



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Giana Paula Schauffler

**Resistência de variedades crioulas e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a  
helmintosporiose e mecanismos de defesa envolvidos**

FLORIANÓPOLIS

2019

Giana Paula Schauffler

**Resistência de variedades crioulas e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a  
helmintosporiose e mecanismos de defesa envolvidos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.  
Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Florianópolis

2019

### Ficha de identificação da obra

Schauffler, Giana Paula

Resistência de variedades crioulas e cultivares de milho (Zea mays L.) a helmintosporiose e mecanismos de defesa envolvidos / Giana Paula Schauffler ; orientador, Robson Marcelo Di Piero, 2019. 91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Resistência genética. 3. Milho. 4. Helmintosporiose. 5. Bipolaris maydis. I. Di Piero, Robson Marcelo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Giana Paula Schauffler

**Resistência de variedades crioulas e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a helmintosporiose e mecanismos de defesa envolvidos**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>.(a) Juliana Bernardi Ogliari, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup> Cristina Magalhães Ribas dos Santos, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Eng. Agr. Ricardo Barbosa Felipini, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências.

---

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares  
Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero  
Orientador

Florianópolis, 28 de junho de 2019.

À minha família, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família. Aos meus pais e irmã, Paulo Vanderlei Schauffler, Maria Helena Broering Schauffler e Raquel Helena Schauffler, pelo apoio e amor incondicional durante toda a minha vida e trajetória acadêmica. Ao meu companheiro Cícero Magnus, pelo carinho, incentivo e parceria em alguns experimentos e em todos os momentos.

Às amigas, Ediany Rosa, Bianca Sell e Ana Flávia Pavei pela amizade e parceria. Por estarem sempre dispostas a ajudar ou simplesmente escutar e por todas as experiências vividas em todos esses anos.

Ao meu orientador, Professor Robson Marcelo Di Piero, pela oportunidade, por todos os ensinamentos desde a iniciação científica e pela confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Aos professores que aceitaram participar da banca, tanto do projeto como da dissertação, e pelas contribuições ao trabalho.

Aos amigos do Laboratório. Às minhas antecessoras, especialmente Caroline Luiz e Tarsis de Aguiar, por todas as dicas e ensinamentos. Ao Mateus Brusco de Freitas por todo auxílio ao longo do mestrado. Ao Paulo Garbugio da Silva por todas as dicas e por me ceder o isolado utilizado neste estudo. À Paula Astolfi pelas dicas nos experimentos de microscopia e ao Felipe Quadros pelas dicas com a lipoxigenase. Ao João dos Anjos pela parceria em vários experimentos. À todos os colegas do laboratório pela amizade, convivência e parceria.

Ao Senhor Hilberto Marian e sua família de agricultores tradicionais, pela gentileza de ceder as sementes de milho crioulo. Ao pesquisador José Américo Wordell Filho, da EPAGRI de Chapecó, por ter enviado as sementes de vários genótipos de milho.

Aos Doutores Ricardo Barbosa Felipini e Renata Brito pelos ensinamentos e pelo auxílio na criação da árvore filogenética.

Às amigas e colegas de trabalho, Luciana Rodrigues Costa, Jaqueline César e Professora Sonia Palomino pelo incentivo e compreensão.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelo suporte administrativo e aos professores por toda aprendizagem.

À Universidade Federal de Santa Catarina por ter proporcionado um ensino e pesquisa de qualidade, pela infraestrutura e pela oportunidade de eu poder estudar e trabalhar aqui.

A Deus, por ter me concedido saúde, paciência e persistência para finalizar mais esta jornada.

Durante toda sua vida estudara o universo, mas desprezara sua mais clara mensagem: para criaturas pequenas como nós, a vastidão só é suportável através do amor. (Carl Sagan, 1985)

## RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais espécies cultivadas no mundo. Possui diversos usos e tem grande importância na alimentação humana e animal. A espécie é acometida por diversas doenças e entre elas uma das mais importantes é a helmintosporiose. Um dos agentes causais é o fungo *Bipolaris maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker presente em praticamente todas as regiões produtoras. O principal método de controle desta doença é a utilização de genótipos resistentes. A resistência genética vegetal se manifesta através de mecanismos de defesa que podem ser estruturais ou bioquímicos. Neste sentido, analisaram-se inicialmente 28 genótipos de milho, entre variedades crioulas, variedades de polinização aberta e cultivares híbridas, com o objetivo de classificá-los quanto à resistência ao patógeno. Dos 28 genótipos avaliados, apenas 2 foram classificados como medianamente resistentes a *B. maydis*: AG3700 e 30K75Y. A grande maioria dos materiais se mostrou suscetível, especialmente a variedade crioula CR 06 “rajado” e a cultivar híbrida P1630H, selecionadas como padrão de suscetibilidade. Na etapa seguinte do trabalho, escolheram-se genótipos contrastantes quanto ao nível de resistência para tentar elucidar quais seriam os mecanismos de defesa envolvidos no patossistema milho e *B. maydis*. Com quatro genótipos, AG3700 e 30K75Y (medianamente resistentes) e Colorado e P1630H (suscetíveis) foram realizados testes microscópicos e bioquímicos. Observou-se que há menor germinação de conídios sobre a superfície foliar de AG3700. Na variedade Colorado, houve maior número de pontos de fluorescência, que podem ser celulose, polissacarídeos carboxilados, glucanas, pectinas ou alguns polissacarídeos de mucilagens. Com relação aos mecanismos de defesa bioquímicos, a cultivar AG3700 apresentou a maior atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase, envolvidas com a síntese de lignina, enquanto que P1630H apresentou a menor atividade para estas duas enzimas. Por outro lado, Colorado apresentou maior atividade de lipoxigenase e maior concentração de flavonoides nos tecidos vegetais. A partir dos resultados, propõe-se que a lignificação seja um mecanismo importante para a resistência de milho contra *Bipolaris maydis*.

**Palavras-chave:** Resistência genética. Milho. Helmintosporiose.

## ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is one of the main cultivated species in the world. It has several uses and great importance in human and animal feeding. The species is affected by several diseases and among them one of the most important is "Southern corn leaf blight". One of the causal agents is the fungus *Bipolaris maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker present in almost all producing regions. The main control method for disease is the use of resistant genotypes. Plant genetic resistance manifests itself through defense mechanisms that may be structural or biochemical. In this sense, 28 maize genotypes were analyzed, among landraces, open pollinated varieties and hybrid cultivars, with the objective of classifying them as for resistance to the pathogen. From 28 evaluated genotypes, only 2 were classified as moderately resistant to *B. maydis*: AG3700 and 30K75Y. The vast majority of materials proved susceptible, especially the CR 06 "rajado" landrace and P1630H hybrid cultivar, selected as the susceptibility standard. Next, contrasting genotypes were chosen to try to elucidate the defense mechanisms involved in the pathosystem maize and *B. maydis*. With four genotypes, AG3700 and 30K75Y (moderately resistant) and Colorado and P1630H (susceptible) microscopic and biochemical tests were performed. It was observed less germination of conidia on the AG3700 leaf surface. In the Colorado variety there were more fluorescence spots, which may be cellulose, carboxylated polysaccharides, glucans, pectins or some mucilage polysaccharides. With regard to the biochemical defense mechanisms, cultivar AG3700 presented the highest activity of the enzymes peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase, involved with lignin synthesis, whereas P1630H presented the lowest activity for these two enzymes. Despite this, Colorado showed higher lipoxygenase activity and higher flavonoids' concentration in plant tissues. From the results, it is proposed the lignification as an important mechanism maize's resistance against *Bipolaris maydis*.

**Keywords:** Genetic resistance. Maize. Southern corn leaf blight.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Escala diagramática para determinação da severidade da helmintosporiose (*B. maydis*) em milho. ....35
- Figura 2 - Conídios de *B. maydis* (A) e do isolado MANE 188 (B), onde as barras representam 5 µm. Em (C), conídio do isolado MANE 188 germinado nas duas extremidades, com formação de duplo apressório (barra = 50 µm). ....37
- Figura 3 - (A) Colônia de *B. maydis* em meio de cultura BDA, 20 dias após a repicagem. (B) Lesões típicas de helmintosporiose (*B. maydis*) em folhas de milho 5 dias após a inoculação (cv. P1630H) (barra = 1cm).....38
- Figura 4 - Análise filogenética gerada por parcimônia (P) e por inferência Bayesiana da região ITS do isolado MANE 188, patogênico a *Z. mays*. ....40
- Figura 5 - Porcentagem de germinação e de formação de duplos apressórios de *B. maydis* sobre folhas de diferentes cultivares de milho. .... 69
- Figura 6 - Pontos de fluorescência em folhas de diferentes cultivares de milho em resposta à inoculação com *B. maydis*. ....71
- Figura 7 - Atividade de peroxidases (A); Fenilalanina amônia-liases (B); Lipoxigenases (C); em folhas de diferentes cultivares de milho inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>). ....74
- Figura 8 - Concentração de compostos fenólicos totais (A); flavonoides (B); em folhas de diferentes cultivares de milho inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>). ....79

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Variedades crioulas e cultivares de milho que foram utilizadas para a caracterização da resistência genética a <i>Bipolaris maydis</i> . .....	33
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala de notas para avaliação da helmintosporiose ( <i>B. maydis</i> ) em milho. ....	35
Tabela 2 - Classificação da resistência de milho à helmintosporiose ( <i>B. maydis</i> ) com base na severidade relativa e média das notas. ....	36
Tabela 3 - Avaliações dos sintomas de helmintosporiose em 28 genótipos de milho testados sob alta pressão de inóculo ( $1 \times 10^4$ conídios.mL <sup>-1</sup> ). ....	43
Tabela 4 - Avaliações de helmintosporiose em diferentes variedades e cultivares de milho. Inoculação com <i>B. maydis</i> ( $1 \times 10^4$ conídios.mL <sup>-1</sup> ). ....	46
Tabela 5 - Avaliações de helmintosporiose em diferentes variedades e cultivares de milho. Inoculação com <i>B. maydis</i> ( $1 \times 10^3$ conídios.mL <sup>-1</sup> ). ....	47
Tabela 6 - Avaliação dos sintomas de helmintosporiose em 8 genótipos de milho. Inoculação com <i>B. maydis</i> ( $1 \times 10^2$ conídios.mL <sup>-1</sup> ). ....	49
Tabela 7 - Classificação dos genótipos de milho quanto à reação de resistência a <i>B. maydis</i> , quando inoculados no estágio fenológico V4 em casa de vegetação. ....	49
Tabela 8 - Avaliação da doença helmintosporiose ( <i>B. maydis</i> ). Inoculação $1 \times 10^3$ conídios.mL <sup>-1</sup> . ....	68
Tabela 9 - Área abaixo da curva de progresso da enzima ou composto (AACPEC) das diferentes cultivares de milho. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACPEC	Área abaixo da curva de progresso da enzima ou composto
AlCl <sub>3</sub>	Cloreto de Alumínio
BDA	Batata Dextrose Ágar
bp	Pares de base
BSA	Albumina de soro bovino
Bt	Bacillus thuringiensis
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CF	Compostos Fenólicos
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CR	Variedade crioula
D.O.	Densidade Óptica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAG	Equivalentes Ácido Gálico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EQ	Equivalentes Quercetina
FAL	Fenilalanina amônia-liase
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FLA	Flavonoides
gDNA	DNA genômico
GST	Gene dominante Glutathione S-transferase
HCl	Ácido Clorídrico
ITS	Internal transcribed spacer
LOX	Lipoxigenase
MANE	Micoteca Anne-Lore Schroeder
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
POX	Peroxidase
PVPP	Polivinilpirrolidona

rhm1 Gene recessivo rhm1

RNA Ácido Ribonucleico

rRNA RNA ribossômico

SC Santa Catarina

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

UV Ultra Violeta

VAP Variedade de polinização aberta

W Watts

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Milho e importância econômica</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Helmintosporiose</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Mecanismos de defesa vegetal</b> .....	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 1 – RESISTÊNCIA DE VARIEDADES E CULTIVARES DE MILHO À HELMINTOSPORIOSE</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Isolamento, identificação e produção de inóculo de <i>B. maydis</i></b> .....	<b>31</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Condições de cultivo das plantas</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Inoculação das plantas e avaliação dos sintomas</b> .....	<b>34</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Classificação da resistência dos genótipos ao fungo <i>B. maydis</i></b> .....	<b>36</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>36</b>
<b>5.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Identificação do isolado MANE 188</b> .....	<b>37</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Avaliação dos genótipos de milho quanto à resistência a <i>B. maydis</i></b> ....	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>

