

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA



PROJETO DE PESQUISA:

MANCHA BRANCA DO MILHO (*Pantoea ananatis*):  
VARIABILIDADE NO PATÓGENO E RESISTÊNCIA  
GENÉTICA NO HOSPEDEIRO

Mestrando: Fabrício Eustáquio Lanza  
Orientador: Laércio Zambolim  
Co-Orientadores: Carlos Roberto Casela  
Rodrigo Veras da Costa  
Paulo Evaristo de O. Guimarães

JUNHO/2009  
VIÇOSA-MG

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico e Etiologia	3
2.2 Sintomatologia e Epidemiologia	6
2.3 Controle	7
3. OBJETIVO	9
3.1 Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E METODOS	10
4.1 Caracterização da reação de híbridos e linhagens de milho quanto à mancha branca	10
4.2 Caracterização da variabilidade patogêncica de <i>P. ananatis</i>	11
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	12
Anexo 1-Escala diagramática para avaliação da severidade da Mancha Branca	15
Anexo 2-Croqui do experimento	16

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os cereais mais cultivados no mundo, o milho (*Zea mays* L.) se destaca pelo papel que cumpre na cadeia alimentar e também por seu valor agrônomico, tanto em área plantada quanto em produtividade. No Brasil, a produção total de milho (safra de verão e safrinha), alcançou um volume recorde de 58,5 milhões de toneladas na safra 2007/2008, obtendo um crescimento de 9,5% (3,47 milhões de toneladas) e 24,5% (3,62 milhões de toneladas) na safra de verão e safrinha, respectivamente, quando comparado às safras de verão e safrinha do ano de 2006/2007. A produtividade média da cultura do milho na safra 2007/2008 foi de 4.154 Kg/ha, indicando um aumento expressivo da capacidade produtiva no país, quando comparadas à safra 2006/2007, cuja produtividade foi de 3.855 Kg/ha. Os preços elevados, aliados às boas condições climáticas na maioria dos estados produtores, justificaram este resultado (Conab, 2008).

Mesmo exportando anualmente 20% de sua produção de milho, o Brasil apresenta uma das produtividades mais baixas entre os exportadores mundiais (Abramilo, 2009). Entre os fatores que corroboram para com essa baixa produtividade, as doenças tem merecido importante atenção pelas perdas que causam.

A expansão da fronteira agrícola, a ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha), a adoção do sistema de plantio direto, o aumento do uso de sistemas de irrigação, a ausência de rotação de cultura e o uso de materiais suscetíveis, tem promovido modificações importantes na dinâmica populacional dos patógenos que prejudicam o cultivo do milho e determinando o aumento na incidência e na severidade de doenças na cultura nas principais regiões produtoras de milho do país. A continuidade temporal da cultura, resultante dos fatores acima mencionados, tem promovido o surgimento, a cada safra, de novos problemas. Estes fatores têm predisposto a cultura ao ataque de vários patógenos, os quais são, em muitos casos, considerados como o principal fator limitante no processo produtivo do milho (Pereira *et al.*, 2005; Fernandes & Oliveira, 1997).

Dentre as doenças que afetam o milho, a Mancha Branca, primeiramente descrita como mancha foliar de *Phaeosphaeria* destaca-se como uma das mais importantes. É endêmica no Brasil e sua incidência e severidade têm aumentado significativamente a partir dos anos 1990, podendo ser encontrada hoje em praticamente todas as regiões onde o milho é cultivado (Fernandes & Oliveira, 1997; Fantin, 1994). Folhas com 10-20% de severidade apresentam uma redução na taxa fotossintética

líquida de 40%, em cultivares suscetíveis, podendo reduzir a produção de grãos em cerca de 60% (Godoy *et al.* 2001). Essa correlação negativa significativa entre a produtividade do milho e a severidade da doença, tem sido relatada por vários autores nas condições brasileiras (Sawazaki *et al.*, 1997; Brasil & Carvalho, 1998; Pegoraro *et al.* 2001). Resultados obtidos com o controle químico da Mancha Branca resultaram em aumentos de 63,1% na produção, o que demonstra a importância e o poder destrutivo dessa doença para a cultura do milho no Brasil (Pinto, 1999).

Dentre as estratégias de manejo da mancha branca o uso da resistência genética é considerada uma das mais eficientes. Desse modo, a utilização de genótipos resistentes destaca-se como a forma mais viável, segura e de menor impacto ambiental para o manejo desta enfermidade (Pereira *et al.* 2005).

Schuelter *et al.* (2003), utilizando populações originadas das linhagens L31.2.1.2 e L726, resistente e suscetível respectivamente, concluiu que o controle genético da resistência à Mancha Branca é oligogênico para os genitores empregados no estudo, sendo os efeitos aditivos mais importantes na determinação do caráter, e que a elevada magnitude dos coeficientes de herdabilidade, evidencia a possibilidade do emprego de técnicas seletivas simples com eficácia na obtenção de ganhos satisfatórios.

