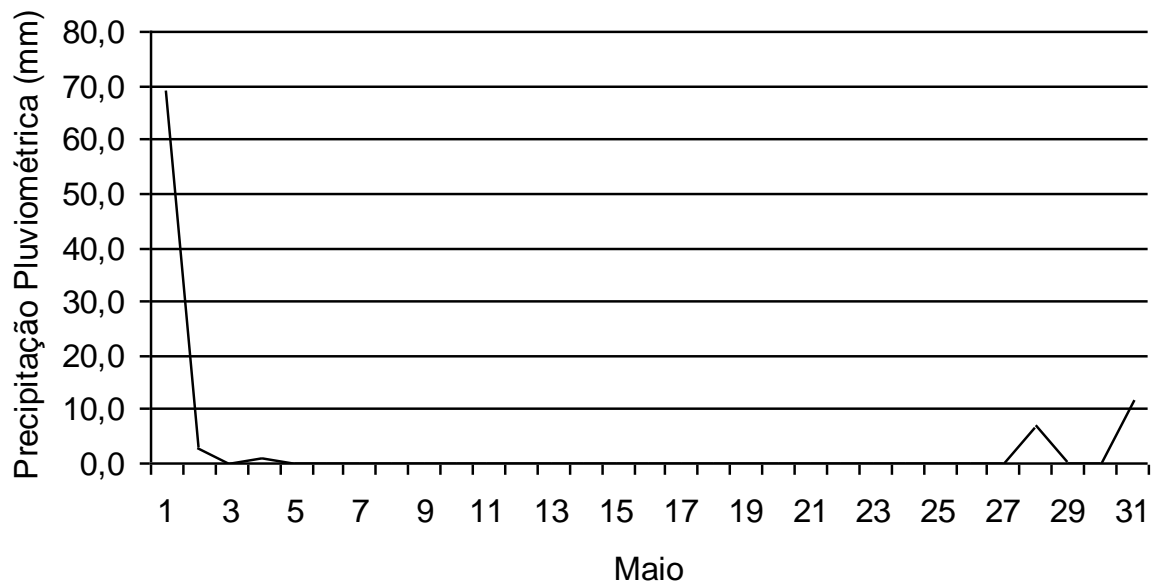


Figura 4: Distribuição pluviométrica diárias da Estação Experimental da Pioneer Sementes em Toledo para o mês de Maio de 2008.

A germinação dos esporos de *Gibberella* spp é influenciada pela atividade de água, temperatura e pH (MARÍN; SANCHIS; MAGAN, 1995; MARÍN et al., 1996).

Pesquisas estabeleceram a temperatura ótima para o crescimento do fungo entre 22,5 e 27,5°C. Nesse sentido, também foram registradas as temperaturas máximas e mínimas diárias na área experimental (Figura 6). As temperaturas variaram de 0 (16 de junho) a 35 °C (7 de março), sendo que as médias mais altas foram registradas logo após a implantação da cultura, durante as inoculações e no final, próximo as avaliações e colheita (Figura 7 e 8).

