

FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA

MANCHA-BRANCA DO MILHO: ETIOLOGIA E RESISTÊNCIA DE  
GENÓTIPOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L297m  
2009

Lanza, Fabrício Eustáquio, 1983-

Mancha-branca do milho: etiologia e resistência de  
genótipos / \c Fabrício Eustáquio Lanza. – Viçosa, MG,  
2009.

viii, 22f. : il. ; 29cm.

Orientador: Laércio Zambolim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 20-22.

1. Milho. 2. *Pantoea ananatis*. 3. Mancha-branca do milho.  
4. Milho - Doenças e pragas. 5. *Zea mays*. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.15

FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA

MANCHA-BRANCA DO MILHO: ETIOLOGIA E RESISTÊNCIA DE  
GENÓTIPOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de Julho de 2009.



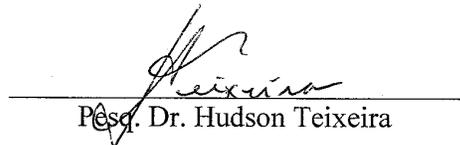
Pesq. Dr. Carlos Roberto Casela  
(Co-orientador)



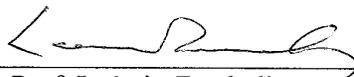
Pesq. Dr. Luciano Viana Cota



Prof. José Ivo Ribeiro Júnior



Pesq. Dr. Hudson Teixeira



Prof. Laércio Zambolim  
(Orientador)

*'Quem decidir se colocar como juiz da Verdade e do Conhecimento é naufragado pela gargalhada dos deuses'*

**(Albert Einstein)**

Aos meus pais, Luciene e José Eustáquio

Aos meus queridos irmãos, Henrique e Juliane

que sempre acreditaram em mim,

**dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado a vida e por ter colocado pessoas tão especiais na minha caminhada.

Aos meus pais Luciene e José Eustáquio que me deram muita força para continuar lutando em busca dos meus objetivos. Aos meus irmãos Henrique e Juliane por acreditar em mim.

A toda minha família, que mesmo distantes sempre foram importantes em todos os momentos da minha caminhada me dando muito carinho e força. Agradeço também a compreensão pelos momentos em que estive ausente das reuniões familiares e pelo orgulho das minhas conquistas.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade em realizar este curso.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Laércio Zambolim, pela orientação, confiança e conhecimentos transmitidos.

Ao meu co-orientador Dr. Carlos Roberto Casela, por acreditar em meu potencial, pela oportunidade, pelos conhecimentos transmitidos e, especialmente, pela alegre convivência.

Aos pesquisadores da EMBRAPA/Milho e Sorgo Dr. Rodrigo Veras da Costa e Dr. Luciano Viana Cota, que muito contribuíram para a realização dos trabalhos e ensinamentos sobre a cultura do milho. Agradeço também pela valiosa ajuda na redação do artigo, amizade, companheirismo e convívio.

Ao Ubiraci, pela ajuda e esclarecimentos quanto ao seqüenciamento e identificação da bactéria.

Ao Dr. Décio Karam pelo espaço cedido em seu laboratório.

Aos meus amigos do laboratório da EMBRAPA/Milho e Sorgo Clovis, Dagma, Igor, Eduardo e Elaine que me ajudaram na condução dos experimentos. Agradeço também pela amizade, companheirismo e alegre convívio.

A EMBRAPA/Milho e Sorgo, pelo material cedido, espaço físico e recursos humanos, possibilitando a realização deste trabalho. Agradeço também a todas as pessoas que ali trabalham, em especial ao José Moreira e Reinaldo que foram essenciais, competentes e altamente profissionais na condução dos experimentos, agradeço também pelo companheirismo, amizade e convívio.

Aos pesquisadores da EMBRAPA/Milho e Sorgo Dr. Lauro José Moreira Guimarães e Dr. Paulo Evaristo, pela ajuda na escolha e outras informações dos genótipos utilizados.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos amigos do laboratório, pelo convívio agradável. Em especial ao Henrique da Silva Silveira Duarte, Sérgio Milagres, Antonio Fernando, Ueder Lopes, Danival Ricardo, Jonas Rios, Pedro Nery, José Cláudio, Antônio Fernandes, Josuel Tereza, Luis Felipe, Uilton Lopes, Alessandro Nicoli, Tiago Lelis e Bruno.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA, filho de Luciene Maria de Sousa Lanza e José Eustáquio Lanza, nasceu em Sete Lagoas, Minas Gerais, em 23 de Janeiro de 1983.

Em julho de 2002, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Estadual de Montes Claros, graduando-se em 13 de julho de 2007.

Em agosto de 2007, iniciou no Programa de Pós-graduação, a nível de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em 27 de Julho de 2009.

## SUMARIO

<b>RESUMO</b> _____	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> _____	<b>viii</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> _____	<b>1</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> _____	<b>4</b>
Etiologia da Mancha Branca do Milho_____	<b>4</b>
Reação de genótipos de milho a Mancha Branca e dispersão do agente causal_____	<b>6</b>
Dados meteorológicos_____	<b>8</b>
<b>RESULTADOS</b> _____	<b>8</b>
Teste de Patogenicidade e identificação do microorganismo_____	<b>8</b>
Reação de genótipos de milho a Mancha Branca e dispersão do agente causal_____	<b>9</b>
<b>DISCUSSÃO</b> _____	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	<b>20</b>

## RESUMO

LANZA, Fabrício Eustáquio. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Mancha-branca do milho: Etiologia e resistência de genótipos.** Orientador: Laércio Zambolim. Co-orientadores: Carlos Roberto Casela e Olinto Liparini Pereira.