<b>6</b>	<b>CAPÍTULO 2 – MECANISMOS DE DEFESA ENVOLVIDOS COM A RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE MILHO A <i>Bipolaris maydis</i></b> .....	<b>60</b>
6.1	INTRODUÇÃO .....	60
6.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	62
<b>6.2.1</b>	<b>Planta, patógeno e avaliação da doença</b> .....	<b>62</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Análises microscópicas</b> .....	<b>62</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Análises bioquímicas</b> .....	<b>63</b>
6.2.3.1	Determinação da atividade da peroxidase .....	64
6.2.3.2	Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase.....	64
6.2.3.3	Determinação da atividade da lipoxigenase .....	65
6.2.3.4	Determinação de proteínas totais .....	66
6.2.3.5	Quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides .....	66
<b>6.2.4</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>67</b>
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68
6.4	CONCLUSÃO.....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>82</b>
	<b>ANEXO A</b> .....	<b>87</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas com maior produção de grãos no mundo. Possui grande importância pelo uso como fonte de energia na alimentação humana e animal. No Brasil, esta cultura é considerada uma *commodity* em ascensão no mercado internacional, sendo economicamente muito expressiva. Possui uma cadeia produtiva extensa e estabelecida e ainda é fundamental para rotação de culturas (FAO, 2009; BONO et al., 2008).

Neste ano de 2019 houve uma previsão favorável de colheita de milho na América do Sul, principalmente no Brasil e Argentina, que foi confirmada com a produção brasileira alcançando 101 milhões de toneladas de grãos (USDA, 2019).

Nesta cultura a alta produtividade ocorre em função do melhoramento genético de cultivares de milho, o que levou ao aumento do potencial produtivo, tornando-as mais exigentes no que diz respeito a insumos externos e mais suscetível ao aparecimento de doenças (MATSON et al., 1998). A produtividade tem sido prejudicada pelo ataque de patógenos nas diversas regiões produtoras do país (COSTA et al., 2010).

Muitos fatores estão interligados com o aumento da incidência de patógenos na cultura do milho. Entre eles, destacam-se os híbridos altamente produtivos, com diferentes níveis de resistência a doenças, uso inadequado de produtos e sistemas de cultivo inadequados (WEBER, 2010).

No caso dos patógenos, as populações vêm sendo controladas através do uso de defensivos agrícolas (SZILAGIL-ZECCHIN, 2012). Contudo, na cultura do milho visando a obtenção de grãos, a utilização de defensivos não se justifica economicamente, além do que o uso indiscriminado desses produtos causa uma série de problemas. Luiz et al. (2016) já comentaram que entre os problemas do uso indiscriminado de defensivos estão aumento no custo de produção, a contaminação ambiental, das águas e alimentos, riscos à saúde humana e aos seres vivos, diminuição de espécies benéficas no ambiente, além da seleção de populações resistentes.

Neste sentido, o melhoramento genético de cultivares para resistência a doenças é fundamental. As plantas resistentes possuem uma imunidade inata nas suas células que podem estar relacionadas com características anatômicas ou

reconhecimento de padrões moleculares presentes no patógeno pela planta, o que leva à ativação de mecanismos de defesa que impedem o ataque do patógeno. O reconhecimento desencadeia uma sinalização que acaba levando à ativação de genes envolvidos com a síntese de proteínas relacionadas à patogênese e fitoalexinas, além da ativação de mecanismos de defesa estruturais ou reação de hipersensibilidade (JONES & DANGL, 2006). De acordo com Pascholati & Leite (1995), esses mecanismos de defesa foram desenvolvidos pelas plantas ao longo do seu processo evolutivo e são fundamentais para a sobrevivência da espécie.

Para a obtenção de cultivares resistentes com eficientes mecanismos de defesa, é muito importante ter disponibilidade de diferentes fontes de recursos genéticos que possivelmente possuam a característica de resistência. Assim, as variedades silvestres ou crioulas merecem especial atenção. A variação genética das diferentes populações origina um conjunto genético adaptado que pode ser utilizado em programas de melhoramento. Muitas vezes genes de resistência são encontrados em parentes silvestres ou variedades crioulas (MIRANDA et al., 2007). A preservação da diversidade é de grande importância para que o melhorista tenha material disponível para conduzir o trabalho de seleção e produzir variedades e híbridos mais produtivos e adaptados às necessidades dos produtores, assim como para o desenvolvimento biotecnológico (PATERNIANI et al., 2000). Contudo, no caso da busca por cultivares com características desejáveis, como a resistência a determinadas doenças, é necessário estudar e entender diferentes materiais com origens distintas para poder inseri-las em programas de melhoramento.

No Brasil já foram identificadas diversas doenças no milho, para as quais a severidade dos sintomas é variável e dependente de fatores climáticos, solo, sistema de cultivo, características do material genético e tecnologia empregada no cultivo. Nos cultivos da região Sul, são frequentes as podridões de sementes, colmo e espiga e as doenças foliares. Entre as doenças foliares destaca-se a helmintosporiose (WORDELL FILHO & ELIAS, 2010; FERNANDES & OLIVEIRA, 2000).

A helmintosporiose é uma doença causada pelo fungo *Bipolaris maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker, entre outros. Pelo potencial de danos, é uma das mais importantes doenças dessa cultura (REIS et al., 2004). É comum nos locais de cultivo do milho e em diversas regiões do país, tendo potencial de causar grande impacto econômico.

A principal forma de controle desta doença é a utilização de cultivares que possuem resistência genética, pois além de eficiente, é o método de controle mais viável, já que o controle químico só se justifica em áreas de produção de sementes (WORDELL FILHO & ELIAS, 2010; GIANASI et al., 1996).

Apesar de existir uma grande diversidade de variedades e cultivares de milho disponíveis no mercado, a grande maioria delas não apresenta informações sobre a resistência ou suscetibilidade a *B. maydis*. Sendo assim, faz-se necessária a realização de testes para constatar a possível resistência genética do material. No caso das variedades crioulas, há ainda menos informações, principalmente naquelas que são cultivadas em um ou poucos locais.

Nesse sentido, o presente estudo visa avaliar a resistência de diferentes variedades crioulas e cultivares de milho à helmintosporiose (*B. maydis*) e verificar quais mecanismos de defesa podem estar envolvidos nesse processo.

## 2 HIPÓTESES

As variedades crioulas e cultivares de milho apresentam diferenças quanto à severidade da helmintosporiose, causada por *B. maydis*.

Após a inoculação com o patógeno, os genótipos classificados como resistentes a helmintosporiose apresentam mecanismos de defesa estruturais e/ou maior atividade de enzimas relacionadas à patogênese e compostos fenólicos.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1.1 Objetivo Geral

Classificar variedades crioulas e cultivares de milho quanto à reação de resistência ou suscetibilidade a *B. maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker e verificar quais mecanismos de defesa estão envolvidos nesse processo.

### 3.1.2 Objetivos Específicos

Classificar a resistência a *B. maydis* em variedades crioulas e cultivares de milho;

Testar a germinação de conídios de *B. maydis* e verificar a formação de calose em fragmentos de tecido foliar de diferentes variedades crioulas e cultivares de milho;

Verificar quais os mecanismos de defesa (como a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, compostos fenólicos/ flavonoides) estão presentes ou são elicitados por *B. maydis* em cultivares de milho com diferentes níveis de resistência ao patógeno.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PATOSSISTEMA E MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

#### 4.1.1 Milho e importância econômica

O milho é uma gramínea pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L. (BORÉM, 1999). É uma espécie de ciclo fisiológico C4, monocotiledônea, diploide e alógama. O ciclo fenológico varia entre 100 e 180 dias, dependendo do genótipo e das condições climáticas (SANGOI & DA SILVA, 2010; FAGERIA, 1989).

O Centro de Origem é a América Central, possivelmente o México (PATERNIANI et al., 2000). Antigas civilizações americanas como Incas, Astecas e Maias o domesticaram há cerca de 8.000 anos. Os possíveis ancestrais selvagens do milho são o teosinto (*Zea mexicana*) ou milho tunicata ("*Pod corn*"), uma espécie selvagem já extinta. Entretanto, a origem atual a partir do teosinto é a hipótese mais aceita entre os pesquisadores (BORÉM, 1999; BROWN et al., 1985).

Possivelmente, o milho é a espécie com maior variabilidade genética entre as plantas cultivadas. Há registros de mais de 300 raças e dentro de cada raça milhares de variedades. É uma espécie com alto nível de domesticação, pois perdeu a capacidade de sobreviver naturalmente. Atualmente, a espécie depende do cultivo pelo ser humano para manter a sobrevivência (PATERNIANI et al., 2000).

Trata-se do principal cereal cultivado no mundo, sendo amplamente utilizado na alimentação humana e animal, devido ao seu alto valor nutritivo. O consumo pelos humanos é *in natura* ou processado, na forma de óleo, farinha, amido, entre outros. Pelos animais, o consumo pode ser os grãos ou a planta *in natura* e na forma de silagem (BROWN et al., 1985), os grãos também podem ser secos, moídos e misturados na ração dos animais.

A produção de milho ocupa pelo menos um quinto das terras agrícolas (AMOS & WALTERS, 2006). Segundo informações da CONAB (2019), a área plantada no Brasil é superior a 17 milhões de hectares. Já a produção total no país foi maior que 100 milhões de toneladas (USDA, 2019). Além disso, esta cultura

desempenha papel socioeconômico relevante em várias comunidades e é matéria-prima em complexos agroindustriais (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000).

Esta espécie é cultivada em diferentes condições edafoclimáticas, ocorrendo em praticamente todos os continentes. Entretanto, para cada região há variedades distintas com adaptações específicas. Além disso, é uma espécie com alto potencial produtivo (PATERNIANI et al., 2000). No Brasil, atualmente a produtividade média é maior que 5 toneladas por hectare. Contudo, no início dos anos 1990 era inferior a duas toneladas de grãos por hectare (CONAB, 2019).