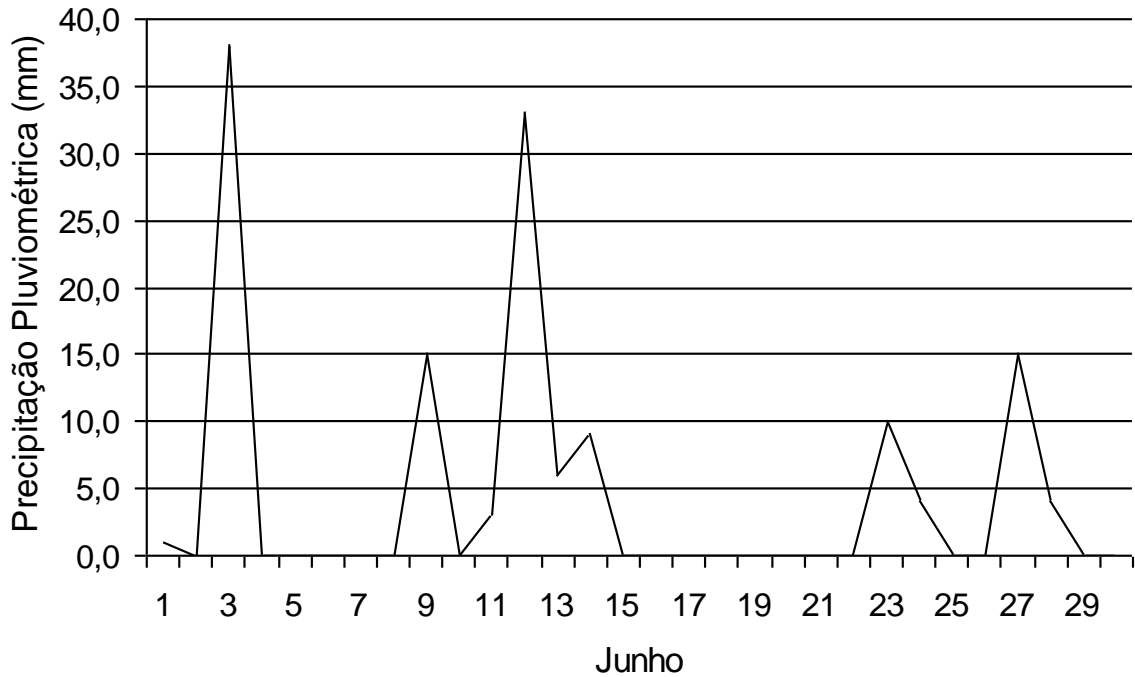


Figura 5: Distribuição pluviométrica diárias da Estação Experimental da Pioneer Sementes em Toledo para o mês de Junho de 2008.

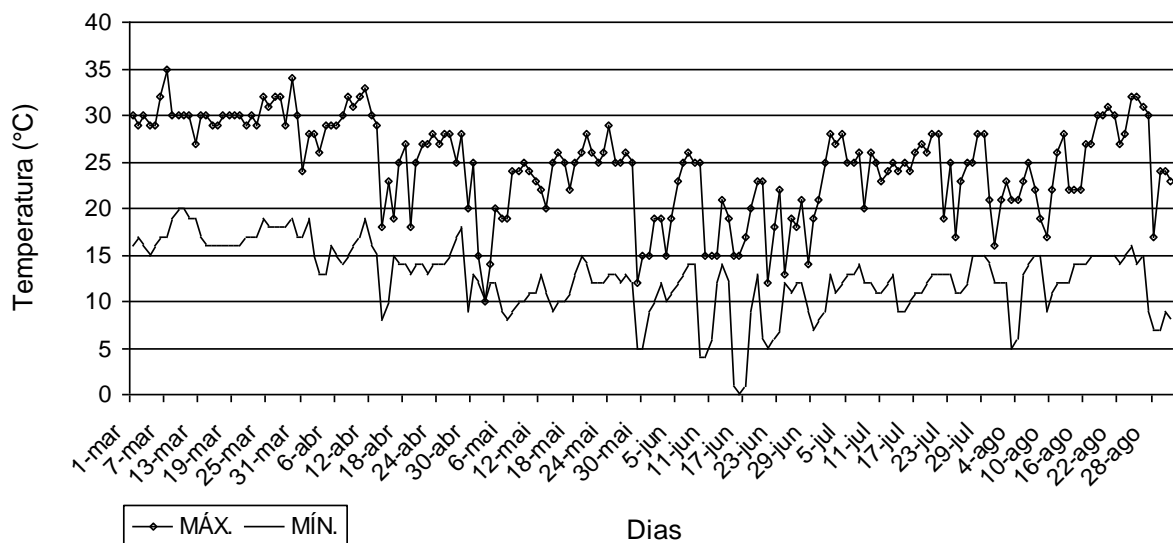


Figura 6: Distribuição das temperaturas máximas e mínimas diárias da Estação Experimental da Pioneer Sementes em Toledo para o período de Março a Agosto de 2008.