Este trabalho objetivou confirmar o agente causal da mancha-branca do milho, obter informações preliminares sobre a dispersão do patógeno e caracterizar a reação de genótipos de milho a doença. Para o estudo etiológico, isolados foram obtidos de lesões de mancha-branca em fase de anasarca, resultando em desenvolvimento de colônias bacterianas. Híbridos de milho, BRS2022, BRS1010, 1D2195, BRS1040, BRS1035, BRS1031, BRS3025, BRS1030, 2B710 e P30F35 e as linhagens L3, L228-3, 521274, 521236 e 262841-1-4-1 foram avaliados sob epidemia natural em delineamento de blocos ao acaso e três repetições. Os cultivares foram plantados em fileiras de cinco metros, separadas por uma linha do híbrido resistente BRS1010. A cortina suscetível (fonte de inóculo) formada pelo híbrido DAS657, foi plantada na parte frontal de cada bloco, afastada 0,5 m. A severidade da doença foi avaliada em intervalos semanais a partir dos 60 dias do plantio, utilizando uma escala de 1 a 9, onde: 1= sem doença e 9= 100% de área foliar afetada. As avaliações foram realizadas em 6 pontos dentro da parcela afastados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 metros da fonte de inóculo. Os dados de severidade foram usados para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), severidade da doença na metade da epidemia ( $Y_{50}$ ), severidade da doença no final da epidemia ( $Y_{máx}$ ), e taxa de progresso da doença. Com inoculações em híbrido suscetível DAS657, em casa de vegetação, foi possível reproduzir os sintomas típicos da doença. Reisolamento a partir dessas lesões confirmou a presença da mesma bactéria isolada do campo, identificada como *Pantoea ananatis*, corroborando relatos do envolvimento desta bactéria nos sintomas iniciais da doença. Não foi observada a formação de um gradiente de dispersão baseado na severidade da doença observada em cada ponto de avaliação dentro da parcela. A melhor distinção entre os níveis de resistência de genótipos de milho foi obtida pelos valores de AACPD e  $Y_{máx}$ . Os híbridos de milho BRS1030, BRS1035 e BRS1010 e as linhagens L3, e L228-3 foram os genótipos mais resistentes. Essas linhagens podem ser usadas em programas de melhoramento visando resistência a mancha-branca.

## ABSTRACT

LANZA, Fabrício Eustáquio. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **White spot of the corn: etiology and resistance of genotypes.** Adviser: Laércio Zambolim. Co-advisers: Carlos Roberto Casela and Olinto Liparini Pereira.

The main objectives of this work were to identify the causal agent of the maize White Spot, to obtain preliminary information on the disease dispersal in the field and to characterize the reaction of maize hybrids and inbreds to the disease. For the etiological studies, isolations were performed from white spot lesions the anasarca phase, resulting in the development of bacterial colonies. Maize hybrids BRS2022, BRS1010, 1D2195, BRS1040, BRS1035, BRS1031, BRS3025, BRS1030, 2B710 e P30F35 and inbred lines L3, L228-3, 521274, 521236 e 262841-1-4-1 were evaluated under natural epidemic in a randomized block design with three replications. Cultivars were planted in single row plots, separated by two rows of the resistant hybrid BRS1010. Spreader rows were formed by planting the susceptible genotype DAS657 0,5 m apart and in front of each block. Disease severity was evaluated at a weekly interval starting 60 days after planting, through a 1 to 9 scale of disease severity where 1= no disease and 9= 100% of leaf area affected. Ratings were taken at three different locations within each plot: 1, 2, 3, 4, 5 and 6 meters inoculum source. Data were used for the calculation of the area under disease progress curve (AUDPC), disease severity at 50% of epidemic development ( $Y_{50}$ ), disease severity at the end of the epidemic, and the rate of disease progress. Inoculations on the susceptible hybrid DAS657, in the greenhouse, reproduced the typical symptoms of the disease. Re-isolations from these lesions confirmed the presence of the same bacteria isolated from the field, which identified as *Pantoea ananatis*, confirming previous reports on the involvement of this bacteria in the initial lesions of this disease. No disease gradient was observed based on the disease severity observed in each point of evaluation within each plot. A better distinction between the level of resistance of maize genotypes was obtained through AUDPC and  $Y_{m\acute{a}x}$  values. Maize hybrids BRS1030, BRS1035 and BRS1010 and inbreds L3, and L228-3 were the most resistant genotypes. These inbred lines may be useful in breeding programs for resistance to maize white spot.

## 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 agrônomo, tanto em área plantada quanto em produtividade. No Brasil (3º maior produtor mundial), 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. 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, estão as doenças que 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 têm 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. Algumas técnicas de manejo, como práticas culturais (Pegoraro *et al.*, 2001, Oliveira *et al.* 2004) e o controle químico (Pinto, 1999; Pinto, 2004; Costa, 2008) tem comprovada eficácia no controle dessas doenças, mas ainda assim o uso de cultivares resistentes continua sendo o

método de controle mais viável. Sendo assim, torna-se necessária a avaliação de materiais resistentes a doenças, para melhor se proceder à recomendação de cultivares (Pereira *et al.*, 2005; Fernandes & Oliveira, 1997; Sawazaki *et al.*, 1997).

Dentre as doenças que afetam o milho, a mancha-branca, primeiramente descrita por Rane *et al.* (1965) na Índia e posteriormente por Carson & Goodman (1991) nos Estados Unidos como mancha foliar de *Phaeosphaeria*, destaca-se como uma das mais importantes. Em estudos realizados no Brasil sobre a etiologia da doença, dificuldades foram encontradas na reprodução dos sintomas causados por *Phaeosphaeria maydis*, bem como de outros fungos obtidos das lesões (Sawazaki *et al.*, 1997; Paccola-Meirelles *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004; Bomfeti *et al.* 2008). Paccola-Meirelles *et al.* (2001) relataram o envolvimento da bactéria *Pantoea ananatis* na etiologia da mancha branca do milho no Brasil. Testes de patogenicidade e reisolamento do patógeno a partir de lesões produzidas por inoculações artificiais em casa de vegetação (Postulados de Koch) confirmaram o envolvimento desta 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 (1985), que consideraram ser uma bactéria, com características sintomatológicas muito semelhantes à *P. ananatis*, então denominada de *Pseudomonas syringae*, o agente causal da doença. Ainda assim, alguns autores defendem a hipótese de que outros organismos estejam envolvidos na etiologia da Mancha Branca. Amaral *et al.* (2004), isolaram em 70% das lesões da mancha-branca o fungo *Phoma sorghina* e o consideraram o agente etiológico de mancha foliar em milho. Posteriormente, Amaral *et al.* (2005) relataram o envolvimento de três fungos (*Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp.) como causadores de sintomas similares aos da Mancha Branca no Brasil. Fantim (2009) defende a hipótese de que *Phaeosphaeria maydis* é o verdadeiro agente causal da mancha-branca, após ter realizado isolamentos e teste de patogenicidade com o referido fungo.

Os sintomas da mancha-branca caracterizam-se pela presença de anasarcas circulares, aquosas e verde-claras. Posteriormente formam-se lesões necróticas, de cor palha, circulares a elípticas, com diâmetro variando de 0,3 a 1,0 cm, geralmente 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. Normalmente não são observados sintomas em plântulas de milho. Sob condições de ataque severo, os sintomas da doença podem ser observados também na palha da espiga. Podendo ocorrer também 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).