Entretanto, a utilização da resistência genética, principalmente a resistência do tipo vertical, pode ser dificultada pela variabilidade patogênica, resultando na rápida adaptação do patógeno aos materiais disponíveis no mercado. Assim, um conhecimento sobre a variabilidade, com relação à patogenicidade, é fundamental para a elaboração e estabelecimento de estratégias de manejo que possibilitem a obtenção de níveis mais estáveis de resistência nesse patossistema.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico e etiologia

No Brasil, há relatos da doença desde 1977, onde foi inicialmente descrita como Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*, causada pelo fungo *Phaeosphaeria maydis*, provavelmente, pela semelhança dos sintomas aqui observados com aqueles descritos na Índia, onde esta doença foi descrita pela primeira vez em 1965 por Rane *et al.* (1965) e nos Estados Unidos onde a mancha de *phaeosphaeria* foi descrita pela primeira vez em 1991 no estado da Flórida (Carson & Goodman, 1991). Entretanto, Fernandes *et al.* (1985) relataram uma doença em milho no Brasil causada por uma bactéria identificada como *Pseudomonas syringae*, que na época tinha como sinonímia *Xanthomonas holcicola*. Neste mesmo artigo foram apresentadas fotos dos sintomas da doença muito semelhantes aos sintomas de mancha branca, denominada pelo autor como “Holcus Spot”.

No decorrer dos estudos sobre a etiologia da doença, dificuldades foram encontradas na reprodução dos sintomas causados por *Phaeosphaeria maydis*, bem como de outros fungos obtidos das lesões (Paccola-Meirelles *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Bomfeti *et al.* 2008). Foram também observadas falhas na identificação dos fungos obtidos de lesões já estabelecidas, típicas da Mancha Branca. Houve um equívoco ao se considerar, por exemplo, que a fase anamórfica *Phyllosticta* sp. e a fase sexual *Phaeosphaeria maydis* são de um mesmo organismo, sendo provado através de técnicas moleculares, que são fungos diferentes. Entre os organismos isolados, o fungo *Phoma tropica* é o que aparece com maior frequência. Entretanto, esse fungo é considerado como um oportunista que aparece em lesões já pré-estabelecidas (Cervelatti *et al.*, 2002).

Paccola-Meirelles *et al.* (2001) relataram o envolvimento da bactéria *Pantoea ananatis* na etiologia da mancha branca do milho. Testes de patogenicidade e re-isolamento do patógeno a partir de lesões produzidas por inoculações artificiais em casa de vegetação confirmaram o envolvimento da bactéria com a fase inicial da doença, isso, quando as lesões ainda se encontram na fase de anasarca. Tal fato reforça a hipótese inicial de Fernandes *et al.* (1985), que consideraram ser uma bactéria, com características sintomatológicas muito semelhantes a *P. ananatis*, então denominada de *Pseudomonas syringae*, o agente causal da doença.

Oliveira *et al.* (2004), descreveram um fungo pertencente ao gênero *Sclerophthora*, classe Oomicetes, como o provável agente etiológico da mancha branca do milho. Esta hipótese, entretanto, foi considerada por Casela & Ferreira (2006), como carente de bases científicas, pela não realização, pelos autores, de provas que comprovassem a patogenicidade do suposto agente causal. Além disto, as estruturas apresentadas e descritas pelos autores foram consideradas por Casela & Ferreira (2006) como não sendo, na realidade, de um organismo pertencente ao gênero *Sclerophthora*.

Posteriormente, Bomfeti *et al.* (2008), usando técnicas de microscopia eletrônica e ferramentas moleculares, como primers bacterianos para os genes 16S rRNA e *rpoB* e oligonucleotídeo universal para fungo (ITS4), reforçaram o relato feito anteriormente por Paccola-Meirelles *et al.* (2001). Os autores verificaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão, grande número de células bacterianas nos espaços intercelulares em lesões oriundas de plantas naturalmente e artificialmente infectadas. Além disso, estruturas fúngicas não foram visualizadas em lesões jovens. Por meio de técnicas moleculares foi observada amplificação positiva com primers bacterianos; por outro lado, nenhuma amplificação foi observada quando o primer ITS4 foi usado. Outro aspecto importante discutido por estes autores é que espécies fúngicas podem colonizar lesões pré estabelecidas pela *P. ananatis*. Ainda, o teste de Elisa indireto utilizando antissoro policlonal produzido em coelho contra células de *P. ananatis* isoladas de lesões anasarcas, confirmou a presença da bactéria nestas lesões (Paccola-Meirelles, 2008).

Amaral *et al.* (2004) isolaram em 70% das lesões da mancha Branca do Milho o fungo *Phoma sorghina* e atribuíram como um agente etiológico de mancha foliar em milho. Posteriormente, Amaral *et al.* (2005) relataram o envolvimento de três fungos como causadores de sintomas similares aos da Mancha Branca no Brasil (*Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp.), e afirmaram que *P. sorghina* e *Phoma* sp. são de ocorrência generalizada nas lesões, enquanto *Sporormiella* e *Phyllosticta* spp. são restritos a Goiás e Rio Grande do Sul.