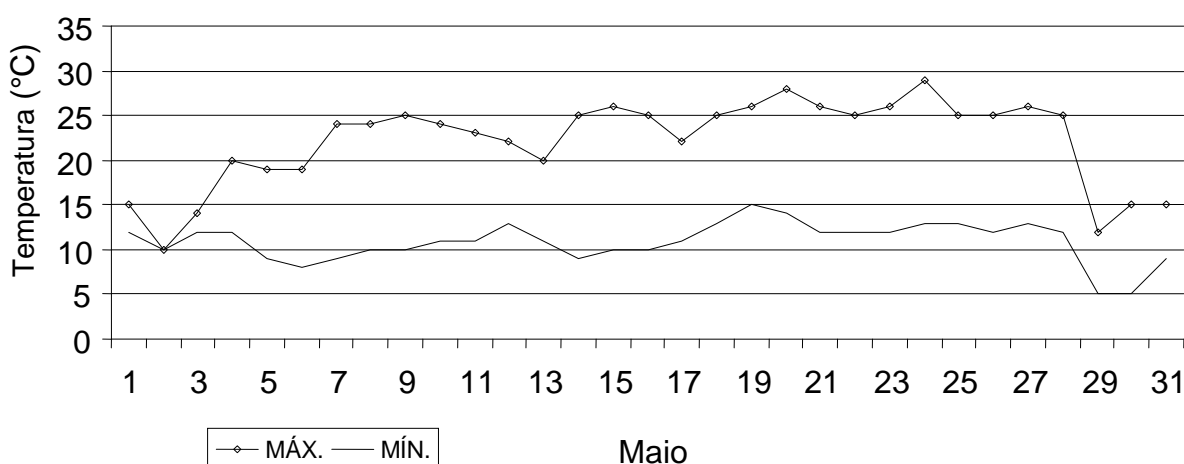


Figura 7: Distribuição das temperaturas máximas e mínimas diárias da Estação Experimental da Pioneer Sementes em Toledo para o mês de Maio de 2008.

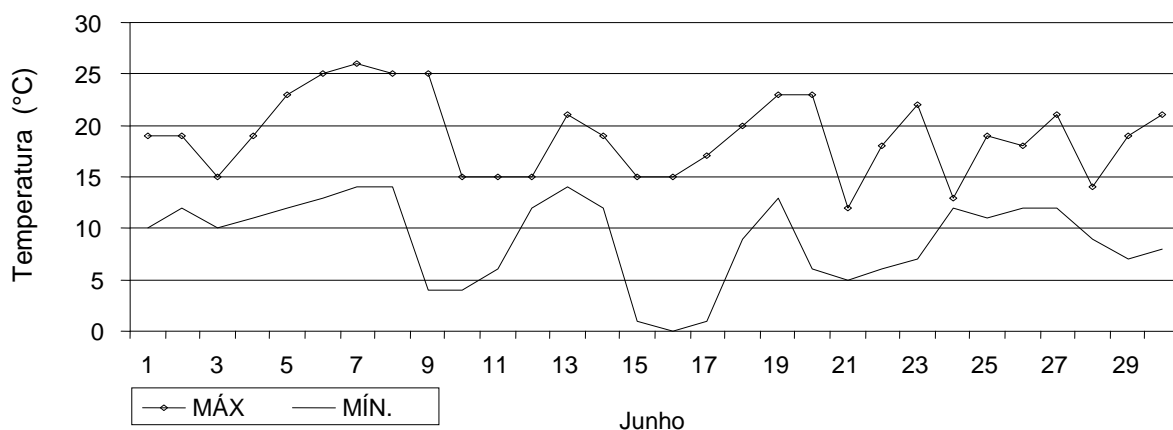


Figura 8: Distribuição das temperaturas máximas e mínimas diárias da Estação Experimental da Pioneer Sementes em Toledo para o mês de Junho de 2008.