As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença envolvem umidade relativa do ar acima de 60% e temperaturas noturnas em torno de 14 °C, razão pela qual ela 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, 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 *et al.* (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 do ar for elevada, preferencialmente com água livre na superfície da folha, associada a temperaturas moderadas. Estas condições climáticas são comumente encontradas em regiões acima de 600 m de altitude (Pereira *et al.* 2005).

A doença é endêmica no Brasil e sua incidência e severidade têm aumentado significativamente a partir de 1990, podendo ser encontrada hoje em praticamente todas as regiões onde o milho é cultivado (Fernandes & Oliveira, 1997; Fantin, 1994). A doença

geralmente aparecia no final do ciclo da cultura, mas tem afetado plantas mais jovens, podendo levá-las à seca prematura (Balmer & Pereira, 1987). Folhas com 10-20% de severidade apresentam redução na taxa fotossintética líquida de 40%, resultando em queda na produção de grãos de cerca de 60% (Godoy *et al.* 2001). Essa correlação negativa significativa entre a produção 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 como alternativa eficiente, viável, segura e de menor impacto ambiental para o manejo desta enfermidade (Sawazaki *et al.* 1997; Pereira *et al.* 2005, Fidelis *et al.* 2007). Contudo, devido a dúvidas ainda existentes sobre a etiologia da doença e a falta de estudos sobre o modo de dispersão do agente causal, que têm prejudicado a escolha de medidas corretas de manejo da mancha-branca, é que se faz necessário a realização de trabalhos nestes sentidos.

Sendo assim, o presente trabalho objetivou identificar e comprovar o agente causal da mancha-branca, bem como, estudar a dispersão do patógeno e caracterizar a reação de híbridos comerciais e linhagens de milho à doença em condições de campo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Etiologia da Mancha Branca do milho**

Este trabalho foi realizado no laboratório de fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo – EMBRAPA, localizado em Sete Lagoas/MG. Folhas de milho

com lesões em estágios iniciais foram coletadas, levadas ao laboratório e lavadas com sabão neutro, secas em condição ambiente. Para o isolamento do microrganismo foram utilizados fragmentos de lesões em estágio inicial (anasarca). No processo de esterilização superficial, os fragmentos foram submetidos ao tratamento com álcool a 70% por 1 minuto, posteriormente com hipoclorito de sódio a 2% por 4 minutos, novamente, com álcool a 70% por 30 segundos e, finalmente, submetidos à tríplex lavagem em água esterilizada, a intervalos de 30 segundos entre cada. A água da última lavagem foi plaqueada em meio TSA (tryptic soy agar) e BDA (batata dextrose agar), para confirmação do procedimento de desinfestação. Os fragmentos foram então transferidos para placas com meio TSA. O controle foi feito como descrito acima, utilizando fragmentos de folhas assintomáticas. Por meio desta metodologia de isolamento obteve-se alta frequência de uma colônia bacteriana lisa de coloração amarelada.

Para a obtenção do inóculo, a bactéria obtida com descrito no item anterior foi cultivada em meio TSB (tryptic soy broth) e incubada em agitador por 12h a 30°C/90 rpm. Em seguida, 1 ml desse pré inóculo foi transferido para 100 ml de meio TSB e incubado em agitador por 4h a 30°C/90 rpm. A esse inóculo foi acrescida uma solução salina 0,85% (NaCl 1M) na proporção 1:1. Imediatamente antes da inoculação, o inóculo foi ajustado para aproximadamente  $10^6 - 10^8$  UFC/mL através de espectrofotômetro. As inoculações foram realizadas em plantas de milho do híbrido suscetível DAS657 no estágio V6, cultivadas em vasos de cinco litros e mantidas em casa de vegetação; antes da inoculação as plantas foram colocadas em câmara úmida por 12 horas. Posteriormente a suspensão foi pulverizada sobre a superfície abaxial e adaxial das folhas, previamente friccionadas com auxílio de uma esponja de lavar louça, para obtenção de ferimentos leves. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por mais 12h, finalizando o processo de inoculação (Paccola-Meirelles *et al.*, 2001).

A bactéria purificada foi submetida à técnica de amplificação e seqüenciamento da região 16S do gene rDNA, a seqüência de nucleotídeos obtida foi editada e comparada com seqüências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast N (Altschul *et al.*, 1997).

### **Reação de genótipos de milho a Mancha Branca e dispersão do agente causal**

O ensaio foi conduzido no campo experimental do Centro Nacional de pesquisa de Milho e Sorgo – EMBRAPA, localizado em Sete Lagoas/MG. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com, com 15 tratamentos e 3 repetições. Foi plantado o híbrido suscetível DAS657, na parte frontal do experimento que foi considerada como fonte de inóculo, e no restante do perímetro da área, foi plantado o híbrido BRS1010 considerado resistente. No interior da área, foram avaliados os híbridos 1 - BRS2022, 2 - BRS1010, 3 - 1D2195, 4 - BRS1040, 5 - BRS1035, 6 - BRS1031, 7 - BRS3025, 8 - BRS1030, 9 - 2B710 e 10 - P30F35E e as linhagens 11 - L3, 12 - L228-3, 13 - 521274, 14 - 521236 e 15 - 262841-1-4-1 (Tabela 1). Entre as parcelas experimentais, que foram compostas de uma linha de 5 metros de cada material, foi plantada uma linha de 5 metros do híbrido resistente BRS1010. O experimento foi plantado em espaçamento 0,8 entre linhas com 5 plantas por metro, em duas épocas, 03/12/2008 e 27/01/2009 correspondendo a época 1 e época 2 respectivamente, seguindo as praticas de adubação e irrigação recomendados para a cultura do milho.

Avaliou-se a severidade da doença, por meio de incidência natural do patógeno, através da escala de notas com valores variando de 1 a 9, onde 1 = 0%; 2 = 1%; 3 = 10%; 4 = 20%; 5 = 30%; 6 = 40%; 7 = 60%; 8 = 80%; 9 = 100% 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. As avaliações foram feitas semanalmente, iniciando a partir do aparecimento dos primeiros sintomas, o que coincidiu aproximadamente, com 60

dias após o plantio. Estas seguiram até o final do ciclo da cultura, totalizando nove avaliações. Utilizou-se a média da severidade das seis plantas de cada parcela nas análises estatísticas. Estimaram-se os valores de severidade da Mancha Branca na metade da epidemia, severidade média ( $Y_{50}$ ), e a severidade ao final da epidemia, severidade máxima ( $Y_{máx}$ ). Calculou-se também a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

Aos dados de progresso, ajustaram-se os modelos monomolecular, logístico e de Gompertz, por meio de regressão não linear (Campbell & Madden, 1990). Para seleção do melhor modelo, adotaram-se os critérios: menor valor do quadrado médio do resíduo e maior valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), além da normalidade e homogeneidade de resíduo.