Nos Estados Unidos da America, uma importante bacteriose causa sérios prejuízos à cultura do milho, a *Pantoea stewartii*, mais conhecida como doença de Stewart. Os sintomas causados em milho são estrias cloróticas acompanhadas de nanismo da planta, diferentes, portanto dos sintomas produzidos por *P. ananatis*. *Pantoea stewartii* está listado como uma praga quarentenária de importância A1, ou seja, não está presente em território nacional e cuidados para não introdução do

patógeno no Brasil, estão sendo constantemente tomados, revelando assim a importância de bacterioses causadas pelo gênero *Pantoea*, na cultura do milho (Stewart, 1897; Mergaert *et al.* 1993).

Recentemente Goszczynska & Botha (2007) relataram uma nova doença em milho causada por *P. ananatis* no sul da África, a qual foi denominada de podridão marrom do colmo. A doença caracteriza-se pela presença de rachaduras no sentido vertical ao longo do colmo, chegando a romper os internódios, de coloração marrom-escuro, daí o nome da doença. Embora este tipo de sintoma não tenha sido ainda observado nas condições brasileiras, esse relato chama a atenção para o fato de *P. ananatis* ser um patógeno do milho. Segundo os mesmos autores, a possibilidade do agente etiológico ser transmitido de *Eucalyptus* spp. por um vetor desconhecido não pode ser excluída.

Uma nova doença foi relatada em campos de produção comercial de “sudangrass” (*Sorghum sudanense*) no Estado da Califórnia/USA. Os sintomas incluem grandes manchas brancas frequentemente associadas com margens marrons escuras, onde *P. ananatis* foi consistentemente isolada. Concomitantemente, foi provado que *P. ananatis*, através de inoculações artificiais realizadas experimentalmente, pode causar doença em milho e aveia, causando sintomas bem semelhantes aos citados anteriormente. Para identificação da bactéria foram feitas observações morfológicas da cultura, além de testes bioquímicos, onde por meio da realização dos postulados de Koch foi comprovado que essa bactéria poderia realmente causar doença nas referidas espécies de plantas (Azad *et al.*, 2000).

*P. ananatis*, também agente causal da podridão central da cebola, foi recuperada de 25 espécies assintomáticas de plantas daninhas e cultivadas, no Estado da Geórgia/USA. *Digitaria sanguinalis*, *Desmodium tortuosum*, *Richardia scabra*, *Cassia obtusifolia*, *Panicum texanum*, *Verbena bonariensis* e *Cyperus esculentus* são plantas daninhas que ocorrem naturalmente nesse ambiente onde *P. ananatis* foi recuperada, além das plantas cultivadas, *Cynodon dactylon*, *Vigna unguiculata* e *Glycine max*, indicando que tal bactéria tem uma associação com as referidas plantas. Para identificação e constatação da bactéria foram realizados isolamentos, além da detecção desta, através de um primer específico desenvolvido para a *P. ananatis* (Gitaitis *et al.*, 2002).



## 2.2 Sintomatologia e epidemiologia

As lesões da mancha branca são, inicialmente, circulares, aquosas e verde-claras (anasarcas). Posteriormente passam a necróticas, de cor palha, circulares a elípticas, com diâmetro variando de 0,3 a 1,0 cm. Geralmente são encontradas dispersas no limbo foliar, mas iniciam-se na ponta da folha progredindo para a base, podendo coalescer. Em geral, os sintomas aparecem inicialmente nas folhas inferiores, progredindo rapidamente para as superiores, sendo mais severos após o pendoamento. Sob condições de ataque severo, os sintomas da doença podem ser observados também na palha da espiga. Em condições de campo, os sintomas não ocorrem, normalmente, em plântulas de milho. Sob condições favoráveis, a mancha branca pode causar seca prematura das folhas e reduções no ciclo da planta, no tamanho e peso dos grãos (Oliveira *et al.* 2004). As lesões variam de tamanho, de acordo com o nível de resistência do material (Paccola-Meirelles *et al.*, 2002).

Condições favoráveis para a doença envolvem umidade relativa acima de 60% e também temperaturas noturnas em torno de 14 °C. Por isso, tem sido observada ocorrendo em alta severidade em plantios tardios de milho, em algumas regiões. Os plantios tardios de milho, realizados a partir de novembro, nessas regiões, em geral permitem que a cultura se desenvolva sob altas precipitações pluviométricas, propiciando as condições adequadas para o desenvolvimento da doença (Fernandes & Oliveira, 1997). Segundo Sawazaki (1997), a uniformidade de precipitação é o fator preponderante no desenvolvimento da doença. Plantas infectadas precocemente podem ter sua produtividade reduzida se a umidade relativa for elevada, preferencialmente com água livre na superfície da folha, e as temperaturas, moderadas. Estas condições climáticas são comumente encontradas em regiões acima de 600 m de altitude (Pereira *et al.* 2005).

A semelhança do que ocorre com outros patógenos, é possível que o agente causal sobreviva também nos restos de cultura. Assim, ao longo do tempo, um aumento na concentração de inóculo desse patógeno pode ocorrer em áreas onde se utiliza sistematicamente o plantio direto, tornando as lavouras de milho mais sujeitas à ocorrência da doença em alta severidade (Oliveira *et al.* 2004).