Nos períodos sem precipitações a área experimental foi irrigada com sistema de aspersão que formava uma neblina sobre as espigas dos híbridos inoculados. No entanto, nas semanas em que se realizou as inoculações as temperaturas médias foram elevadas, aumentando a dificuldade de manter o ambiente úmido e propício para a infecção e colonização do patógeno. Pode se atribuir as condições meteorológicas relatadas acima o fato de não haver diferenças significativas para os métodos na maioria dos híbridos avaliados quando comparados pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 5). O que não foi constatado para o híbrido AG 9020, para o qual, os métodos 4, 8 e 12 apresentaram maior severidade média. Em experimentos preliminares (dados não publicados) foi possível fixar a concentração de esporos na suspensão em $2,5 \times 10^5$ esporos mL^{-1} , concentração essa que se mostrou viável para diferenciar a eficiência dos métodos.

Tabela 5: Quadro de médias das notas com agrupamento atribuídas para severidade da doença causada por *Giberella zeae* em milho.

| Métodos | 30F98 | | DKB 390 | | AG 9020 | | 30F80 | | 30R50 | | 2B710 | | 30F45 | | DKB 214 | | 30K73 | |
|----------------|--------------|----|----------------|----|----------------|----|--------------|----|--------------|----|--------------|----|--------------|----|----------------|----|--------------|----|
| 1 | 4.3 | Aa | 4.9 | Aa | 5.3 | Aa | 4.2 | Aa | 4.1 | Aa | 4.9 | Aa | 4.2 | Aa | 5.2 | Aa | 4.3 | Aa |
| 2 | 3.9 | Aa | 4.5 | Aa | 6.1 | Aa | 4.2 | Aa | 3.9 | Aa | 4.9 | Aa | 4.7 | Aa | 3.7 | Aa | 4.2 | Aa |
| 3 | 4.7 | Aa | 4.7 | Aa | 5.3 | Aa | 5.1 | Aa | 4.5 | Aa | 2.5 | Ab | 5.5 | Aa | 2.3 | Ab | 3.0 | Ab |
| 4 | 5.9 | Aa | 4.7 | Aa | 3.9 | Bb | 3.9 | Ab | 3.9 | Ab | 3.5 | Ab | 5.4 | Aa | 2.4 | Ab | 3.9 | Ab |
| 5 | 4.5 | Aa | 3.8 | Aa | 5.9 | Aa | 4.3 | Aa | 5.0 | Aa | 3.7 | Aa | 5.1 | Aa | 3.9 | Aa | 4.6 | Aa |
| 6 | 4.1 | Ab | 4.3 | Ab | 6.6 | Aa | 4.5 | Ab | 4.9 | Ab | 4.6 | Ab | 4.4 | Ab | 3.0 | Ab | 4.7 | Ab |
| 7 | 3.8 | Ab | 3.6 | Ab | 5.1 | Aa | 5.3 | Aa | 5.1 | Aa | 3.7 | Ab | 4.5 | Aa | 2.6 | Ab | 4.1 | Ab |
| 8 | 5.3 | Aa | 5.1 | Aa | 4.3 | Ba | 4.1 | Aa | 5.5 | Aa | 4.1 | Aa | 5.4 | Aa | 2.9 | Ab | 2.1 | Ab |
| 9 | 5.0 | Aa | 4.0 | Ab | 5.9 | Aa | 4.9 | Aa | 3.7 | Ab | 3.5 | Ab | 5.4 | Aa | 3.9 | Ab | 3.5 | Ab |
| 10 | 3.7 | Aa | 4.3 | Aa | 5.2 | Aa | 5.2 | Aa | 3.7 | Aa | 3.6 | Aa | 5.2 | Aa | 4.0 | Aa | 4.3 | Aa |
| 11 | 4.5 | Aa | 3.9 | Ab | 5.7 | Aa | 4.8 | Aa | 4.9 | Aa | 2.9 | Ab | 5.8 | Aa | 3.3 | Ab | 4.0 | Ab |
| 12 | 5.3 | Aa | 5.1 | Aa | 3.7 | Bb | 3.9 | Ab | 4.8 | Aa | 2.5 | Ab | 5.3 | Aa | 3.7 | Ab | 3.1 | Ab |
| Médias | 4.6* | | 4.4* | | 5.3* | | 4.5* | | 4.5* | | 3.7* | | 5.1* | | 3.5* | | 3.9* | |

* médias das notas de severidade da doença em milho.