Os valores de  $Y_{50}$ ,  $Y_{máx}$  e AACPD foram submetidos à análise de variância (ANOVA), comparados pelo teste de Fisher LSD a 5% de probabilidade. Foram obtidas também as estimativas das taxas de progresso da doença ( $r$ ) para cada genótipo, obtidas por meio da regressão e comparadas por meio do intervalo de confiança a 95% de probabilidade (Campbell & Madden, 1990). Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS System versão 8.0.

Com intuito de se obter informações sobre a dispersão do agente causal da mancha branca do milho em condições de campo, foram avaliadas seis plantas dentro de cada parcela, dispostas a 1, 2, 3, 4, 5 e 6 metros a partir da fonte de inóculo.

Os valores de severidade da doença de cada planta dentro de cada parcela foram utilizados para calcular a AACPD em cada ponto. Para comparação do gradiente de dispersão entre os diferentes genótipos foi realizada análise de regressão linear dos dados, onde foram plotados nos gráficos os dados de AACPD no eixo Y, e as diferentes plantas plotadas no eixo X.

**TABELA 1 – Híbridos de milho e linhagens progenitoras avaliadas para reação à Mancha Branca.**

<b>Genótipo</b>	<b>Parentais</b>
<b>BRS2022</b>	(L228-3XL2628411-4-1) X (L3XTR6DM25)
<b>BRS1010</b>	L3 X L228-3
<b>1D2195</b>	L3 X 521236
<b>BRS1040</b>	521274 X L228-3
<b>BRS1035</b>	L3 X 262841-1-8-2
<b>BRS1031</b>	L3 X 262841-1-4-1
<b>BRS3025</b>	(L3XTR6DM25) X (L228-3)
<b>BRS1030</b>	L3 X 202841-1-1-2
<b>2B710</b>	.
<b>P30F35</b>	.
<b>L3</b>	.
<b>L228-3</b>	.
<b>L521274</b>	.
<b>L521236</b>	.
<b>L262841-1-4-1</b>	.

### **Dados meteorológicos**

Durante a condução dos experimentos, obtiveram-se os valores médios de precipitação, umidade relativa e temperaturas máxima e mínima diárias, da estação meteorológica principal da Embrapa Milho e Sorgo, distante, aproximadamente, 800 m do local dos experimentos.

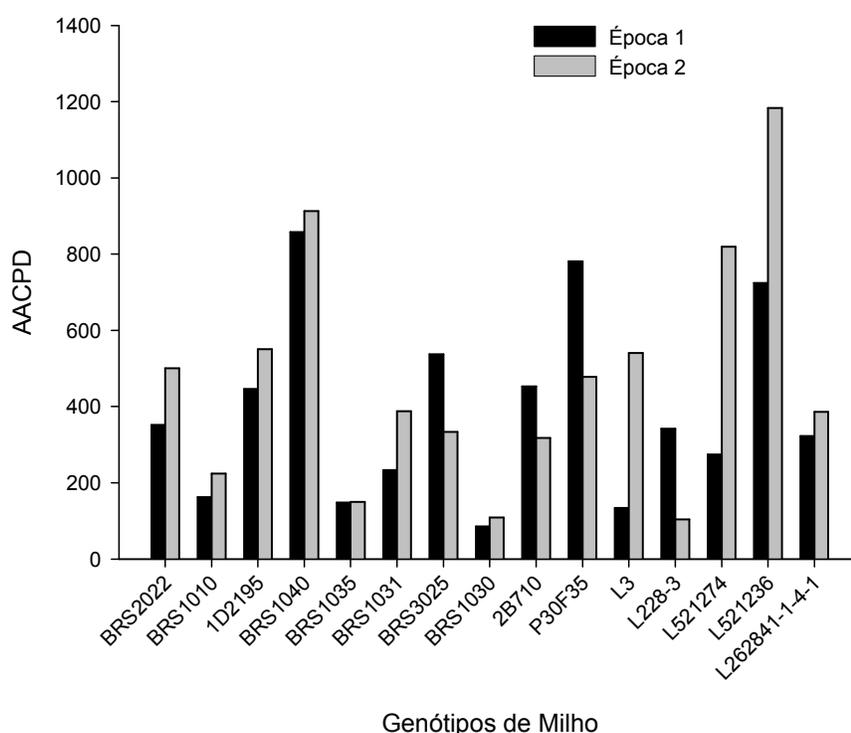
## **RESULTADOS**

### **Teste de patogenicidade e identificação do microorganismo**

Aproximadamente 12 horas após a inoculação, já era possível a observação das primeiras lesões tipo “anasarca”, decorridos 7 dias, as lesões já encontravam-se bem definidas, assumindo uma coloração “palha” assim como as lesões observadas em campo. Com o re-isolamento do mesmo organismo, foi confirmado que o agente causal da Mancha Branca do Milho é a referida bactéria. Por meio de técnicas moleculares, foi possível identificar uma bactéria com seqüência de similaridade igual a 99% com *Pantoea ananatis*.

## Reação de genótipos de milho a Mancha Branca e dispersão do agente causal

Para a maioria dos genótipos testados, maiores valores de severidade da Mancha Branca foram encontrados no plantio da época 2. As médias gerais de AACPD dos genótipos foram de 390,44 e 466,68 para as épocas 1 e 2, respectivamente (Figura 1). O aumento da AACPD coincidiu com diminuição da temperatura mínima média diária entre as épocas de plantio (19,44°C e 17,42°C, médias das épocas 1 e 2 respectivamente), onde a umidade relativa média manteve-se em torno de 75% (Figura 2 e 3).



**FIG. 1 – Área abaixo da curva de progresso da Mancha Branca de 15 genótipos em duas épocas de plantio.**

No plantio de safra, os híbridos BRS1030, BRS1035, BRS1031, BRS1010 e as linhagens L3 e L521274 apresentaram os menores valores de AACPD ( $P < 0,05$ ). No plantio safrinha, os genótipos BRS1030, BRS1035, BRS1010, BRS3025, 2B710 e L228-3, foram os que apresentaram os menores valores de AACPD ( $P < 0,05$ ). Analisando os plantios da época 1

e 2 foi possível inferir que os híbridos BRS1030, BRS1035 e BRS1010 foram os mais resistentes, apresentando os menores valores de AACPD (Tabela 2).