## **2.3 Controle**

### **Cultivares Resistentes**

O método de controle mais comumente utilizado é o plantio de cultivares resistentes. Apesar das dificuldades anteriormente mencionadas em relação à identificação do agente causal da doença, tem sido verificada variabilidade para resistência à doença no germoplasma de milho, a qual tem sido utilizada em programas de melhoramento. Linhagens com bons níveis de resistência têm sido identificadas em trabalhos realizados com germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (Paccola-Meirelles - 2002).

Souza & Duarte (2002) indicaram os híbridos C435, AG1051 e C333B, para plantios em locais onde a severidade da mancha-branca é mais acentuada. Em trabalho realizado por Pergorato *et al.* (2001), o híbrido AS3466 foi o mais resistente em várias épocas da semeadura. No estado de Goiás, por meio de infestação natural, avaliou-se a severidade da doença em diferentes híbridos de milho plantados em diferentes épocas; foram considerados como resistentes os híbridos AG1043, AGX7391, AGX7393 e C901 (Brasil & Carvalho, 1998). Já no estado de São Paulo as cultivares CO42, IAC Taiúba, P3041, AGM2007, C805, P3051, C425, Dina70, Dina170 e XL380, foram consideradas resistentes, obtendo notas menores que três numa escala de notas de severidade variável de 1 a 9 (Sawazaki *et al.* 1997). O Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo – EMBRAPA recomenda os híbridos BRS 1010 e o BRS 1035, como materiais com bons níveis de resistência a Mancha branca do milho.

### **Práticas Culturais**

A realização de plantios mais cedo, nos quais a fase de maior suscetibilidade das plantas não coincide com o período chuvoso, tem-se revelado uma prática cultural efetiva no controle dessa doença (Oliveira *et al.* 2004). Em trabalho realizado por Pegoraro *et al.* (2001), demonstrou-se que, a medida em que a semeadura do milho era retardada, havia um aumento na severidade da doença e uma redução no rendimento dos grãos; plantios realizados em setembro (primeira época de semeadura), resultaram em menores índices de mancha foliar e em maiores rendimentos de grãos. Os autores observaram ainda que variações em doses de adubação de 150 a 300 Kg/ha da fórmula

N-P-K, 5-20-20 no plantio e 35 a 70 Kg/ha de N em cobertura no estágio V6, não influenciaram a severidade da doença.

Estudos enfatizando a sobrevivência do agente causal da mancha branca em restos culturais ainda devem ser realizados, pois informações a este respeito são escassas.

Um estudo realizado por Rijavec *et al.* (2007), comprova que *P. ananatis* pode estar presente internamente em sementes de milho do cultivar W22. Esta bactéria pode ser transmitida de forma vertical durante duas estações de plantio diferentes. Isso nos leva a inferir que de fato o patógeno é transmitido via sementes, e até sugerir, como modo de controle da enfermidade o uso de sementes sadias.

A eliminação de plantas hospedeiras pode ser uma boa estratégia de manejo da doença, já que a bactéria pode sobreviver tanto causando doença como de forma epifítica em plantas daninhas ou em plantas de cultivo comercial (Gitaitis *et al.*, 2002).

### **Controle Químico**

Em se tratando de controle por meio de produtos químicos comerciais, o fungicida Mancozeb na dosagem de 2500g de princípio ativo por hectare, mostrou-se eficiente no controle da doença no campo. Este produto também inibiu completamente o crescimento da bactéria *in vitro*, explicando os resultados obtidos no campo (Bomfeti *et al.*, 2007). Além do fungicida Mancozeb, o Azoxystrobin na dosagem de 150g de princípio ativo por hectare, alcançou controle satisfatório da doença no campo, obtendo resultados bem semelhantes ao outro fungicida citado (Pinto, 2004). Este resultado corrobora pelo encontrado por Costa (2008), onde o autor conclui que o correto manejo da mancha branca pode ser obtido por meio da utilização da estrobirulina azoxistrobina, isolada ou em mistura com o ciproconazol.

Trabalho realizado por Silva *et al.* (2008) revelaram que o antibiótico Oxitetraciclina combinado com a Piraclostrobina mais Epoxiconazol, apresentou bom controle no avanço da doença. E acrescentam, relatando que a combinação de fungicida mais antibiótico ou somente o antibiótico, mostraram-se eficientes no controle da Mancha Branca do Milho.

Entretanto, o uso do controle químico deve ser empregado dentro de um sistema integrado de manejo, na qual, resistência genética, rotação de culturas e época de plantio, entre outras, devem ser necessariamente consideradas (Costa, 2008).

### **3. OBJETIVO**

A presente proposta tem como objetivos, através da obtenção de informações sobre a reação de genótipos, a variabilidade patogênica e o modo de dispersão do patógeno, obter subsídios para a definição de medidas adequadas para o manejo da Mancha Branca do Milho (*P. ananatis*) nas condições brasileiras.

#### **3.1 Objetivos específicos**

I. Caracterizar a reação de híbridos comerciais e linhagens de milho, quanto a resistência a Mancha Branca do Milho em condições de campo e casa de vegetação, de modo a determinar e indicar genótipos resistentes. Em se tratando das linhagens, estas serão indicadas como fonte de resistência para a produção de híbridos.