Porém, a busca por genes de produtividade acabou por deixar de lado os genes de resistência às doenças. Juntamente com o aumento da produtividade, houve o aumento da incidência e da severidade de diversas doenças. As novas cultivares apresentam maior produtividade, mas também apresentam diferentes níveis de resistência aos patógenos. Entre as doenças que atacam a cultura do milho, uma das mais antigas e importantes é a helmintosporiose (FERNANDES & OLIVEIRA, 2000).

#### 4.1.2 Helmintosporiose

A doença helmintosporiose, também conhecida por “mancha foliar de *helminthosporium*”, “mancha foliar de *bipolaris*” “*Southern corn leaf blight*” ou helmintosporiose maidis é causada pelo fungo *Bipolaris maydis* (Y. Nisik & C. Miyake) Shoemaker (1959), também conhecido em nomenclatura antiga como *Helminthosporium maydis*. O patógeno tem como forma perfeita *Cochliobolus heterostrophus* (KIMATI et al., 1997).

O fungo *B. maydis* já foi reportado em mais de 40 países e infecta uma alta gama de hospedeiros. Destacam-se entre os principais hospedeiros o milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), capim Tanzânia (*Panicum maximum*), *Brachiaria foliosa*, *Cymbopogon martini*, *Oriza sativa*, entre mais de trinta e cinco espécies já relatadas (Manamgoda et al., 2014).

No Brasil, a doença ganhou maior importância no final da década de setenta devido aos prejuízos causados. Existem pelo menos três raças descritas para esse patógeno, sendo as raças C e T as mais destrutivas, que ocorreram na China e Estados Unidos, respectivamente. Com a substituição das cultivares suscetíveis a

essas raças, a doença perdeu o caráter epidêmico, porém a doença ainda se encontra bem distribuída no Brasil (KIMATI et al., 1997).

Em condições favoráveis de alta umidade, temperatura entre 20 e 32°C e baixo nível de resistência da variedade, a doença pode causar grande perda da produção e conseqüente dano econômico. Em regiões de clima temperado e tropicais, quentes e úmidas, há relatos de perdas maiores que 70% da produção. O prejuízo econômico vai depender da severidade dos sintomas, do estágio fenológico da cultura na época de infecção e se há incidência alta antes do embonecamento (COSTA et al., 2009; CHAGAS et al., 2015; PERKINS & PEDERSEN, 1987).

De acordo com Manamgoda et al. (2014), os sintomas em plantas de milho incluem lesões de coloração marrom, com margens avermelhadas dependendo da cultivar. Ocasionalmente, as lesões podem coalescer ou tornar-se acinzentadas e delimitadas pelas nervuras. O tamanho médio da lesão é 2,5 cm, de formato elíptico no início e alongando-se até ficar em formato retangular.

Os conídios são verde-oliva ou marrom escuro, fusiformes, ligeiramente curvos, possuindo de 3 a 13 septos, dimensão de 10-20 µm de largura por 30-160 µm de comprimento, com hilo saliente, medindo 3-5 µm. Ocorre germinação nas duas extremidades do conídio. Os conidióforos apresentam em média 6 x 286 µm, de tamanho, coloração marrom, geralmente isolados ou em grupos pequenos, septados e raramente ramificados (MANAMGODA et al., 2014; KIMATI et al., 1997).

A infecção inicia quando o conídio lança o tubo germinativo sobre a superfície foliar e penetra diretamente ou por aberturas naturais, como os estômatos. O fungo cresce intercelularmente e as hifas se ramificam no mesófilo da planta viva, causando a morte das células vegetais dentro de 2 a 3 dias (LIM & HOOKER, 1971).

A doença tem caráter policíclico, ou seja, é possível que ocorram mais de um ciclo do fungo ao longo do ciclo de vida do hospedeiro. Os conídios são disseminados a partir das próprias lesões pelo vento ou respingos de água (COSTA, SILVA, & COTA, 2014). A sobrevivência do patógeno ocorre em restos de cultura e há também a possibilidade de disseminação pelas sementes, porém somente observada na raça T (KIMATI et al., 1997).

A principal forma de controle da doença é a utilização de cultivares ou variedades que possuem resistência genética. Porém, a rotação de culturas é recomendada, além de uma adubação equilibrada, evitando excesso de nitrogênio, e

aplicação estratégica de fungicidas (WORDELL FILHO & ELIAS, 2010). Gianasi et al. (1996) apontam que a resistência genética é a medida de controle mais viável, sendo que o controle químico deve ser utilizado somente em áreas de produção de sementes.

Quando não há disponibilidade de variedades ou cultivares resistentes, recomenda-se optar pela escolha da época de plantio, a qual deve ser entre os meses de outubro e novembro, quando as temperaturas amenas já não são mais tão frequentes. Isso pode ajudar a reduzir a severidade dos sintomas da doença (KIMATI et al., 1997). Wordell Filho & Elias (2010) explicam que a utilização conjunta das formas de controle é a melhor e mais eficiente prática de controle para esta doença.

#### **4.1.3 Mecanismos de defesa vegetal**

A resistência genética se apresenta como uma ferramenta fundamental para o controle de fitopatógenos da cultura do milho. Uma das formas de controle da helmintosporiose através do uso da resistência genética é o resguardo e uso de germoplasma resistente. Esta alternativa diminui as perdas causadas pela doença e não aumenta os custos de produção, o que leva a um maior retorno econômico ao produtor (OGLIARI, 1999; PRIESTLEY & BAYLES, 1988). As variedades crioulas de milho são importantes porque constituem fonte de variabilidade genética que podem ser exploradas ao procurar genes de resistência ou tolerância a estresses bióticos e abióticos (ARAÚJO & NASS, 2002).

Sabe-se que na natureza a doença é a exceção, enquanto que a resistência é a regra. A resistência pode ser definida como a habilidade da planta evitar ou atrasar a entrada de um patógeno em seus tecidos e o seu estabelecimento (GOODMAN et al., 1986; OUCHI & OKU, 1981).

Considera-se imune a planta que, após o contato com o patógeno, não apresenta nenhum tipo de sintoma da doença. A tolerância se manifesta quando a planta hospedeira responde à infecção com sintomas fracos ou desprezíveis, afetando muito pouco o desenvolvimento e a produção da planta. As plantas resistentes apresentam mecanismos de defesa que auxiliam na proteção vegetal e podem impedir a infecção ou colonização do patógeno (COOPER & JONES, 1983; RUBIO et al., 2003).

De maneira geral, as plantas se manifestam contra estresses bióticos ou abióticos através de mecanismos de defesa vegetal, que podem ser pré-formados ou pós-formados ao estresse, ou seja, são mecanismos que existem antes ou depois do contato do hospedeiro com o micro-organismo. Estes mecanismos se formam em sucessivos eventos, desde o reconhecimento do agente agressor até a possível ativação de barreiras físicas e químicas que auxiliam na defesa da planta (BAYSAL et al., 2003; PASCHOLATI & LEITE, 1995).

Determinadas espécies ou variedades podem apresentar mecanismos de defesa pré-formados, como lignina estrutural, parede celular espessa, cutícula, tricomas, estômatos modificados e inibidores químicos, como fenóis, alcaloides, fitotoxinas, entre outros. Estes fatores químicos e anatômicos constituem uma forma eficiente de resistência contra infecção ou colonização pelo agente patogênico. Porém, quando estes mecanismos não são suficientes para evitar a penetração do micro-organismo nos tecidos vegetais, a planta pode vir a ativar mecanismos de defesa pós-formados (SOARES & MACHADO, 2007).

A ativação dos mecanismos de defesa latentes das plantas ocorre a partir do reconhecimento de padrões moleculares entre as células do patógeno e do hospedeiro e consequente sinalização molecular. A tradução desse sinal leva à ativação de genes que induzem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, síntese de fitoalexinas, ativação de mecanismos de defesa estruturais, como por exemplo, a deposição de calose, lignificação, formação de halos, papilas, camada de cortiça, tiloses, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005; LEITE et al., 1997; KIRALY et al., 2007).

Outro mecanismo de defesa é a síntese de proteínas relacionadas à patogênese, como as peroxidases, fenilalanina amônia-liases, lipoxigenases, entre outras.

As peroxidases (POX) são glicoproteínas encontradas no tecido das células de plantas e de micro-organismos. Estas enzimas estão envolvidas com a oxidação de substratos orgânicos, fenóis, precursores da lignina e outros metabólitos secundários (PASSARDI et al., 2007). Também estão associadas ao processo de lignificação da parede celular das plantas, que conferem maior rigidez à parede celular, favorecendo a consolidação desta e evitando a entrada de patógeno pela parede das células vegetais (GASPAR et al., 1982).

As fenilalanina amônia-liases (FAL) são enzimas responsáveis pela desaminação da fenilalanina, o que a transforma em ácido trans-cinâmico. O ácido trans-cinâmico é potencialmente incorporado em compostos fenólicos, que são responsáveis pela formação de ésteres, comumarinas, flavonoides e ligninas, que conferem resistência à parede celular e atuam como sinalizadores contra estresses bióticos ou abióticos (VANCE et al., 1980; BOLWELL, 1991; LATHA et al., 2009).

As enzimas lipoxigenases (LOX) são desencadeadas pelo ataque ao vegetal e funcionam como mecanismo bioquímico de defesa. Estas enzimas fazem parte da via biossintética do ácido jasmônico. O ácido jasmônico é um hormônio vegetal relacionado ao estresse, que pode ativar respostas de defesa (FARMER & RYAN, 1992).

Além das enzimas do metabolismo vegetal secundário, compostos fenólicos (CF) e flavonoides (FLA) também atuam contra estresses bióticos. Os compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, são substâncias químicas com um anel aromático e um (fenol) ou mais (polifenol) derivados funcionais, como éteres, ésteres, metílicos, etc., substituintes da hidroxila. São metabólitos secundários importantes para pigmentação, crescimento e reprodução vegetal, e quando oxidados por enzimas contribuem com respostas de defesa vegetal (LATTANZIO et al., 2006).

Os flavonoides fazem parte da maior classe de fenólicos vegetais. Apresentam atividade antimicrobiana direta e indireta, sendo capazes de inibir a atividade de enzimas celulasas, pectinases e xilanases que são responsáveis pelo processo de infecção de micro-organismos nas células vegetais. Desta maneira, esses compostos têm apresentado alta capacidade de controlar doenças em plantas (SKADHAUGE et al., 1997).

Sendo assim, pode-se perceber que a ativação de mecanismos latentes aos vegetais proporciona uma resposta de defesa potencialmente eficiente ao ataque de micro-organismos fitopatogênicos.