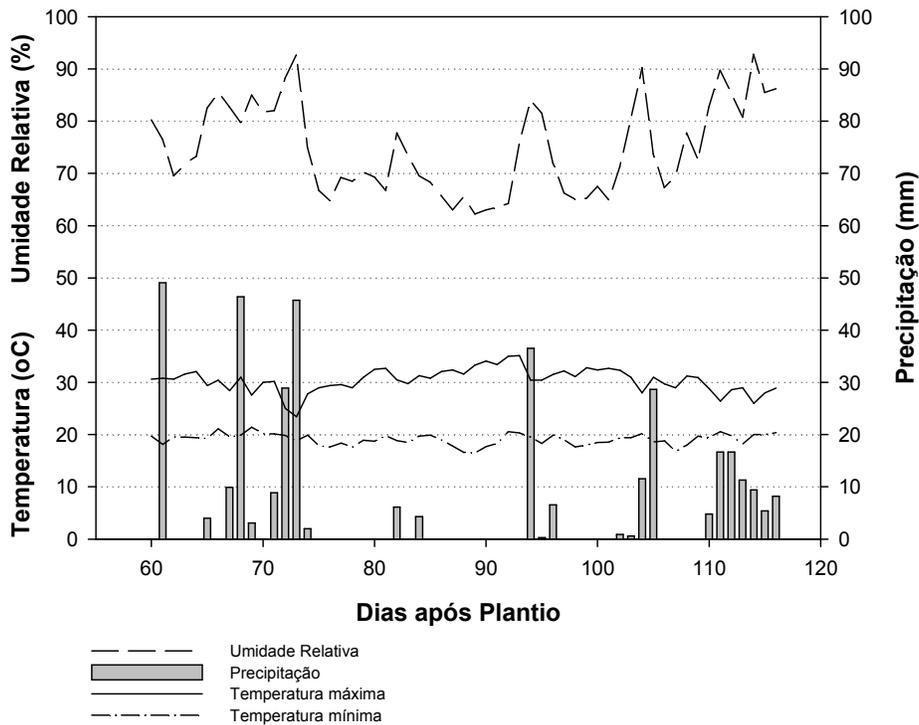
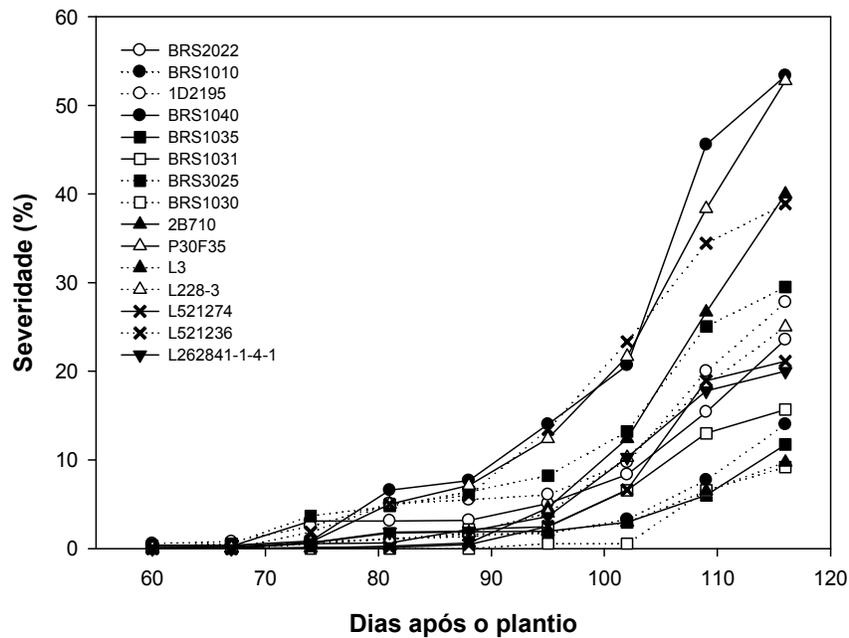
Os genótipos diferiram entre si ( $P < 0,05$ ), quanto a severidade nas variáveis  $Y_{50}$  (88 dias após plantio) e  $Y_{máx}$  (116 dias após plantio), tanto para a época 1 quanto a 2 (Tabela 2). Considerando o plantio da época 1, os genótipos BRS1030, 2B710 e L521274 obtiveram os menores valores de  $Y_{50}$  não diferindo entre si ( $P > 0,05$ ). No plantio da época 2, os genótipos BRS1030, 2B710, BRS1035, BRS1010, L228-3 e L262841-1-4-1 foram os que obtiveram os menores valores de  $Y_{50}$ . Valores mais baixos de  $Y_{50}$ , analisando juntamente as épocas 1 e 2, foram obtidos pelo genótipo BRS1030 seguido do 2B710. Em se tratando do  $Y_{máx}$  na época 1, os genótipos BRS1030, BRS1031, BRS1035, BRS1010 e L3, obtiveram os menores valores. Já na época 2, os genótipos BRS1030, BRS1035, BRS1010, BRS3025 e L228-3 foram os que apresentaram os menores valores de  $Y_{máx}$ , não diferindo entre si. Analisando  $Y_{máx}$ , nas época de plantio 1 e 2, os genótipos BRS1030, BRS1035 e BRS1010, se destacaram obtendo os menores valores. Tanto para AACPD,  $Y_{50}$  e  $Y_{máx}$ , época 1 e 2, os genótipos BRS1040 e L521236 apresentaram valores significativamente superiores aos demais ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 2 – Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD), severidade de doença aos 88 ( $Y_{50}$ ) e aos 116 dias ( $Y_{máx}$ ) após o plantio, nas diferentes safras, em diferentes genótipos de milho.**