II. Determinar se há variabilidade patogênica entre os diferentes isolados de *P. ananatis* obtidos de diferentes híbridos comerciais e linhagens de milho, de modo a se obter informações iniciais sobre o assunto.

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização da reação de híbridos e linhagens de milho quanto à mancha branca

O ensaio será conduzido no campo experimental do Centro Nacional de pesquisa de Milho e Sorgo – EMBRAPA, localizado em Sete Lagoas/MG. O delineamento experimental será o de blocos ao acaso com, com 15 tratamentos e 3 repetições. Será avaliada a dispersão da *P. ananatis* por meio do plantio do híbrido suscetível Dow 657 na parte frontal do experimento que será considerada como fonte de inóculo, e no restante do perímetro da área, será plantado o híbrido BRS1010 considerado resistente. No interior da área, serão avaliados os híbridos BRS2022, BRS1010, 1D2195, BRS1040, BRS1035, BRS 1031, BRS3025, BRS1030, 2B710 e P30F35E e as linhagens L3, L228-3, 521274, 521236 e 262841-1-4-1. Entre as parcelas experimentais, que serão compostas de uma linha de 5 metros de cada material, será plantada uma linha de 5 metros do híbrido resistente BRS1010 (Anexo 2).

Para a avaliações será considerada a severidade da doença, a qual será avaliada através da escala de notas proposta pela Agrocerec (1996), com valores de 1 a 9, onde 1 = 0%; 2 = 1%; 3 > 1% e ≤ 10%; 4 > 10% e ≤ 20%; 5 > 20% e ≤ 30%; 6 > 30% e ≤ 40%; 7 > 40% e ≤ 60%; 8 > 60% e ≤ 80%; 9 > 80% sendo 1 indicativo de alta resistência, 2 e 3 de resistência, 4 de resistência mediana, 5 e 6 de uma suscetibilidade moderada, 7 e 8 de suscetibilidade e 9 de alta suscetibilidade. (Anexo 1). As avaliações seguirão até o final do ciclo da cultura, e no processo de colheita será avaliada a produção dos diferentes híbridos e linhagens. O experimento será realizado com incidência natural do patógeno.

Além do experimento no campo, este também será realizado em casa de vegetação, onde as plantas serão cultivadas em vasos de cinco litros. O delineamento estatístico será o de blocos ao acaso. Ao completarem 20 dias, as plantas serão inoculadas com uma mistura de isolados de *Pantoea ananatis* obtidos no campo. A metodologia de inoculação segue descrita no tópico de variabilidade patogênica dos isolados.

De modo a se obter informações sobre a dispersão do *P. ananatis* em condições de campo, serão avaliados seis pontos de avaliação dentro de cada parcela, dispostos a 1, 2, 3, 4, 5 e 6 m a partir da fonte de inóculo. Cada ponto será composto de um planta.

Os valores de severidade da doença em cada ponto de cada parcela serão utilizados para calcular a AACPD em cada ponto. Esses valores serão submetidos à análise de variância e teste de diferenças entre as médias a 5% de probabilidade para a determinação de diferenças no nível de doença nos pontos dentro das parcelas. Para comparação do gradiente de dispersão entre os diferentes genótipos será realizada análise de regressão linear dos dados.

### **3.2 Caracterização da variabilidade patogêncica de *P. ananatis***

Folhas de milho com lesões em estágios iniciais serão coletadas e levadas ao laboratório de fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo – EMBRAPA, localizado em Sete Lagoas/MG. As folhas serão lavadas com sabão neutro e secas em condição ambiente. Para o isolamento de *P. ananatis* serão utilizados fragmentos de lesões em estágio inicial (anasarca). Para esterilização superficial, os fragmentos serão submetidos ao tratamento com álcool 70% por 1 minuto, posteriormente com hipoclorito de sódio a 2% por 4 minutos, novamente, com álcool 70% por 30 segundos e, finalmente, os fragmentos serão submetidos a tríplex lavagem em água esterilizada, em intervalos de 30 segundos entre cada. A água da última lavagem será plaqueada em meio TSA (triptic soy agar) e BDA (batata dextrose agar), para confirmação do procedimento de desinfestação. A extremidade de cada fragmento (aproximadamente 1 mm) contendo a lesão será removida utilizando-se bisturi estéril. Os fragmentos então serão transferidos para placas com meio TSA. O controle será feito como descrito acima, utilizando fragmentos de folhas assintomáticas. Os isolados serão purificados e identificados de acordo com o genótipo onde a bactéria foi obtida e mantida em meio TSA.

Para a obtenção do inóculo, a bactéria será cultivada em meio TSB (triptic soy broth) a 30°C por 12h. Assim, 1 ml desse pré inóculo será transferido para 100 ml de meio TSB e incubado em agitador por 4h. A esse inóculo será acrescida solução salina 0,85% (NaCl 1M) na proporção 1:1. Imediatamente antes da inoculação, o inóculo será ajustado para aproximadamente  $10^6 - 10^8$  UFC/mL usando espectrofotômetro. Essa suspensão será pulverizada sobre as folhas das plantas de milho, após o tratamento com uma suspensão abrasiva de carborundum para obtenção de ferimentos nas folhas. As plantas inoculadas serão mantidas em câmara úmida por 72h em casa de vegetação, finalizando o processo de inoculação.