## REFERÊNCIAS

- AMOS, B; WALTERS, D. T. Maize root biomass and net rhizodeposited carbon: an analysis of the literature. **Soil Science Society American Journal**, v. 70, p. 1489 – 1503, 2006.
- ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.
- BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, v.52, p.747 – 753, 2003.
- BOLWELL, G. P.; COULSON, V.; RODGERS, M. W.; MURPHY, D. L.; JONES, D. Modulation of the elicitation response in cultured french bean cells and its implication for the mechanism of signal transduction. **Phytochemistry**, v.30, n.2, p.397 – 405, 1991.
- BONO, J.; RODRIGUES, A.; MAUAD, M.; ALBUQUERQUE, J.; YAMAMOTO, C.; CHERMOUTH, K.; FREITAS, M. Modo de aplicação de fertilizantes nitrogenados na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Agrarian**, v.1, n.2, p.91 – 102, 2008.
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Ed. UFV, 1999. 817p.
- BROWN, W. L.; ZUBER M. S.; DARRAH L. L.; GLOVER D. V. **Origin, Adaptation, and Types of Corn**. **The Corn Crop**. National Corn Handbook, 1985.
- CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. Em: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA,P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.;ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 81-124, 2005.
- CHAGAS, J. F. R.; SANTOS, G. R. dos; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SIMON, J.; MOURÃO, D. S. C. **Principais doenças foliares da cultura do milho no estado do Tocantins**. Circular Técnica n. 213. EMBRAPA Sete Lagoas, MG. 2015. 13p.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Diretoria de Política agrícola e Informações. **Série Histórica das Safras**, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>>. Acesso em: 29 de março 2019.
- COOPER, J. I.; JONES, A. T. Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. **Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 127 – 128, 1983.
- COSTA, R. V.; COTA, L. V.; RODRIGUES, J. A. S.; TARDIN, F. D.; LANZA, F. E. **Controle químico da antracnose do sorgo**. Embrapa Milho e Sorgo, circular técnica 117, 2009. 8 p.

COSTA, R.V.; SILVA, D.D; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C.R. Incidence of *Colletotrichum graminicola* in stalk from maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.122 - 128, 2010.

COSTA, R.V.; SILVA, D.D; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C.R. Incidence of *Colletotrichum graminicola* in stalk from maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.122 - 128, 2010.

FAGERIA, N. K. **Solos tropicais e aspectos fisiologicos das culturas**. EMBRAPA, 1989. 425 p.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Agropecuaria, 2000. 360p.

FARMER, E. E; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound – inducible proteinase inhibitor. **Plant Cell**, vol. 4, n. 2, p. 129-134, 1992.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do Milho**. EMBRAPA, 2000. 82 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT – **Forestry 2009**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> Acesso em 26 de junho de 2017.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.L.; THORPE, T. Peroxidases: **a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants**. Université de Genève. 313p. 1982.

GIANASI, L.; CASTRO, H. A.; SILVA, H. P. Raças fisiológicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 214 – 217, 1996.

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z. & WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323 – 329, 2006.

KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. 3ª edição. Ed. Ceres, 1997.

KIRÁLY, L.; BARNA, B.; KIRÁLY, Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. **Journal of Phytopathology**, v. 155, p. 385 - 396, 2007.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAGUPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v .50(2), p. 85–93, 2009.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects.

**Phytochemistry: Advances in Research**, p. 23 – 67, 2006.

LEITE, B.; RONCATO, L. D.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBAIS, M. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta fungos patogênicos. Em: LUZ, C. W.; FERNANDES, J. M. S.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 5, p. 235 – 280, 1997.

LIM, S. M.; HOOKER, A. L. Southern corn leaf blight: Genetic control of pathogenicity and toxin production in race T and race O of *Cochliobolus heterostrophus*. **Genetics** v. 69, p. 115–117, 1971.

LUIZ, C.; SCHAUFFLER, G. P.; LEMOS-BLAINSKI, J. M.; ROSA, D. J.; DI PIERO, R. M. Mechanisms of action of aloe polysaccharides and xanthan gum for control of black rot in cauliflower. **Scientia Horticulturae**, v. 200, p. 170 – 177, 2016.

MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. **Studies in Micology**, v. 79, p. 221-288, 2014.

MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; MONASTEIRO, O. Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. **Science**, v. 280, n. 3, 1998.

MIRANDA, G. V.; SOUZA, L. V. de.; SANTOS, I. C. dos.; MENDES. Resgate de variedades crioulas de milho na região de Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, p. 1145 – 1148, 2007.

OGLIARI, J. B. **Identificação e localização de um gene de resistência de milho à *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. através do uso de marcadores microsatélites**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, 1999. 115p.

OUCHI, S.; OKU, H. Susceptibility as a process induced by pathogens. Em: Staples, R. C.; Toenniessen, G. H. (Ed.) . **Plant disease control**. Resistance and susceptibility, p. 33-44, 1981.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. Em: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos**. v. 1, p. 417 - 453, 1995.

PASSARDI, F.; BAKALOVIC, N.; TEIXEIRA, F. K.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PENEL, C.; DUNAND, C. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes, **Genomics**. 89, 567-579, 2007.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. Em: UDRY, C. W.; DUARTE, W. (Org.) **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**, v. 15, p. 11 - 41, 2000.

PERKINS, J.M., PEDERSEN, W.L. Disease development and yield losses associated whit northern leaf bling on corn. **Plant Disease**, v.71, p. 940 – 943, 1987.

PRIESTLEY, R. H.; BAYLES, R. A. The contribution and value of resistant cultivars to disease control in cereals. Em: CLIFFORD, B. C.; LESTER, E. (Eds.). **Control of Plant Diseases: Costs and Benefits**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 53-65, 1988.

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

RUBIO, L.; HERRERO, J. R.; SARRIÓ, J.; MORENO, P.; GUERRI, J. A new approach to evaluate relative resistance and tolerance of tomato cultivars to begomoviruses causing the tomato yellow leaf Curl disease in Spain. **Plant Pathology**, v. 52, n. 6, p. 763 – 769, 2003.

SANGOI, L.; DA SILVA, P.R.F. Ecofisiologia e estádios fenológicos. Em: WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, H. T.. **A Cultura do milho em Santa Catarina**. Epagri, 2010. 480p.

SKADHAUGE, B.; THOMSEN, K.; VON WETTSTEIN, D. The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. **Hereditas**, v.126, p.147 – 160, 1997.

SOARES, A. M. S; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 10, 2007.

SZILAGYL-ZECCHIN, V. J. **Microorganismos endofíticos de Milho (*Zea mays* L.): investigação do potencial promotor de crescimento de bactérias radiculares e diversidade genética de fungos associados a folhas**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, 2012.

USDA. 3º levantamento USDA da safra 2019/20 - Julho/2019.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.

WEBER, A. J. **Controle químico de moléstias foliares em milho (*Zea mays* L.)**. Universidade Regional do Noroeste do estado do Rio Grande do Sul, 2010.

WORDELL FILHO, J. A; ELIAS, H. T. (Org.). **A cultura do milho em Santa Catarina**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI, 2010. 480 p.

## 5 CAPÍTULO 1 – RESISTÊNCIA DE VARIEDADES E CULTIVARES DE MILHO À HELMINTOSPORIOSE

### 5.1 INTRODUÇÃO

O milho é uma das culturas de maior importância no Brasil. Possui status de *commodity*, influenciando diretamente no preço de diversos produtos do mercado. Isso porque essa cultura é fonte de amido de milho, além de matéria prima essencial para rações e combustíveis (PAVÃO & FILHO, 2011).

Levando-se em consideração a importância econômica desta espécie, além da importância cultural, estudos sobre a sanidade das plantações se fazem necessários. Um dos principais patógenos que acometem a cultura do milho é o fungo *B. maydis*, agente causal da helmintosporiose. Contudo, apesar da relevância da doença, ainda há pouca informação na literatura a respeito da resistência de diferentes variedades ou cultivares a esta doença.

A resistência genética se manifesta de diferentes formas. É possível encontrar espécies vegetais, ou cultivares dentro de espécies, com bons níveis de resistência ocorrendo de forma natural. As plantas são capazes de se defender de forma passiva ou ativa. A resistência passiva geralmente é associada a mecanismos de defesa pré-formados que são constitutivos das plantas. Os mecanismos ativos são induzíveis, ocorrendo após o contato da planta com o fitopatógeno (HORSFAL & COWLING, 1980).

Uma variedade de milho é caracterizada por estabilidade genética e uniformidade das plantas. As variedades crioulas são populações manejadas e reproduzidas tradicionalmente pelos agricultores ao longo dos anos, sem terem passado por melhoramento genético convencional. As variedades de polinização aberta são resultantes do cruzamento de materiais de diferentes origens. O termo cultivar é usado para uma variedade cultivada e registrada (ASPTA, 2002; DIAS 2014).

Segundo Emygdio (2004), as variedades crioulas e de polinização aberta apresentam maior plasticidade em condições de estresse, podendo apresentar tolerância a doenças. Além disso, estas variedades são boas opções para pequenas propriedades, pois de acordo com o mesmo autor, as sementes são de baixo custo,

até cinco vezes menor que o custo de sementes de cultivares híbridas, e há possibilidade da produção da própria semente.

Sabe-se que a variabilidade genética é maior nas variedades crioulas e de polinização aberta do que nas cultivares híbridas. Porém, na busca por genes que melhoram a produção é possível que características de resistência natural dos genótipos possam ser perdidas ao longo dos cruzamentos. Como consequência, as populações de patógenos conseguem se estabelecer e causar grandes perdas por doenças no campo.

De acordo com Alves (2014), isso ocorre porque a agricultura moderna tem como grande desafio conciliar o desenvolvimento de novas tecnologias, aprimorando as técnicas de manejo e visando o aumento da produtividade. Espera-se que no futuro as novas cultivares apresentem bom desempenho produtivo combinado com características de resistência a patógenos. Neste sentido, a busca por genótipos com características de resistência constitui uma importante ferramenta aos melhoristas e também aos produtores.

A presença dos genes de resistência pode ser inferida a partir do comportamento da planta colocada em contato com o patógeno. Os genótipos com maior nível de resistência deverão apresentar menos sintomas de helmintosporiose. Porém, o grau de envolvimento dos fatores pré e pós formados nas respostas de resistência varia nas diferentes interações entre planta hospedeira e patógeno (PASCHOLATI, 2011).

Neste capítulo, buscou-se estudar a resistência genética de 28 genótipos de milho, entre variedades crioulas, variedades de polinização aberta e cultivares híbridas comerciais. Foram avaliados os componentes de resistência, com objetivo de classificar os genótipos quanto a sua reação de resistência ou suscetibilidade ao *B. maydis*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Isolamento, identificação e produção de inóculo de *B. maydis*

Amostras foliares sintomáticas de milho foram coletadas de lavouras conduzidas na Fazenda Experimental da Ressacada da UFSC, localizada em Florianópolis/SC.

O isolamento foi feito por meio do corte de fragmentos de 1 cm entre a região lesionada e a parte sadia do tecido foliar. Os fragmentos foram desinfestados com a utilização de solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 60 s, álcool 70% por 30 s, e posterior lavagem em água destilada estéril. Após a desinfestação, foi disposto um fragmento por placa de Petri, sobre o meio de cultura BDA. As placas foram mantidas em sala de crescimento por 96 h, 25°C, fotoperíodo de 12 h. Após o crescimento de micélio, o fungo foi repicado até obtenção de uma colônia pura e após 15 dias o fungo isolado foi submetido à cultura monospórica (SILVA, 2018). Ao longo deste estudo, o patógeno foi mantido pelo método de *Castellani*, em placas de Petri, com repicagens periódicas, além de exsiccatas e plantas inoculadas. Atualmente, o isolado encontra-se depositado na Micoteca Anne Lore Schroeder, localizada no Laboratório de Fitopatologia da UFSC, com o código MANE 188.

A identificação morfológica e cultural do isolado foi feita a partir da comparação dos sintomas nas plantas com a literatura, morfologia de colônias e morfologia de conídios. Para isso, foram medidos 30 conídios, com auxílio de lâmina graduada em microscópio óptico (modelo DM500 Leica®) para a comparação com a literatura (MANAMGODA et al., 2014).