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Embora não se tenha observado diferenças estatísticas entre os métodos, verifica-se que, considerando todos os híbridos, os métodos 3, 4, 7 e 12 apresentaram as maiores severidades médias para a doença. Quando se avaliou as severidades médias apenas dos híbridos tolerantes, o método 4 se mostrou mais eficaz para reprodução dos sintomas da doença. Para os híbridos suscetíveis, o método 7 foi o que apresentou maior severidade média. Esses resultados podem ser atribuídos ao ferimento provocado na lateral da espiga para a inoculação da suspensão de esporos e agravado pelo fato de serem duas inoculações (4 mL, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma) no caso dos métodos 4 e 12, e no caso do método 7 a câmara úmida por 24 horas pode ter ajudado a manter a umidade propícia para a infecção e colonização do fungo.

O método 4 (4 mL na lateral, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma sem cobertura da espiga) se mostrou pouco seletivo, ou seja, apresentou severidade média alta tanto para híbridos tolerantes quanto suscetíveis. Para esse método os híbridos tolerantes AG 9020, 30F80 e 30R50, e os híbridos suscetíveis 2B710, DKB 214 e 30K73 receberam notas, cujas médias variaram de 2,4 a 3,9 e não diferiram entre si estatisticamente pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 5).

Resposta semelhantes foi obtido com o método 12 (4 mL na lateral, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma com cobertura por 48 horas) se mostrou pouco específico, não diferenciando híbridos tolerantes de suscetíveis. Os híbridos tolerantes AG 9020 e 30F80, e os híbridos suscetíveis 2B710, DKB214 e 30K73 receberam notas, cujas médias variaram de 2,5 a 3,9 e não diferiram entre si estatisticamente pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 5).

Já os métodos 3 (2 mL na lateral após a antese sem cobertura da espiga), 7 (2 mL na lateral após a antese com cobertura da espiga por 24 horas) e 11 (2 mL na lateral após a antese com cobertura da espiga por 48 horas), diferenciaram melhor os híbridos tolerantes de suscetíveis. O método 3 apresentou sintomas apenas nos híbridos classificados como suscetíveis (2B710, DKB214 e 30K73) com notas de severidade média entre 2,3 e 3,0. Quando inoculado com o método 7 apenas o híbrido tolerante DKB390, juntamente com os híbridos suscetíveis 2B710, DKB214 e 30K73 e moderadamente suscetível 30F98 apresentaram sintomas da doença inoculada com as notas de severidade médias entre 2,6 e 4,1. Com a inoculação

pelo método 11 apenas o híbrido tolerante DKB390, juntamente com os híbridos suscetíveis 2B710, DKB214 e 30K73 apresentaram sintomas da doença inoculada com as notas de severidade média entre 2,9 e 4,0. Esses três métodos não diferiram entre si estatisticamente pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 5).

Os métodos 1, 2, 5 e 10 que se caracterizam por inoculações no estigma, não apresentaram resultados eficazes para a infecção do fungo, apresentando notas de severidade baixas e em muitos casos com poucos sintomas, inclusive nos híbridos suscetíveis. Os métodos 6 e 9 não foram específicos, tendo severidade semelhante tanto para híbridos tolerantes como suscetíveis.

Como já era esperado, os híbridos apresentaram diferenças entre si nas respostas a infecção do fungo independente do método utilizado para a inoculação (Tabela 6). A classificação dos híbridos de milho em Moderadamente Suscetível, Suscetível e Tolerante, com base nas diferentes respostas a infecção do fungo foram confirmadas com os resultados obtidos por esse trabalho. O híbrido 30F98 recebeu nota 4 enquanto que os tolerantes receberam nota 5 (11 a 20% de grãos infectados) e suscetíveis nota 3 (31 a 40% dos grãos infectados) em média.