Os isolados serão inoculados em todos os genótipos que foram utilizados no campo, compondo uma série diferenciadora, formando um experimento em fatorial com 20 isolados, 15 genótipos com três repetições. Esses genótipos serão plantados em vasos de cinco litros (três plantas por vaso) e mantidos em casa de vegetação localizada na Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas/MG. As inoculações serão realizadas aos 20 dias após a emergência das plantas.

Primeiramente será observado neste experimento, a reação dos materiais aos diferentes isolados da bactéria, ou seja, reações de virulência, avirulência, tamanho de lesão e período de latente. Este estudo preliminar se faz necessário devido à escassez de informações e trabalhos científicos sobre o assunto. Com isso, pode-se então inferir sobre a variabilidade patogênica dos isolados e possivelmente, propor um sistema de classificação baseado nos resultados obtidos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, A.L. do; CARLI, M.L. de; BARBOSA NETO, J.F. & DAL SOGLIO, F.K. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with phaeosphaeria leaf spot on maize in Brazil (New disease report). **Plant Pathology** V.53, p. 259, 2004.
- AMARAL, A.L. do; DAL SOGLIO, F.K.; CARLI, M.L. de & BARBOSA NETO, J.F. Pathogenic fungi causing symptoms similar to Phaeosphaeria leaf spot maize in Brazil. **Plant Disease**. V.89, n.1, p. 44-49, 2005.
- AZAD, H.R.; HOLMES, G.J. and COOKSEY, D. A. A new blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananatis* e *Pantoea stewartii*. **Plant Disease** v.84, p.973-979, 2000.
- BOMFETI, C.A.; SOUZA-PACCOLLA, E.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; MARRIEL, I.E.; MEIRELLES, W.F.; CASELA, C.R. & PACCOLLA-MEIRELLES, L.D. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize white spot diseases using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical plant pathology**, v.33 (1), (Comunicação) Janeiro-Fevereiro 2008.
- BOMFETI, C.A.; MEIRELLES, W.F.; SOUZA-PACCOLLA, E.A.; CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; MARRIEL, I.E. & PACCOLLA, L.D. Avaliação de produtos químicos comerciais, *in vivo* e *in vitro* no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p. 63-67, 2007.
- BRASIL, E.M. & CARVALHO, Y. de. Comportamento de híbridos de milho em relação a *Phaeosphaeria maydis* em diferentes épocas de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n. 12, p. 1977-1981, 1998.
- CARSON, M.L. & GOODMAN, M.M. Phaeosphaeria leaf spot of maize in Florida. Disease Notes, **Plant Disease** v.75, n. 9, p. 968, 1991.
- CASELA, C.R. & FERREIRA, A.S. The phaeosphaeria leaf spot of maize in Brazil: evidences of a new etiological agent?, **Fitopatologia Brasileira**, Carta ao editor, v.31(4), julho – agosto 2006.
- CERVELATTI, E.P.; PAIVA, E.; MEIRELLES, W.F.; CASELA, C.R.; FERNANDES, F.T.; TEIXEIRA, F.F.; PACCOLLA-MEIRELLES, L.D. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of Phaeosphaeria leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n.3, p.30-37, 2002.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Estimativa de produção de grãos no Brasil** – Levantamento Agosto de 2008. Disponível em <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 9 de Agosto de 2008.
- COSTA, R.V. da. Controle químico da mancha branca do milho através de fungicidas: Análise da situação atual. In: **Congresso Nacional de milho e sorgo** - Workshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho (CD ROM), Londrina-PR, 2008.



FANTIM, G.M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença que vem aumentando sua importância. **Biológico**, São Paulo SP 56:39. 1994.

GITAITIS, R.; WALCOTT, R.; CULPEPPER, S.; SANDERS, H.; ZOLOBOWSKA, L. and LANGSTON, D. Recovery de *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. **Crop Protection**, v.21, p.983-989, 2002.

FERNANDES, F.T. Doenças de Palntas III. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n.11, p.83 – 87, 1985.

FERNANDES, F.T. & OLIVEIRA, E. de. Principais doenças na cultura do milho. Sete Lagoas MG. Embrapa-CNPMS. **Circular Técnica**, 26. 1997.

FERREIRA, A.S.; FERNANDES, F.T. & LEITE, L.C. Doenças do milho. In: **Manual técnico - Culrura do milho**. Embrapa milho e sorgo, p.167-174, 1983.

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

GOSZCZYNSKA, T. & BOTHA, W.J. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in south Africa. **Plant Disease** 91: 711-718, 2007.

MERGAERT, J.; VERDONCK, L. and KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (Synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. As *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov. respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *Indologenes* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1993 43:162-173.