A identificação molecular foi realizada pela empresa Helixxa Serviços Genômicos®, seguindo metodologia na qual a extração do DNA foi feita com o kit Reliaprep gDNA Tissue (Promega), conforme protocolo indicado pelo fabricante. O gDNA foi quantificado através de espectrofotômetro UV-Vis no Nanodrop (Termo Scientific). Para ampliação foi usado um par de *primers* degenerados (WHITE et al., 1990; TOJU et al., 2012) desenhados para abranger a região ITS1-ITS2, com variação de tamanho entre 500 a 750bp, entre as unidades pequena e grande (SSU e LSU, respectivamente) do rRNA. O fragmento amplificado foi purificado em gel de agarose e o sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI

3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) com os *primers forward* ITS1 e *reverse* ITS4, usando o kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing. As sequências bidirecionais obtidas foram editadas e alinhadas, gerando uma sequência consenso final que foi comparada com a base de dados do NCBI a fim de se obter a identidade, em nível de espécie.

Utilizando a sequência consenso disponibilizada no laudo da empresa Helixxa, construiu-se a árvore filogenética da espécie. Para tanto, foi realizada revisão de literatura. Foram utilizadas as sequências depositadas por Manamgoda et al. (2014) no GenBank (NCBI) e a análise foi realizada com auxílio do programa MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Para a obtenção de inóculo, o fungo foi repicado e mantido em sala de crescimento por aproximadamente 15 dias (25°C, 12 h de fotoperíodo). Após esse período, grãos de sorgo foram utilizados como substrato. Para tanto, foram colocados em um erlenmeyer 40 g de grãos de sorgo homogeneizados com 40 mL de água destilada. Foram feitas duas autoclavagens de 30 min cada, com 24 h de intervalo (adaptado de OGLIARI, 1999). Depois de esfriar foram colocados em cada frasco quatro discos de 1 cm de diâmetro, contendo estruturas provenientes do cultivo de *B. maydis*. Os frascos de sorgo inoculados permaneceram em sala de crescimento por aproximadamente 10 dias, até a completa colonização dos grãos (adaptado de SASSE, 2008). Passado esse período, os grãos de sorgo colonizados foram espalhados em bandeja plástica fechada contendo papel toalha umedecido com água destilada e permaneceram nessa condição por 96 h. Momentos antes da inoculação, os grãos de sorgo contendo esporulação aparente foram retirados da bandeja e homogeneizados com água destilada estéril para preparação da suspensão de conídios, que foi ajustada com auxílio de câmara de Neubauer.

### **5.2.2 Condições de cultivo das plantas**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Fitopatologia, localizados no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de agosto de 2017 a fevereiro de 2019.

No total foram adquiridos 28 genótipos de milho, entre variedades crioulas e cultivares. No quadro 1 apresentam-se as nomenclaturas e suas principais características.

Quadro 1 - Variedades crioulas e cultivares de milho que foram utilizadas para a caracterização da resistência genética a *Bipolaris maydis*.

Nº	Nome do genótipo	Tipo	Tipo do grão	Cor da semente	Origem
1.	Branco de Índio	Var. Crioula	DE	BR/AM	Leoberto Leal/SC
2.	Branco	Var. Crioula	DE	BR/AM	Leoberto Leal/SC
3.	Roxo	Var. Crioula	DE	AR	Leoberto Leal/SC
4.	Vermelho	Var. Crioula	DE	AL/ AV	Leoberto Leal/SC
5.	Colorido	Var. Crioula	DE	AM/ RO/ PR	Leoberto Leal/SC
6.	Rajado	Var. Crioula	DE	AM/ AL	Leoberto Leal/SC
7.	Preto	Var. Crioula	DE	PR	Leoberto Leal/SC
8.	AL Bandeirante	Variedade	SD	AL	CATI
9.	SCS 156 Colorado	VAP	DU	AV	EPAGRI
10.	SCS 155 Catarina	VAP	DU	AM/ AL	EPAGRI
11.	SCS 154 Fortuna	VAP	DU	AM/ AL	EPAGRI
12.	AG1051	HD c	DE	AM	Agrocerec
13.	AG8011	HT t	DE	AM	Agrocerec
14.	AG3700	HS t	DU	AM	Agrocerec
15.	DKB 240	HS t	DE	AM	Dekalb
16.	P1630H	HS t	SD	AM	Du Pont Pioneer
17.	32R48YH	Híbrido	SD	AL	Du Pont Pioneer
18.	32R22YHR	Híbrido	SD	AM	Du Pont Pioneer
19.	30F53YH	HS t	SD	AL	Du Pont Pioneer
20.	P1680YH	HS t	SD	AM / AL	Du Pont Pioneer
21.	30F53VYHR	HS t	SD	AL	Du Pont Pioneer
22.	30K75Y	HSM t	SD	AL	Du Pont Pioneer
23.	30F53HR	HS t	SD	AL	Du Pont Pioneer
24.	Status Viptera	Híbrido	DU	AL	Syngenta
25.	Formula Viptera	Híbrido	DU	AL	Syngenta
26.	DOW 2A620PW	HS t	SD	AM/AL	DowAgrosiences
27.	DOW 13K001PW	SI	DU	AL	DowAgrosiences
28.	Itapuã 700	Híbrido	DU	AM	Isla

Legenda: VAP = variedade de polinização aberta; HS: híbrido simples; HSM: híbrido simples modificado; HD: híbrido duplo; HT: híbrido triplo; c: convencional; t: transgênico; DE = dentado; DU = duro; SDU = semi-duro; BR = branco; AM = amarelado; AR: arroxado; AL = alaranjado; AV = avermelhado; RO = roxo; PR = preto; SI: sem informação.

As sementes das 7 variedades de milho crioulo foram cedidas pelo Senhor Hilberto Marian, de uma família de agricultores tradicionais do município de Leoberto Leal/SC. Sementes de 16 genótipos foram cedidas pela EPAGRI de Chapecó/SC e as demais foram adquiridas em comércio local. As sementes ficaram armazenadas a 4°C até o momento do uso.

Para realização dos experimentos foram semeadas quatro sementes por vaso (2 L), contendo terra preta e turfa (2:1). Os vasos foram irrigados conforme a necessidade. Após 7 dias, as plantas foram desbastadas deixando-se duas por vaso. Um vaso com duas plantas representou a unidade experimental. No primeiro experimento, no qual foram testados os 28 genótipos ao mesmo tempo, foram utilizadas apenas três repetições por tratamento (genótipo). Em todos os demais experimentos foram utilizadas sete repetições por genótipo, em delineamento completamente casualizado.

As médias, máximas e mínimas de temperatura do período de cada experimento foram anotados com base nos dados meteorológicos disponibilizados pelo Laboratório de Climatologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias – Labclimagri (2019).

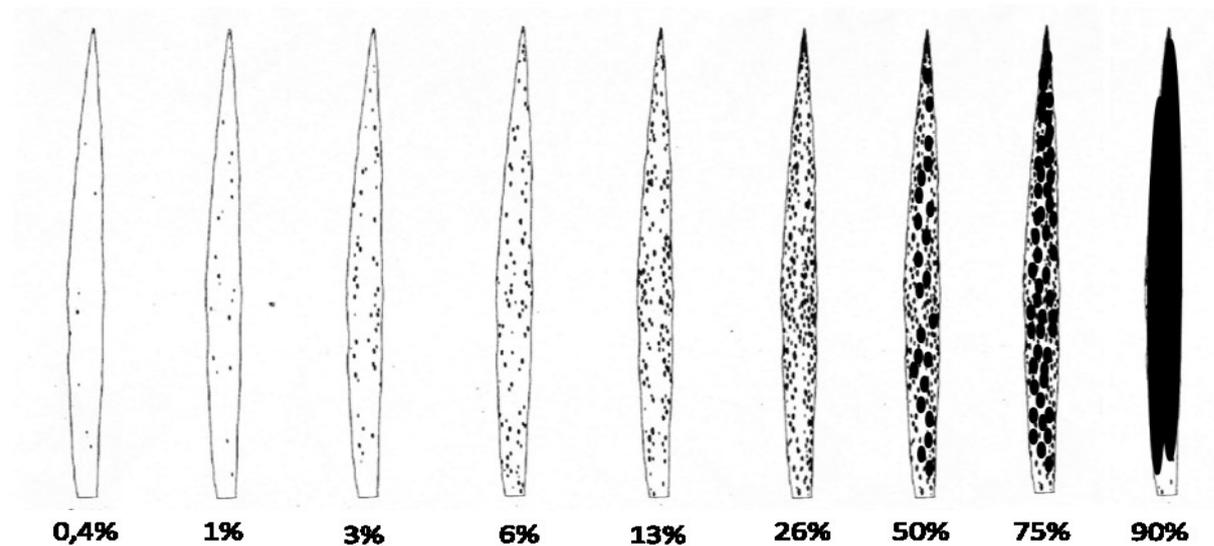
### **5.2.3 Inoculação das plantas e avaliação dos sintomas**

Ao atingirem o estágio de desenvolvimento V4, as plantas de milho foram inoculadas com suspensão de conídios ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  ou  $1 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, em experimentos separados). Para a inoculação foi utilizada pistola de pintura (LPHV Grifo, pressão máxima 58 psi, bico 0,7 mm), acoplada a um compressor de ar (Schulz, pressão 25 lbf/pol<sup>2</sup>, potência 180 W, vasão de 20 mL/L). Após a pulverização de 3 mL de suspensão de conídios por planta, as mesmas foram acondicionadas em câmara úmida escura por 24 h. Após esse período, as plantas foram novamente acomodadas nas bancadas em casa de vegetação.

A avaliação da severidade dos sintomas foi feita aos 5 e 10 dias após a inoculação, através de escala diagramática adaptada de Martinez-Franzener (2006) que contabilizou a porcentagem de área foliar lesionada (Figura 1), através da média das segunda, terceira, quarta e quinta folhas. O tamanho das lesões foi mensurado a partir da média do comprimento e largura de dez lesões por planta, com auxílio de paquímetro.

Além desta, foi realizada outra avaliação através de escala de notas (Tabela 1). Utilizou-se esta escala como complemento das demais avaliações quantitativas. A escala foi criada com base na observação do desenvolvimento da doença nos diferentes genótipos, aos 5 dias após a inoculação. As notas foram dadas levando-se em consideração a observação dos sintomas na primeira, segunda, terceira e quarta folhas.

Figura 1 - Escala diagramática para determinação da severidade da helmintosporiose (*B. maydis*) em milho.



Fonte: Adaptada de MARTINEZ-FRANZENER (2006).

Tabela 1 - Escala de notas para avaliação da helmintosporiose (*B. maydis*) em milho.

Nota	Descrição
1	Nenhum sintoma visível.
2	Poucas lesões (menos de 20 lesões) cloróticas espalhadas na folha, de formato circular, com diâmetro menor que 1 mm .
3	Poucas lesões clorótico-necróticas espalhadas, de formato alongado, onde o comprimento da lesão é pelo menos duas vezes maior que a largura.
4	Presença de lesões clorótico-necróticas alongadas, que se estendem além da primeira nervura secundária (largura maior do que 1 mm).
5	Presença de lesões clorótico-necróticas alongadas, que começam coalescer. Folhas inferiores já apresentam murcha nas extremidades.
6	Presença de folhas totalmente necrosadas. Folhas inferiores murchas e folhas mais novas com murcha nas extremidades.

Fonte: Giana Paula Schauffler (2017).