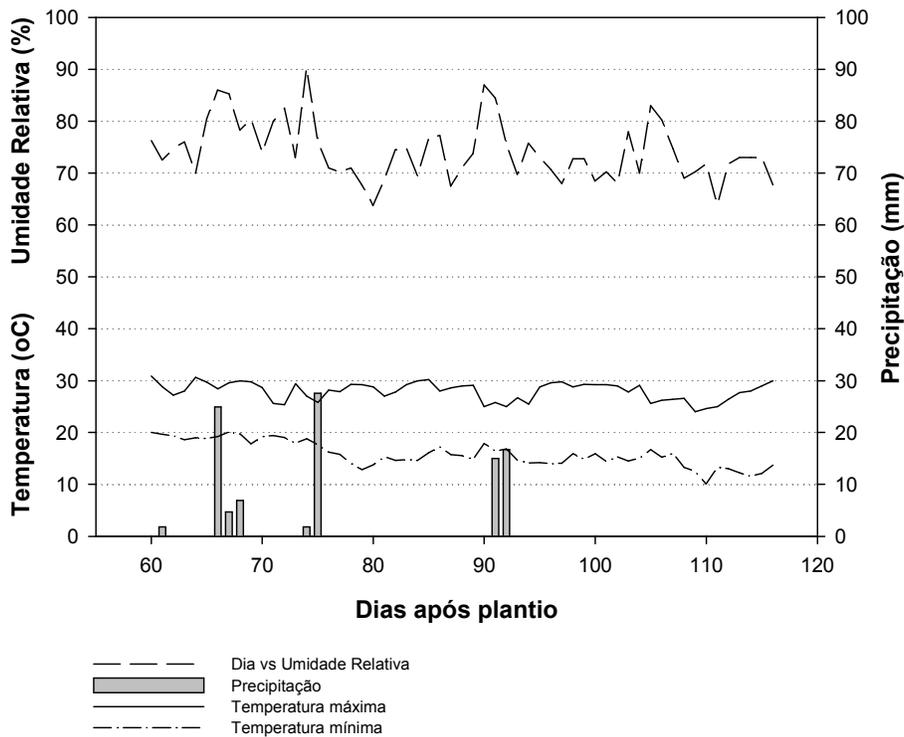
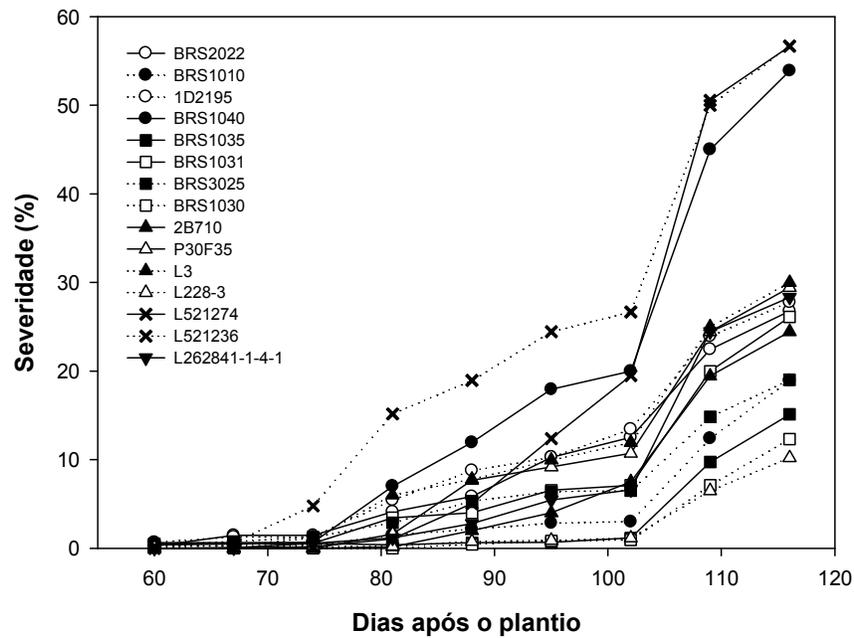
Genótipo	Saфра			Safrinha		
	AACPD*	$Y_{50}$ *	$Y_{máx}$ *	AACPD*	$Y_{50}$ *	$Y_{máx}$ *
BRS1030	85,75 a	0,00 a	0,304 a	108,69 a	0,066 a	0,356 a
L3	134,36 ab	0,113 bc	0,308 a	540,75 d	0,272 def	0,579 d
BRS1035	148,94 abc	0,127 bc	0,349 ab	150,30 ab	0,077 ab	0,394 ab
BRS1010	162,36 abc	0,119 bc	0,383 abc	224,58 abc	0,135 abc	0,448 abc
BRS1031	233,14 abc	0,139 bcd	0,397 abc	387,91 bcd	0,191 bcde	0,536 cd
L521274	274,94 abcd	0,061 ab	0,474 cd	819,77 ef	0,224 cde	0,853 e
L262841-1-4-1	322,77 bcd	0,137 bcd	0,461 bcd	386,55 bcd	0,155 abcd	0,561 cd
L228-3	342,02 bcde	0,131 bc	0,522 d	104,41 a	0,078 ab	0,323 a
BRS2022	352,33 cde	0,175 cde	0,505 cd	500,89 cd	0,236 cdef	0,536 cd
1D2195	446,44 de	0,235 de	0,553 de	550,66 de	0,293 ef	0,555 cd
2B710	452,47 de	0,074 ab	0,684 f	317,33 abcd	0,133 abc	0,517 bcd
BRS3025	537,44 ef	0,254 e	0,572 def	333,66 abcd	0,209 cde	0,450 abc
L521236	724,69 fg	0,241 e	0,672 ef	1183,58 g	0,447 g	0,855 e
P30F35	781,27 g	0,259 e	0,813 g	478,33 cd	0,269 def	0,573 cd
BRS1040	857,69 g	0,264 e	0,819 g	912,91 fg	0,347 fg	0,824 e

\*medias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Fisher LSD ( $\alpha=0,05$ ). Para análise de  $Y_{50}$  e  $Y_{máx}$ , os valores foram submetidos à transformação angular: arco seno ( $\sqrt{\text{severidade}/100}$ ).

As Figuras 2 e 3 mostram as curvas de progresso da Mancha Branca para os diferentes tratamentos ao longo dos períodos de cultivo do milho (épocas 1 e 2), de dezembro a maio de 2008/2009. Os híbridos BRS1030 e BRS1035, apresentaram um menor progresso da Mancha Branca durante todo o ciclo da cultura, levando em consideração as duas épocas de plantio. A severidade da doença manteve-se abaixo de 8,87% e 12,56% para o híbrido BRS1030, e 11,51% e 15,22% para o híbrido BRS1035, épocas 1 e 2, respectivamente. Já as linhagens L3 na época 1 e L228-3 na época 2 se destacaram por manter a severidade da doença abaixo de 9,72% e 10,22%, respectivamente. Foi possível notar que houve maior desenvolvimento da doença a partir de 102 dias após o plantio, o que coincide aproximadamente entre a fase de florescimento e enchimento de grãos para a maioria dos genótipos testados. Maior progresso da Mancha Branca ocorreram no híbrido BRS1040, seguido da linhagem L521236, isso, considerando conjuntamente épocas 1 e 2.