OLIVEIRA, E. de.; FERNANDES, F.T.; CASELA, C.R.; PINTO, N.F.J.A. & FERREIRA, A.S. Diagnose e controle de doenças na cultura do milho. In: Galvão, J.C.C. & Miranda, G.V. (Eds.) **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, pg. 226-267, 2004.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; FERREIRA, A.S.; MEIRELLES W.F., MARRIEL, I.E. & CASELA, C.R. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.149, n.5. p.275-279, 2001.

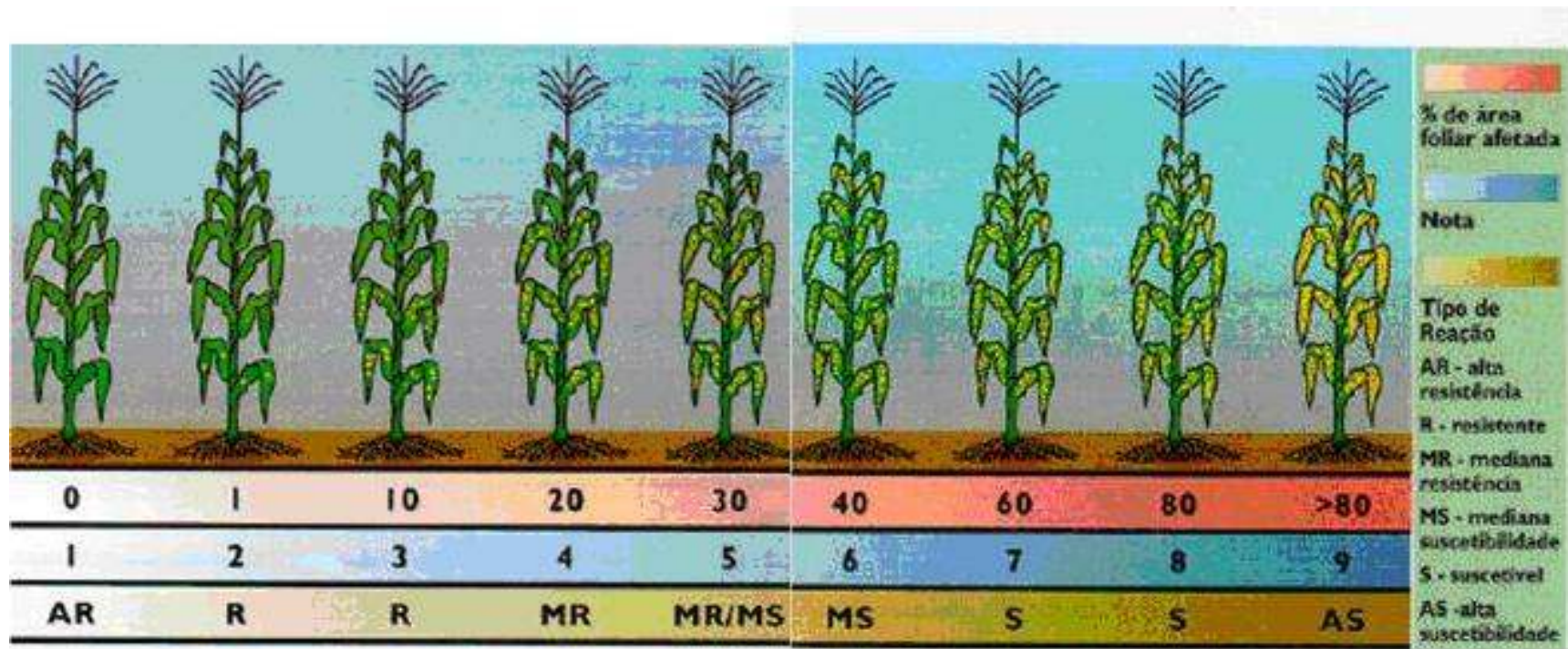
PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; MEIRELLES W.F.; PARENTONI, S.N.; MARRIEL, I.E.; FERREIRA, A.S. & CASELA, C.R. Reaction of maize inbred lines to a bacterium, *Pantoea ananas*, isolated from *Phaeosphaeria* leaf spot lesions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina/PR, v.2, n.4, p. 587-590, 2002.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Mancha Branca X *Pantoea ananatis* In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Wokshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho, Londrina-PR, 2008.