#### 5.2.4 Classificação da resistência dos genótipos ao fungo *B. maydis*

Para oito genótipos que foram inoculados no mínimo quatro vezes, sob diferentes pressões de inóculo (baixa, média e alta,  $1 \times 10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>, respectivamente), foi realizada a classificação quanto a resistência ou suscetibilidade ao fungo *B. maydis* nas condições experimentais de casa de vegetação, com inoculação em estágio de desenvolvimento V4.

Esta classificação foi feita com base na média relativa de cada genótipo, comparada com a severidade apresentada pelo padrão de suscetibilidade (CR06 “rajado”) e também com base na média das notas atribuídas aos genótipos em quatro experimentos, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação da resistência de milho à helmintosporiose (*B. maydis*) com base na severidade relativa e média das notas.

Classificação	Severidade Relativa*	Nota Média
Suscetível	> 90%	> 5.0
Medianamente Suscetível	70 - 84.9%	4.1 - 5.0
Medianamente Resistente	50 - 69.9%	3.1 - 4.0
Resistente	< 50%	< 3.0

\*Severidade relativa ao padrão de suscetibilidade (CR06 “rajado”) aos 10 dias após inoculação.

#### 5.2.5 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado. Os resultados, quando homogêneos, foram submetidos à análise de variância e quando o  $F < 0,05$  foi significativo, seguiu-se com o teste de separação de médias, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

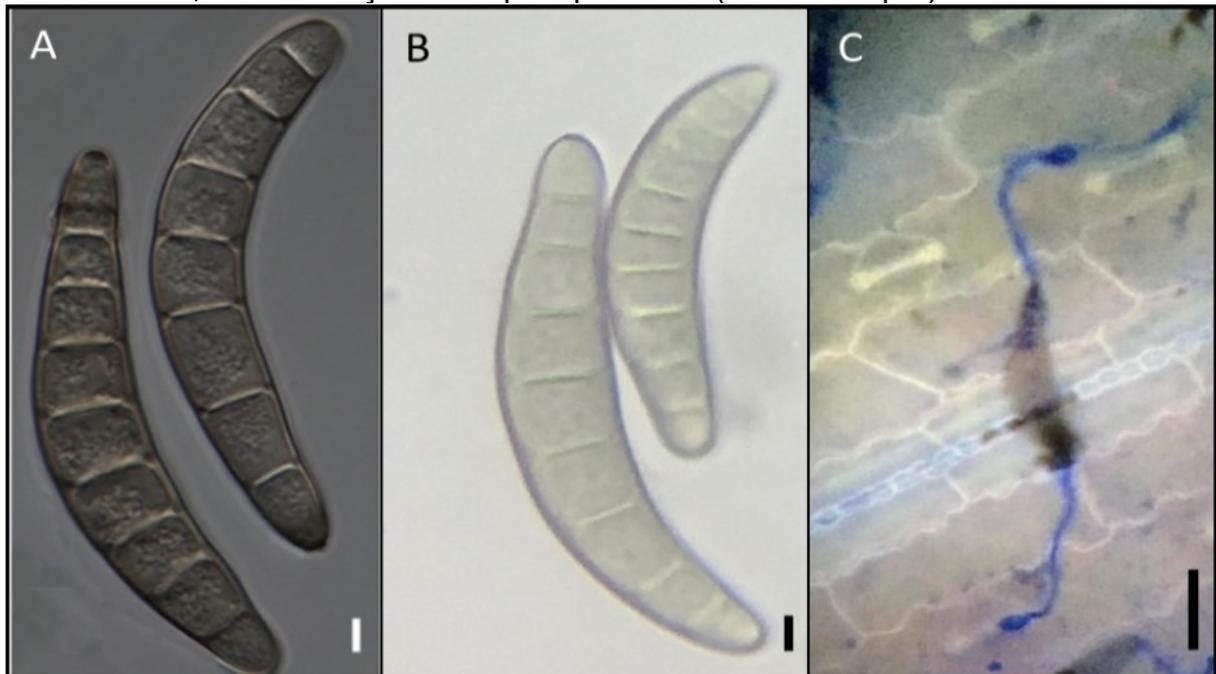
### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 Identificação do isolado MANE 188

Com o objetivo de identificar o isolado MANE 188, usado no atual trabalho, foram realizadas avaliações morfológicas e moleculares.

Observou-se que os conídios do isolado MANE 188 apresentaram entre 60 e 115  $\mu\text{m}$  de comprimento, com média aproximada de 90  $\mu\text{m}$ , coloração marrom claro a marrom escuro, mostrando-se lisos, levemente curvados e fusiformes (Figura 2B), muito semelhantes aos da imagem presente no trabalho de Manangoda et al. (2014) (Figura 2A). Ocorreu germinação a partir de ambas as extremidades dos conídios (Figura 2C).

Figura 2 - Conídios de *B. maydis* (A) e do isolado MANE 188 (B), onde as barras representam 5  $\mu\text{m}$ . Em (C), conídio do isolado MANE 188 germinado nas duas extremidades, com formação de duplo apressório (barra = 50  $\mu\text{m}$ ).

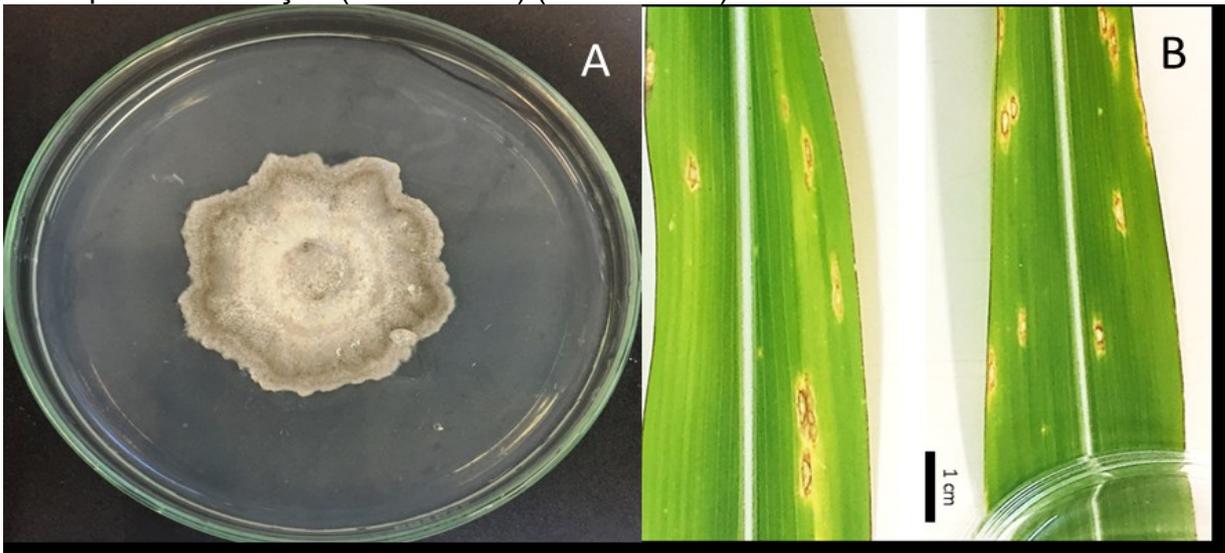


Fonte: (A) MANAMGODA et al., 2014; (B e C) Giana Paula Schauffler (2019).

As colônias crescidas em meio de cultura BDA se apresentaram inicialmente branco acinzentadas, escurecendo no decorrer do tempo (Figuras 3A). Quando inoculado em plantas de milho, o isolado MANE 188 produziu lesões de coloração

marrom, em média 1,5 a 2,5 cm de comprimento, inicialmente elípticas e se alongando longitudinalmente, tornando-se retangulares conforme as lesões alcançavam as nervuras (Figura 3B). Esses dados também corroboram com a descrição de *B. maydis* feita por Manamgoda et al. (2014).

Figura 3 - (A) Colônia de *B. maydis* em meio de cultura BDA, 20 dias após a repicagem. (B) Lesões típicas de helmintosporiose (*B. maydis*) em folhas de milho 5 dias após a inoculação (cv. P1630H) (barra = 1cm).



Fonte: Giana Paula Schauffler (2018).

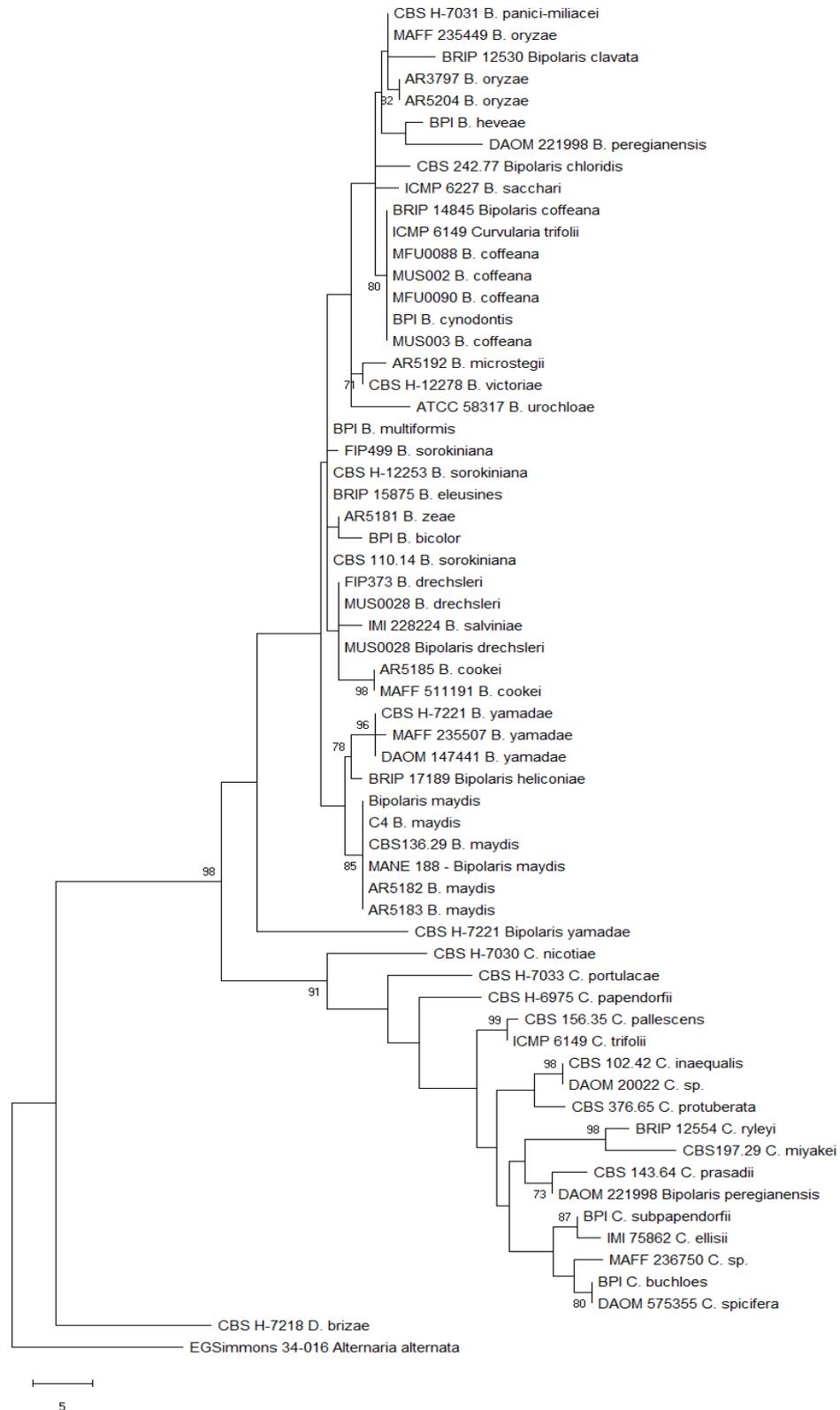
Os resultados obtidos na identificação molecular realizada pela empresa Helixxa Serviços Genômicos mostraram que a extração de gDNA e amplificação por PCR, utilizando par de *primers* ITS1 e ITS4, compreendendo toda região ITS resultou em um fragmento bem definido e de tamanho esperado para a amostra (500-750bp). As sequências consenso geradas após o sequenciamento foram comparadas contra a base de dados do NCBI. A comparação da sequência obtida apresentou 99% de identidade com cobertura de 97% dos 618bp da sequência consenso gerada contra a região ITS1-2 do gene 18S rRNA apresentada pela espécie *Bipolaris maydis*.