**FIG. 2 – A. Progresso da Mancha Branca (*Pantoea ananatis*) no diferentes genótipos de milho (*Zea mays*) na época 1.  
 B. Variáveis climáticas: temperaturas máxima e mínima diária, umidade relativa média e precipitação acumulada diária, na época 1.**



**FIG. 3 – A. Progresso da Mancha Branca (*Pantoea ananatis*) no diferentes genótipos de milho (*Zea mays*) na época 2.  
 B. Variáveis climáticas: temperaturas máxima e mínima diária, umidade relativa média e precipitação acumulada diária, na época 2.**

Obeve-se melhor ajuste dos dados de progresso da doença com o modelo monomolecular (regressão não linear). Em relação a taxa de progresso, para a maioria das comparações entre os genótipos, não houve diferença significativa, tanto para época 1 quanto para época 2 (Tabela 3). Considerando o genótipo que apresentou menores valores de AACPD,  $Y_{50}$  e  $Y_{máx}$ , época 1, o híbrido BRS1030 apresentou diferença ( $P < 0,05$ ) com relação a taxa de progresso ( $r$ ), somente em comparação com os genótipos L521236 e o BRS3025. Levando-se em consideração a época 2, o mesmo genótipo diferenciou da maioria dos genótipos, sendo igual aos genótipos BRS1010, BRS1035, 2B710, L228-3 e L262841-1-4-1.

**TABELA 3 – Comparação dos genótipos através do cálculo dos intervalos de confiança para a diferença das taxas médias de progresso (r) da Mancha Branca do milho.**

Genótipo	14	3	1	11	4	7	10	13	6	15	9	2	5	12	8
14	0	0,0052 ns	0,0180 ns	0,0236 ns	0,0258 ns	0,0278 ns	0,0382 ns	0,0446 ns	0,0472*	0,0594 ns	0,0716*	0,081 ns	0,1098*	0,1124*	0,1564*
3	0,0320 ns	0	0,0128 ns	0,0184 ns	0,0206 ns	0,0226 ns	0,0330 ns	0,0394 ns	0,0420*	0,0542 ns	0,0664*	0,0758 ns	0,1046*	0,1072*	0,1512*
1	0,0272 ns	0,0048 ns	0	0,0056 ns	0,0078 ns	0,0098 ns	0,0202 ns	0,0266 ns	0,0292 ns	0,0414 ns	0,0536 ns	0,0630 ns	0,0918*	0,0944*	0,1384 ns
11	0,011 ns	0,0210 ns	0,0162 ns	0	0,0022 ns	0,0042 ns	0,0146 ns	0,0210 ns	0,0236 ns	0,0358 ns	0,048 ns	0,0574 ns	0,0862*	0,0888*	0,1328 ns
4	0,0368 ns	0,0048 ns	0,0096 ns	0,0258 ns	0	0,0020 ns	0,0124 ns	0,0188 ns	0,0214 ns	0,0336 ns	0,0458 ns	0,0552 ns	0,0840*	0,0866*	0,1306 ns
7	0,0696*	0,0376 ns	0,0424 ns	0,0586*	0,0328 ns	0	0,0104 ns	0,0168 ns	0,0194 ns	0,0316 ns	0,0438 ns	0,0532 ns	0,0820 ns	0,0846*	0,1286 ns
10	0,0194 ns	0,0126 ns	0,0078 ns	0,0084 ns	0,0174 ns	0,0502 ns	0	0,0064 ns	0,0090 ns	0,0212 ns	0,0334 ns	0,0428 ns	0,0716 ns	0,0742*	0,1182 ns
13	0,0564*	0,0244 ns	0,0292 ns	0,0454*	0,0196 ns	0,0132 ns	0,0370 ns	0	0,0026 ns	0,0148 ns	0,0270 ns	0,0364 ns	0,0652 ns	0,0678 ns	0,1118 ns
6	0,1672*	0,1352*	0,1400*	0,1562*	0,1304*	0,0976 ns	0,1478*	0,1108*	0	0,0122 ns	0,0244 ns	0,0338 ns	0,0626 ns	0,0652*	0,1092 ns
15	0,0518*	0,0198 ns	0,0246 ns	0,0408*	0,0150 ns	0,0178 ns	0,0324 ns	0,0045 ns	0,1154*	0	0,0122 ns	0,0216 ns	0,0504 ns	0,0530 ns	0,0970 ns
9	0,0752*	0,0432 ns	0,0480*	0,0642*	0,0384 ns	0,0056 ns	0,0558 ns	0,0188 ns	0,0920 ns	0,0234 ns	0	0,0094 ns	0,0382 ns	0,0408 ns	0,0848 ns
2	0,0226 ns	0,0094 ns	0,0046 ns	0,0116 ns	0,0142 ns	0,0470 ns	0,0031 ns	0,0338 ns	0,1446*	0,0292 ns	0,0526*	0	0,0288 ns	0,0314 ns	0,0754 ns
5	0,1622*	0,1302*	0,1350*	0,1512*	0,1254*	0,0926 ns	0,1428*	0,1058 ns	0,0050 ns	0,1104 ns	0,0870 ns	0,1396*	0	0,0026 ns	0,0466 ns
12	0,1122*	0,0802*	0,0850*	0,1012*	0,0754*	0,0426 ns	0,0928*	0,0558 ns	0,0550 ns	0,0604 ns	0,0370 ns	0,0896*	0,0500 ns	0	0,044 ns
8	0,1888*	0,1568*	0,1616*	0,1778*	0,1520*	0,1192 ns	0,1694*	0,1324*	0,0216 ns	0,1370*	0,1136 ns	0,1662*	0,0266 ns	0,0766 ns	0

ns – Diferença não significativa de acordo com o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

\* - Diferença significativa de acordo com intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

\*\* - Valores acima da linha diagonal preenchida por zeros, referem-se a época 1, valores localizados abaixo, referem-se a época 2.

Com estudo da dispersão de *P. ananatis*, foi possível constatar que não houve a formação de um “gradiente de dispersão” entre a planta localizada mais próxima, e plantas mais afastadas da fonte de inóculo. Com o cálculo da AACPD em cada um dos seis pontos dentro da parcela, e aplicada a regressão linear, foi possível inferir que houve aleatoriedade nos níveis de severidade em cada ponto da parcela.

## DISCUSSÃO

A comprovação no presente trabalho de *P. ananatis* como agente causal da Mancha Branca, reforça os resultados obtidos por Paccola-Meirelles *et al.* (2001) que relataram o envolvimento dessa espécie bacteriana 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”. Posteriormente, Bomfeti *et al.* (2008), usando técnicas de microscopia eletrônica e ferramentas moleculares, como primers bacterianos para os genes 16S rDNA e *rpoB* e oligonucleotídeos universal para fungos (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 natural 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 (primer fúngico) 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). No processo de inoculação da bactéria, foi possível observar o aparecimento das anasarcas aproximadamente 12 horas após a inoculação, e evolução com formação de lesões circulares de coloração branca, após aproximadamente 6 dias.