- PEGORARO, D.G.; VACARO, E.; NUSS, C.N.; SOGLIO, F.K. dal; SERENO, M.J.C. de M. & BARBOSA NETO, J.F. Efeito de época de semeadura e adubação na mancha foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.8, p. 1037-1042, agosto de 2001.
- PEREIRA, O.A.P.; CARVALHO, R.V.; CAMARGO, L.E.A. Doenças do milho. In: **Manual de fitopatologia**, v.2, (H. KIMATI, L. AMORIM, J.A.M. REZENDE, A. BERGAMIN FILHO, L.E.A. CAMARGO) Eds. Editora Ceres, p. 477-488. 2005.
- PINTO, N.F.J.A. Eficiência de doses e intervalos de aplicação no controle da mancha foliar provocada por *Phaeosphaeria maydis* Rene, Payak & Renfro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n. 4, p. 1006-1009, 1999.
- PINTO, N.F.J.A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.1, p.134-138, 2004.
- RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M. and RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal Microbiology* 53: 802-808, 2007.
- SILVA, V.A.; CABRAL, J.S.R.; SOUSA, D.S.; LIMA, R.E.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; CASELA, C.R.; MEIRELLES, W.F. & PEREIRA, F.C. Pinta branca do milho. In: **Congresso Nacional de milho e sorgo** - Workshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho (CD ROM), Londrina-PR, 2008.
- SAWAZAKI, E.; DUDIENAS, C.; PATERNIANI, E.A.G.Z.; GALVÃO, J.C.C.; CASTRO, J.L. & PEREIRA, J. Reação de cultivares de milho à mancha de *Phaeosphaeria* no estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 585-589, junho de 1997.
- SOUZA, J.C. de. & DUARTE, J.M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis*. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras /MG, v.26, n.2, p. 325-331, março/abril, 2002.
- RENE, M.S.; PAYAK, M.M.; RENFRO, B.L. The *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Phytopathological Society Bulletin**. New Delphi, Indian, v.3, p. 7-10, 1965.
- STEWART, F.C. A bacterial disease of sweet corn. *Agric. Exp. STN. Bull*, New York 130:422-439.

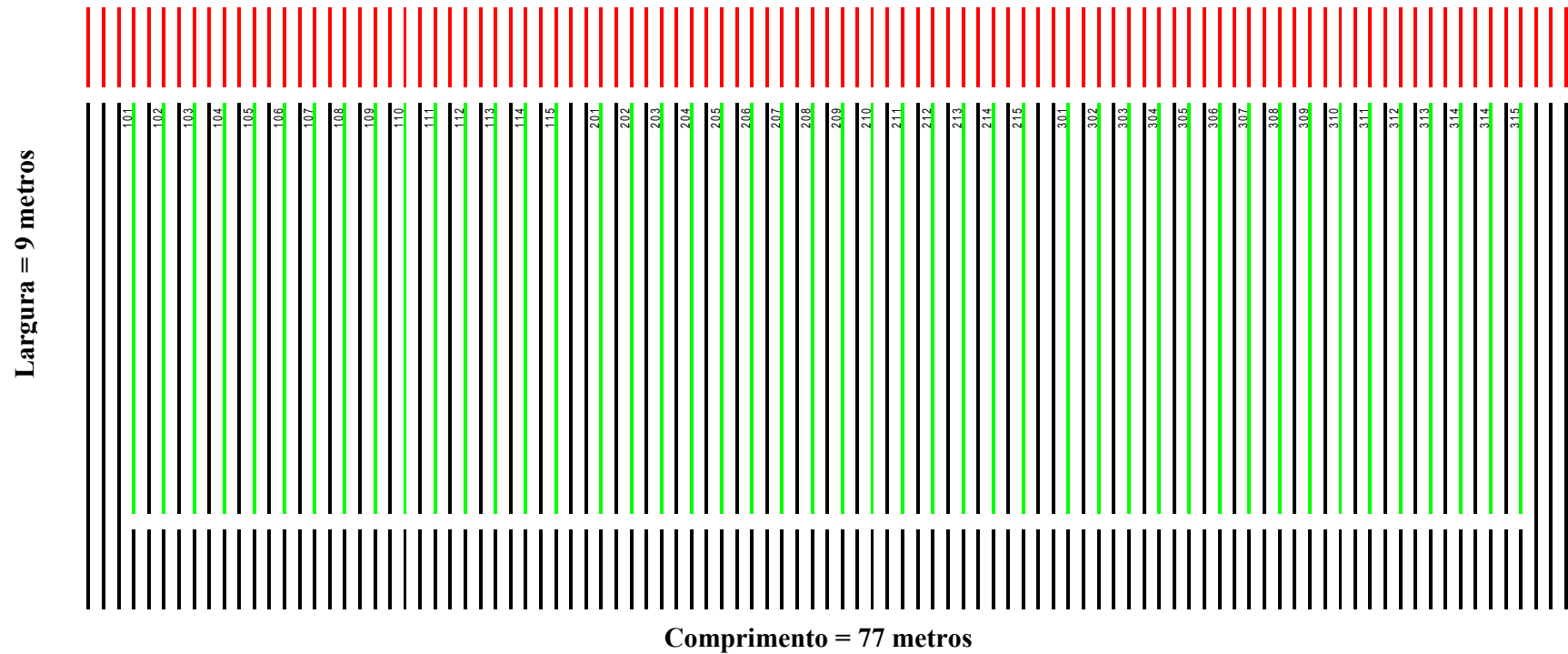
## Anexo1

Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha branca do milho segundo Agroceres (1996).



## Anexo 2

### Croqui Experimento Mancha Branca do Milho



Linhas vermelhas = Fonte de inóculo composta do genótipo Dow 657 – linhas com 1,10 metros

Linhas pretas = Genótipo resistente BRS 1010 como bordadura entre parcelas, divisão de blocos (2 linhas) e no perímetro do experimento

Linhas verdes = Parcelas experimentais compostas pelos genótipos de milho a serem testados

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)