Para fungos, de forma geral, o marcador ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossômico foi o que teve maior aceitação entre os pesquisadores, a fim de servir como um código de barras do micro-organismo (DNA *barcoding*) (PINHO, MACHADO & FIRMINO, 2016).

O resultado final de um método de reconstrução filogenética é apresentado na forma de cladogramas ou árvores genéticas. Estas mostram os agrupamentos de

unidades taxonômicas operacionais, que podem representar sequências de espécies. Através dessa ferramenta é possível inferir visualmente a história evolutiva de organismos. Também é possível inferir sobre a identidade desses organismos (PINHO, MACHADO & FIRMINO, 2016). Apresenta-se na sequência a árvore filogenética gerada a partir da região ITS do isolado MANE188 utilizado neste trabalho (Figura 4).

Figura 4 - Análise filogenética gerada por parcimônia (P) e por inferência Bayesiana da região ITS do isolado MANE 188, patogênico a *Z. mays*.



Legenda: Os valores de *bootstrap* > 70% e probabilidade posterior > 0,90 estão anotados acima dos nós. A barra de escalas representa o numero de substituições por sítio.

O gênero *Alternaria* é o ancestral comum que originou os clados do gênero *Drechslera* e outro (desconhecido). As mutações que foram ocorrendo nos pares de bases originaram *Bipolaris* e *Curvularia*. Isto sugere que os quatro gêneros compartilham da mesma base genética ancestral, mas que sofreram variabilidade ao longo do tempo.

No passado *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Curvularia* e *Drechslera* eram classificados como *Helminthosporium* (SIVANESAN, 1987), porém com os refinamentos da taxonomia, assim como o avanço da biologia molecular, já se pode separá-los em distintos gêneros, assim como distinguir as espécies dentro dos gêneros.

Em um dos clados, encontram-se as espécies dentro do gênero *Curvularia*. Os quatro gêneros observados nesta árvore compartilham de características semelhantes, principalmente nas suas morfologias, mas também pela sintomatologia. Contudo, sabe-se que para muitos gêneros não é possível distinguir isolados em nível de espécie somente através de características morfológicas.

Em outro clado enquadraram-se as espécies do gênero *Bipolaris*. Além de *B. maydis*, outras espécies do gênero *Bipolaris* se mantiveram neste clado, entre elas destacam-se *B. orizae* (patógeno do arroz), *B. serokiniana* (trigo, milho e outras gramíneas), *B. peregrinensis* (capins *Cynodon* e outras gramíneas), *B. coffeana* (café), *B. zaeae* (capim *Panicum virgatum*), *B. bicolor* (capim *Pennisetum*, milho), *B. heliconiae* (*Heliconia* sp.), *B. yamadae* (*Panicum* sp., *Oriza* sp., *Saccharum* sp.) (MANAMGODA et al., 2014)

Observou-se que o isolado MANE 188 se agrupou na mesma ramificação de outros cinco isolados da espécie *B. maydis*, sugerindo-se que se trata da mesma espécie.

Por fim, com todas as informações geradas a partir das identificações morfológica e molecular, concluiu-se que o isolado MANE 188 pertence à espécie *B. maydis*.

### 5.3.2 Avaliação dos genótipos de milho quanto à resistência a *B. maydis*

Com o objetivo de avaliar o comportamento e os sintomas apresentados nas plantas das diferentes variedades e cultivares que entraram em contato com o patógeno *B. maydis*, foram realizados experimentos com diferentes pressões de inóculo.

No primeiro experimento, todas as variedades e cultivares apresentaram sintomas característicos de helmintosporiose. Nenhuma variedade ou cultivar recebeu notas 1 ou 2. As cultivares AG3700 e Dow13K001PW destacaram-se recebendo nota 3, as menores observadas neste experimento (Tabela 3).

No grupo das variedades crioulas, somente a CR 07 “preto” recebeu nota 4, enquanto todas as outras enquadraram-se na nota 6, demonstrando que esse grupo foi altamente suscetível ao ataque do patógeno. Além disso, observou-se que este grupo apresentou níveis altos de severidade, principalmente CR 06 “rajado”. Por este motivo, CR 06 “rajado” foi escolhida como padrão de suscetibilidade nos próximos experimentos apresentados neste capítulo.

O grupo das variedades de polinização aberta apresentou notas que variaram de 4 a 6, com níveis variáveis de severidade. No grupo das cultivares híbridas também houve variação das notas e das severidades.

A partir da avaliação da severidade, pôde-se observar que a cultivar AG3700 apresentou 28,3% de severidade, representando a menor média entre todos os genótipos testados. A variedade crioula CR06 “rajado” apresentou 86,7% de severidade, a maior média entre todas testadas (Tabela 3).

Analisando-se a média da severidade dos grupos é possível observar que o grupo das variedades crioulas apresentou a maior média (72,8%), seguido do grupo das variedades de polinização aberta (60,9%). O grupo das cultivares híbridas apresentou média de severidade de 53,6%, ou seja, quase 20% a menos do que as variedades crioulas.

Nas avaliações de comprimento e largura das lesões não foi possível diferenciar as médias dos tratamentos. As lesões apresentaram comprimento médio entre 4,0 e 6,7 mm e largura média entre 1,1 e 1,7 mm de média.

Os resultados de todos os genótipos podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliações dos sintomas de helmintosporiose em 28 genótipos de milho testados sob alta pressão de inóculo ( $1 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>).

N.	Genótipo	Nota	Severidade (%)	Tamanho da Lesão	
				Comp. (mm)	Largura (mm)
<b>Variedades Crioulas</b>					
1	CR 01 - Branco de Índio	6	79,6 ± 14,8 ab	0,52 ± 0,12	1,38 ± 0,14
2	CR 02 - Branco	6	80,0 ± 13,2 ab	0,58 ± 0,03	1,26 ± 0,20
3	CR 03 - Roxo	6	74,2 ± 21,3 ab	0,48 ± 0,05	1,33 ± 0,33
4	CR 04 - Vermelho	6	70,0 ± 15,2 ab	0,50 ± 0,19	1,16 ± 0,14
5	CR 05 - Colorido	6	69,6 ± 24,8 ab	0,61 ± 0,04	1,31 ± 0,16
6	CR 06 - Rajado	6	86,7 ± 5,2 a	0,48 ± 0,04	1,20 ± 0,34
7	CR07 - Preto	4	49,2 ± 17,7 ab	0,45 ± 0,08	1,22 ± 0,08
<b>Variedades (de polinização aberta)</b>					
8	Bandeirantes	5	71,3 ± 18,4 ab	0,58 ± 0,03	1,33 ± 0,35
9	Colorado	6	80,0 ± 17,5 ab	0,52 ± 0,12	1,29 ± 0,20
10	Catarina	5	40,8 ± 18,3 ab	0,42 ± 0,09	1,42 ± 0,23
11	Fortuna	4	51,7 ± 18,5 ab	0,41 ± 0,11	1,18 ± 0,04
<b>Cultivares Híbridas</b>					
12	AG1051	5	55,0 ± 27,0 ab	0,40 ± 0,12	1,31 ± 0,27
13	AG8011	5	60,0 ± 15,0 ab	0,60 ± 0,06	1,47 ± 0,35
14	AG3700	3	28,3 ± 15,3 b	0,42 ± 0,05	1,06 ± 0,11
15	DKB 240	5	39,2 ± 20,5 ab	0,61 ± 0,06	1,56 ± 0,45
16	P1630H	6	80,8 ± 5,8 ab	0,62 ± 0,05	1,33 ± 0,46
17	32R48YH	4	49,2 ± 10,1 ab	0,47 ± 0,08	1,18 ± 0,14
18	32R22YHR	6	78,3 ± 10,1 ab	0,59 ± 0,06	1,44 ± 0,21
19	30F53YH	4	43,3 ± 29,8 ab	0,48 ± 0,17	1,42 ± 0,61
20	P1680YH	4	65,8 ± 6,3 ab	0,58 ± 0,03	1,27 ± 0,35
21	30F53VYHR	4	42,5 ± 16,9 ab	0,48 ± 0,11	1,53 ± 0,44
22	30K75Y	4	45,8 ± 13,4 ab	0,59 ± 0,13	1,20 ± 0,24
23	30F53HR	5	47,9 ± 27,8 ab	0,57 ± 0,09	1,33 ± 0,47
24	Status Viptera	5	57,5 ± 13,9 ab	0,47 ± 0,02	1,11 ± 0,10
25	Formula Viptera	5	59,2 ± 27,6 ab	0,50 ± 0,11	1,36 ± 0,44
26	Dow2A620PW	5	66,3 ± 8,75 ab	0,67 ± 0,10	1,73 ± 0,66
27	Dow13K001PW	3	42,4 ± 10,0 ab	0,51 ± 0,02	1,73 ± 0,20
28	Itapuã	5	50,0 ± 12,1 ab	0,49 ± 0,07	1,42 ± 0,15

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas apresentam diferença significativa de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Onde não há letras significa que o teste F não foi significativo. Temperatura média (mínima e máxima): 20°C (8,8 – 28,9°C).

De acordo com Odum & Barret (2007) a competição intraespecífica ocorre entre indivíduos da mesma espécie que disputam por recursos, que neste caso podem ser espaço, água e nutrientes. A busca por recursos está ligada diretamente à sobrevivência e densidade dos organismos.

Sob condições naturais, a pressão de inóculo é menor e os sintomas da doença apresentam-se mais espalhados, com as manchas crescendo em comprimento. De acordo com Kimati et al. (1997) e Manamgoda et al. (2014), as lesões de *B. maydis* tem em média 2,5 cm de comprimento, enquanto que neste experimento a média foi de 0,5 cm.

Pensando nestes aspectos, posteriormente foram realizados mais seis experimentos, nos quais foram testadas 21 variedades e cultivares, com diferentes pressões de inóculo.

Em relação às diferentes pressões de inóculo (Tabelas 4 e 5), com base na escala de notas, quase todas as variedades crioulas testadas apresentaram maiores notas dentro dos ensaios, além das maiores médias de severidade e tamanho da lesão, independente da pressão do inóculo (Tabelas 4 e 5), com exceção de CR 01 “branco de índio”.