O híbrido DKB 390 apresentou severidade média acima da esperada para um material com comportamento de resistência em safras anteriores, assim como o 30F45 que apresentou resultados que diferem das avaliações preliminares. Este híbrido em experimentos preliminares (dados não publicados) se comportou como um ótimo parâmetro de suscetibilidade, no entanto, no ano agrícola de 2008 esse comportamento não se repetiu. Esse resultado pode estar associado ao fato da antese desse material, coincidir com o período sem precipitação pluvial no mês de maio (Figura 4) por ser de ciclo semi-precoce. Para corrigir essa variável, seria necessário a repetição desse experimento agrupando os híbridos com período para florescimento semelhantes em três datas de semeadura. Desta forma os híbridos com florescimento tardio seriam semeados primeiro, seguidos por híbrido de ciclo médio e por último os híbridos de florescimento precoce. Com essa estratégia todos os híbridos teriam florescimento em uma mesma época, sendo inoculados em um mesmo instante e sujeitos a um mesmo ambiente.

Como já foi mencionado, a incidência e severidade da Giberela foram maiores nos híbridos suscetíveis, tendo destaque o híbrido DKB 214, com notas de severidade média de 3. Os híbridos tolerantes apresentaram menor severidade

média destacando-se o híbrido AG 9020 que recebeu em média nota 5. Com relação a esse híbrido é relevante repetir que foi o único a diferenciar os métodos entre si. Os métodos 4, 8 e 12 apresentaram notas de severidades médias entre 3,7 e 4,3, não diferindo entre si, mas diferindo dos demais métodos (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 e 11) que tiveram notas entre 5,1 e 6,6. O menor índice de severidade para Giberela para os híbridos tolerantes pode estar relacionado a maior dificuldade à entrada dos agentes causais na inflorescência feminina. Tais características podem ocorrer devido ao melhor empalhamento e à inclinação natural da espiga na maturação, características que têm sido priorizadas pelos programas de melhoramento nos últimos anos (RUSSEL, 1991; DUVICK, 1994).

Tabela 6: Quadro da análise de variância para 12 métodos de inoculação testados em espigas de 9 híbrido de milho classificados como Moderadamente suscetível, Tolerantes e Suscetíveis, de acordo com a resposta para a infecção do fungo.

| Fonte de variação | GL | SQ | QM | F |
|--------------------------|-----------|-----------|----------------------|----------|
| Blocos | 2 | 55.528 | 27.764 | |
| Híbridos | 8 | 1.027.765 | 12.8470* | 11.29 |
| Métodos | 11 | 66.177 | 0.6016 ^{ns} | 0.53 |
| Híbridos *métodos | 88 | 1.300.412 | 1.4777 ^{ns} | 1.30 |
| Resíduo | 214 | 2.435.405 | 11.380 | |
| Total | 323 | 4.885.288 | | |
| CV(%) | - | 24.36 | | |
| Média | - | 4.37** | | |

^{ns} não há diferença significativa pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade

* apresenta diferença significativa pelo teste de agrupamento de Scott-Knott a 5% de probabilidade

**médias das notas de severidade da doença em espigas de milho inoculadas

5 CONCLUSÕES

I – As espécies de *Gibberella zeae* obtidas de espigas contaminadas de regiões produtoras de milho no estado do Paraná não apresentaram diferenças significativas para os experimentos conduzidos no presente trabalho.

II – Os métodos com inoculação de 2 mL na lateral da espiga sem cobertura (3), com cobertura por 24 horas (7) e com cobertura por 48 horas (11) se mostraram eficientes na caracterização de híbridos tolerantes e suscetíveis.

III – Os métodos com inoculação de 2 mL no estigma sem cobertura da espiga (1) e com cobertura por 24 horas (5), assim como os métodos de inoculação de 4 mL no estigma, sendo 2 mL após a antese e 2 mL na senescência do estigma sem cobertura (2) e com cobertura por 48 horas (10) apresentaram baixa severidade nas espigas avaliadas não caracterizando híbridos tolerantes e suscetíveis.