Por meio da metodologia empregada para se estudar a dispersão do agente causal da Mancha Branca, não foi constatada a formação de gradiente de dispersão entre a planta mais próxima e a mais afastada da fonte de inóculo. Tal fato nos leva a suposição que outros fatores ainda não conhecidos sejam importantes na disseminação do patógeno, como restos de cultura e sementes, interferindo assim numa provável formação de um gradiente de dispersão a partir de uma fonte de inóculo na parte aérea, e até sugerir, como modo de controle da enfermidade o uso de sementes sadias. Rijavec *et al.* (2007), comprovou 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. Não se descarta a hipótese de que o agente causal sobreviva também nos restos de cultura (Oliveira *et al.*, 2004). É importante salientar que estudos mais específicos com parcelas maiores e melhor isolamento dessas, devem ser realizados, pois o tamanho da parcela pode não ter sido suficiente para a constatação do gradiente de dispersão e outros fatores podem estar envolvidos na disseminação da doença.

Os resultados obtidos nesse experimento são coerentes com os relatos existentes na literatura, no que diz respeito a diferenças na severidade da doença em função da época de plantio. A realização de plantios mais cedo, nos quais a fase de maior suscetibilidade das plantas não coincide com o período chuvoso, tem-se revelado um componente importante no manejo dessa doença (Oliveira *et al.* 2004). De acordo com Fernandes & Oliveira (1997), os plantios tardios, realizados a partir de novembro, em geral, permitem que a cultura se desenvolva sob altas precipitações pluviométricas, propiciando as condições adequadas para o

desenvolvimento de epidemias da doença. Segundo Sawazaki *et al.* (1997), a uniformidade de precipitação é o fator preponderante. Em trabalho realizado por Pegoraro *et al.* (2001), demonstrou-se que, a medida em que a semeadura do milho era retardada, houve aumento na severidade da doença; plantios realizados em setembro (primeira época de semeadura), resultaram em menores índices de mancha foliar. No entanto, é importante ressaltar que os experimentos foram irrigados por aspersão convencional de acordo com a evaporação do tanque classe A, o que pode ter mascarado uma possível desuniformidade de precipitação, já que houve uma diminuição na média de chuvas no período correspondente a época de plantio 2 (Figura 2 e 3).

O aumento da severidade da Mancha Branca coincidiu com a diminuição da temperatura mínima média registrada no período das avaliações (Figura 2 e 3). Este fato foi relatado em alguns estudos publicados anteriormente. Fernandes & Oliveira (1997) relataram que temperatura noturna em torno de 14°C é uma das condições favoráveis para o desenvolvimento de epidemias. Outro aspecto climático a ser considerado é a umidade relativa, que apresentou média de 75% durante todo o ciclo dos experimentos (Figura 2). Pereira *et al.* (2005) e Fernandes & Oliveira (1997), descreveram que a doença pode ser favorecida por umidade relativa acima de 60%, preferencialmente com água livre na superfície da folha.

Foram observadas diferenças entre os genótipos avaliados quanto ao nível de resistência a Mancha Branca. Linhagens com bons níveis de resistência têm sido registradas em trabalhos realizados com germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (Paccola-Meirelles *et al.*, 2002). Os híbridos BRS1030, BRS1010 e BRS1031 foram os que obtiveram os menores valores de severidade de Mancha Branca tanto no plantio da época 1 quanto no da época 2, podendo serem indicados como cultivares resistentes a doença. De acordo com os resultados obtidos no presente experimento, as linhagens L3, L228-3 seguidas da L262841-1-4-1, podem

ser indicadas para utilização em programas de melhoramento visando resistência a Mancha Branca, em função dos altos níveis de resistência demonstrados. Fato também observado no presente trabalho foi que nos híbridos resistentes citados acima, a linhagem L3 foi usada com “fêmea” no processo de formação desses, e provavelmente é a doadora de genes de resistência a Mancha Branca, para estes híbridos.

Houve maior desenvolvimento da doença a partir de 102 dias após o plantio, o que coincidiu aproximadamente com o período de florescimento e enchimento de grãos para a maioria dos genótipos testados, concordando com Oliveira *et al.* (2004), que relata, que os sintomas são mais severos após o pendoamento.

Mesmo sendo o modelo monomolecular o que melhor se ajustou aos dados, observou-se que tal ajuste não foi adequado, provavelmente pelo baixo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) apresentando. Com isso, a taxa de progresso não foi uma boa variável para se avaliar a reação dos genótipos, não distinguindo, por exemplo, o híbrido mais resistente BRS1030 do híbrido mais suscetível BRS1040 (Tabela 3).

Dentre as variáveis avaliadas, a AACPD e o  $Y_{máx}$ , foram os que se destacaram no processo de avaliação da doença, permitindo distinguir melhor os genótipos quanto à resistência a Mancha Branca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMILHO, Associação Brasileira dos produtores de milho. [www.abramilho.org.br](http://www.abramilho.org.br). Acesso em 16 de junho de 2009.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- 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.
- BOMFETI, C.A.; SOUZA-PACOLLA, E.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; MARRIEL, I.E.; MEIRELLES, W.F.; CASELA, C.R. & PACCOLA-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.
- BALMER, E.; PEREIRA, O.A.P. **Doenças do milho**. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. Melhoramento e Produção do milho. 2ªed. Campinas: Fundação Cargil, v.2, p.595-634, 1987.
- 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.
- CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York. John Wiley & Sons. 1990.
- 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.
- CARSON, M.L. & GOODMAN, M.M. Phaeosphaeria leaf spot of maize in Florida. Disease Notes, **Plant Disease** v.75, n. 9, p. 968, 1991.
- 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.
- FANTIM, M.G. **Mancha de Phaeosphaeria do milho**. In: [www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=107](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=107). Acesso 21 de julho de 2009.

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

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 14p. (Circular, 26).

FIDELIS, R.R.; MIRANDA, G.V.; AFFÉRI, F.S.; PELUZIO, J.M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis* sob estresse de fósforo, no estado do Tocantins. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, Belém, v.2, n.4, p.177 – 186 jan./jun. 2007.

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.

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. Mancha Branca x *Pantoea ananatis*. In: XXVI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2008, Londrina. **Anais**. Londrina: Wokshop sobre manejo e etiologia da mancha branca do milho, 2008. CD-rom.

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.; 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.

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.

RANE, 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.

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M. and RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Canadian Journal Microbiology** 53: 802-808, 2007.

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.