IV – Os métodos com inoculação de 4 mL na lateral da espiga sem cobertura (4) e com cobertura por 48 horas (12), assim como os métodos com inoculação de 4 mL no estigma, sendo 2 mL após a antese e 2 mL com cabelo seco com cobertura da espiga por 24 horas (6) e 2 mL no estigma após a antese com cobertura por 48 horas (9) apresentaram alta severidade nas espigas avaliadas mas não caracterizando os híbridos tolerantes e suscetíveis.

V – O método de inoculação de 4 mL na lateral da espiga, sendo 2 mL após a antese e 2 mL com cabelo seco com cobertura por 24 horas (8) apresentou baixa severidade inclusive para híbridos suscetíveis.

VI – Os métodos avaliados e que se mostraram eficientes na caracterização de híbridos tolerantes e suscetíveis poderão ser empregados em larga escala para a cultura do milho visando à identificação e a seleção de linhagens e variedades tolerantes à doença. Com isto, as empresas de melhoramento poderão trabalhar com materiais superiores, que apresentam sanidade de espigas e os produtores com menores perdas com a produção de grãos

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAI, G.; SHANER, G. Scab of wheat: prospects for control. **Plant Disease**, v. 78, p. 760-766, 1994.

BOWDEN, R. L.; LESLIE, J. F. Sexual recombination in *Gibberella zeae*. **Phytopathology**, v. 89, p. 182-188, 1999.

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

CASA, R.T. et al. Danos causados pela infecção de *Gibberella zeae* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 289-293, 2004.

CASA, R. T. et al. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia brasileira**, v. 31, n. 5, p. 427-439, 2006.

CHU, Y. et al. Double-Stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68.5, p. 2529-2534, 2002.

DEL PONTE, E.M. et al. Giberelado trigo – aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 587-605, 2004.

DESJARDINS, A. E. et al. Reduced virulence of trichothecene-non producing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. **Mol. Plant Microbe Interact**, v. 9, p. 775-781, 1996.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997.

GEISER, D.M. et al. *Fusarium*-id v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 473-479, 2004.

LEE, T. et al. Tri7 Determine Deoxynivalenol and Nivalenol-Producing chemotypes of *Gibberella zeae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68.5, p. 2148-2154, 2002.

McMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. **Plant Disease**, v. 81, p. 1340-1348, 1997.

O' DONNELL, K. O.; CIGELNIK, E.; CASPER, H. H. Molecular phylogenetic, morphological and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. **Fungal Genetic Biological**, v. 23, p. 57-67, 1998.

O' DONNELL, K. et al.. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Evolution**, v. 97, p. 7905-7910, 2000.

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, B. Quantificação de danos causados pela giberela em cereais de inverno, na safra 2000, em Passo Fundo, RS. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 189-192, 2002.

PARRY, D. W.; JENKINSON, P.; McLEOD, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review. **Plant Pathology**, v. 44, p. 207-238, 1995.

PICANÇO, M.C et al. Fatores de perdas em cultivares de milho safrinha. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 161-167, 2004.

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

PROCTOR, R. H.; HOHN, R. M.; McCORMICK, S. P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular Plant Microbe Interact**, v. 8, p. 593-601, 1995.

REID, L. M.; HAMOLTON, R. I.; MATHER, D. E. 1996 Screening maize for resistance to *Gibberella* ear rot. In: CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 370-373, 1998.

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

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. 144 p.

SANGOI, L et al. Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados com diferentes densidades de plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n.1, p.17-21, 2000.

SILVA et al. Manejo integrado de doenças na cultura do milho de safrinha. In: **Seminário nacional de milho safrinha**. Londrina: IAPAR, 2001. 181 p.

TRENTO, S. M.; IRGANG, H. H.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.

TSUNECHIRO A., GODOY, R.C.B. Histórico e perspectivas do milho safrinha no Brasil. In: **Seminário nacional de milho safrinha**. Londrina: IAPAR, 2001. 181 p.