A variedade crioula (CR 01 “branco de índio”) apresentou lesões mais estreitas, sob alta pressão de inóculo (Tabela 4 – Experimento B), do que os demais genótipos testados. Sob baixa pressão também apresentou médias que ficaram entre as menores de severidade e comprimento das lesões, além de ter apresentado nota menor (Tabela 5 – Experimento B). Isto demonstra a variabilidade genética existente entre as variedades crioulas.

Levando-se em conta a importância dos genótipos locais ou crioulos como uma alternativa para sustentabilidade dos pequenos agricultores e conservação de recursos genéticos vegetais, sugere-se o uso das variedades CR 01 “branco de índio” para estudos de melhoramento genético, com vista à resistência a *B. maydis*.

Os genótipos crioulos apresentam potencial resistência a doenças, pois costumam apresentar maior adaptação às diferentes condições ambientais (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2010). De acordo com Silva et al. (2001), a variabilidade genética contribui muito no processo de busca por genes de resistência.

No grupo das variedades de polinização aberta também predominou a nota 6 na escala de notas, comparando-as ao grupo das variedades crioulas. Este grupo

também apresentou altas médias de severidade e tamanho da lesão, demonstrando a suscetibilidade dos genótipos.

Entre as menores médias de severidade e tamanho da lesão observadas nos experimentos (Tabela 4 e 5) encontram-se as cultivares híbridas AG3700, 30K75Y e Status Viptera, independente da concentração do inóculo. Estes genótipos também se destacaram por apresentar as menores notas dentro dos experimentos.

Por outro lado, em ambos os experimentos a cultivar P1630H, também uma cultivar híbrida, apresentou médias elevadas de severidade e tamanho da lesão, em certos casos superando as médias de variedades crioulas.

Com isto, pôde-se perceber a suscetibilidade dos genótipos crioulos de milho e variedades de polinização aberta testados, mas também em cultivares híbridas, como P1630H, mesmo quando submetidos a menor pressão de inóculo.

A alta suscetibilidade de gramíneas ao patógeno já foi comprovada pelo estudo de Anjos et al. (2004), no qual oito espécies foram inoculadas com o patógeno e todas apresentaram sintomas severos da doença. As espécies testadas foram milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*), capim-vencedor (*Panicum maximum* cv. *vencedor*), milheto (*Pennisetum glaucum*), trigo (*Triticum aestivum*), capim-tanzânia (*P maximum* cv. *tanzania*) e capim pojuca (*Paspalum atratum*).

Tabela 4 - Avaliações de helmintosporiose em diferentes variedades e cultivares de milho. Inoculação com *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>).

Variedade/ Cultivar	Pressão de inóculo ( $10^4$ conídios.mL <sup>-1</sup> )							
	5 dias após a inoculação				10 dias após a inoculação			
	Nota	Sev. (%)	Comp. (mm)	Larg. (mm)	Sev. (%)	Comp. (mm)	Larg. (mm)	
Experimentos A	CR06	6	58,4 ± 14,3 ab	4,8 ± 0,5	1,2 ± 0,1	88,1 ± 8,2 a	5,4 ± 1,0 bc	1,4 ± 0,4 b
	CR03	6	50 ± 10,7 ab	5,2 ± 1,2	1,6 ± 0,5	90 ± 4,8 a	5,9 ± 1,6 abc	1,6 ± 0,4 ab
	Catarina	6	64,3 ± 9,2 a	4,6 ± 0,9	1,4 ± 0,3	88,7 ± 7,4 a	5,8 ± 1,1 abc	1,4 ± 0,2 b
	AG3700	3	40,6 ± 14,2 b	4,9 ± 0,6	1,2 ± 0,1	77,6 ± 9,5 b	5,3 ± 1,1 c	1,2 ± 0,1 b
	P1680YH	6	68,3 ± 9,3 a	5,5 ± 0,6	1,4 ± 0,4	88,4 ± 3,8 a	7,4 ± 1,4 ab	1,6 ± 0,4 ab
	Dow2A620PW	6	54,8 ± 22,2 ab	5,2 ± 0,5	1,5 ± 0,3	82,9 ± 7,1 ab	7,9 ± 1,4 a	2,0 ± 0,4 a
	Itapuã	6	67,3 ± 12,7 a	4,8 ± 0,6	1,2 ± 0,2	88,3 ± 4,8 a	5,8 ± 1,7 abc	1,8 ± 0,4 ab
Experimentos B	CR06	6	68,6 ± 12,6 ab	4,2 ± 1,3	1,7 ± 0,4	93,7 ± 2,9	6,3 ± 1,6	1,9 ± 0,3 ab
	CR07	6	72,5 ± 11,6 ab	4,4 ± 0,8	1,7 ± 0,5	92,5 ± 2,3	6,2 ± 2,3	1,7 ± 0,4 abc
	P1630H	6	83,1 ± 5,5 a	4,6 ± 1,0	1,7 ± 0,3	89,5 ± 4,4	6,6 ± 1,8	2,1 ± 0,4 a
	Colorado	6	68,7 ± 7,9 ab	3,7 ± 0,9	1,4 ± 0,2	92,8 ± 2,1	5,2 ± 1,1	1,7 ± 0,3 abc
	CR01	6	68,6 ± 12,6 ab	3,7 ± 0,8	1,3 ± 0,1	92,5 ± 3,8	5,1 ± 1,0	1,4 ± 0,2 c
	30K75Y	5	60,9 ± 12,9 b	4,3 ± 0,4	1,4 ± 0,3	90 ± 3,3	5,3 ± 1,4	1,5 ± 0,2 bc
	AG1051	6	72,5 ± 9,6 ab	4,5 ± 1,1	1,8 ± 0,8	92,8 ± 4,1	5,6 ± 0,8	1,6 ± 0,1 abc
Experimentos C	CR06	6	24,6 ± 10,6 bc	2,9 ± 0,6	1,2 ± 0,2	80,1 ± 3,3 a	4,3 ± 0,9	1,3 ± 0,2 ab
	Fortuna	5	29,4 ± 8,6 bc	3,2 ± 0,4	1,2 ± 0,2	65,9 ± 24,6abc	5,2 ± 0,7	1,6 ± 0,3 ab
	DKB 240	5	27,9 ± 10,3 0,5abc	3,3 ± 0,5abc	1,5 ± 0,3 a	74,7 ± 8,0 abc	5,1 ± 1,2	1,7 ± 0,2 a
	Bandeirante	6	25,8 ± 20,6 c	2,7 ± 0,4 c	1,1 ± 0,2 b	76,2 ± 5,5 ab	4,3 ± 0,9	1,6 ± 0,3 ab
	30F53VYHR	4	23,2 ± 7,8 bc	3,2 ± 0,5 bc	1,2 ± 0,2 ab	62,8 ± 12,7 bc	5,2 ± 1,0	1,4 ± 0,2 ab
	Status Viptera	4	20,6 ± 8,7 bc	2,8 ± 0,5 bc	1,1 ± 0,2 ab	58,6 ± 15,6 c	5,6 ± 1,0	1,6 ± 0,4 ab
	32R48YH	6	37,4 ± 12,2 a	3,9 ± 0,4 a	1,3 ± 0,2 ab	72,6 ± 10,4 abc	4,7 ± 1,2	1,7 ± 0,2 a
	AG8011	6	28,1 ± 14,2 ab	3,5 ± 0,4 ab	1,3 ± 0,3 ab	77,2 ± 5,6 ab	4,9 ± 0,5	1,8 ± 0,4 a
	CR04	6	20,9 ± 13,6 bc	2,9 ± 0,6 bc	1,0 ± 0,1 b	74,2 ± 8,7 ab	4,9 ± 0,8	1,2 ± 0,1 b

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas (dentro do experimento A, B ou C) apresentam diferença significativa de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Onde não há letras significa que o teste F não foi significativo. Temperatura média (mínima e máxima): Exp. A: 21,4°C (11,8 – 32,1°C); Exp. B: 21,6°C (11,8 – 32,1°C); Exp. C: 22,9°C (15,2 – 33,8°C).

Tabela 5 - Avaliações de helmintosporiose em diferentes variedades e cultivares de milho. Inoculação com *B. maydis* ( $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>).

Variedade/ Cultivar	Pressão de inóculo ( $10^3$ conídios.mL <sup>-1</sup> )							
	5 dias após a inoculação				10 dias após a inoculação			
	Nota	Sev. (%)	Comp. (mm)	Larg. (mm)	Sev. (%)	Comp. (mm)	Larg. (mm)	
Experimentos A	CR06	4	9,2 ± 2,6	3,5 ± 0,7 b	1,4 ± 0,4 ab	45,6 ± 11,8	9,2 ± 2,8	1,3 ± 0,2
	P1630H	4	9,8 ± 2,1	5,9 ± 0,8 a	1,6 ± 0,3 a	52,4 ± 8,2	12,6 ± 2,9	1,6 ± 0,3
	CR03	4	7,5 ± 3,5	3,6 ± 1,5 b	1,3 ± 0,3 ab	40,6 ± 18,6	9,4 ± 3,5	1,7 ± 0,4
	Catarina	4	8,6 ± 4,1	3,7 ± 0,7 b	1,3 ± 0,3 ab	43,5 ± 8,9	11,2 ± 3,2	1,7 ± 0,6
	AG3700	3	4,7 ± 1,9	2,8 ± 0,6 b	1,0 ± 0,1 b	35 ± 17,0	8,4 ± 0,8	1,4 ± 0,3
	P1680YH	4	7,3 ± 3,2	3,7 ± 0,8 b	1,4 ± 0,1 ab	36,0 ± 8,7	8,5 ± 3,4	1,8 ± 0,3
	Itapuã	3	5,1 ± 1,4	2,8 ± 0,5 b	1,1 ± 0,1 ab	41,6 ± 18,2	7,8 ± 2,5	1,6 ± 0,3
Experimentos B	CR06	6	15,8 ± 6,7 ab	4,2 ± 1,4 b	1,4 ± 0,2	69,2 ± 8,6	8,4 ± 3,1	1,8 ± 0,3
	CR07	5	20,6 ± 14,2 a	4,6 ± 1,1 b	1,4 ± 0,2	61,2 ± 18,8	8,2 ± 2,5	2,0 ± 0,5
	P1630H	5	22,1 ± 10,1 a	7,1 ± 2,1 a	1,3 ± 0,2	62,3 ± 12,4	9,3 ± 3,2	1,8 ± 0,2
	Colorado	4	9,8 ± 2,5 ab	4,3 ± 1,0 b	1,4 ± 0,3	60,1 ± 7,5	8,0 ± 3,8	1,6 ± 0,6
	CR01	4	6,3 ± 2,4 b	4,6 ± 1,8 b	1,2 ± 0,2	66,4 ± 8,2	7,7 ± 4,1	1,4 ± 0,3
	30K75Y	4	11,9 ± 5,8 ab	5,1 ± 1,7 ab	1,3 ± 0,3	61,6 ± 5,6	8,8 ± 3,8	1,6 ± 0,4
	AG1051	4	10,9 ± 3,0 ab	4,6 ± 0,5 b	1,2 ± 0,2	63,1 ± 7,8	10,4 ± 3,2	1,6 ± 0,4
Experimento C	CR06	6	65 ± 22,2	6,9 ± 5,2 ab	1,4 ± 0,5	91 ± 3,8 a	8,3 ± 3,4 abc	1,6 ± 0,2 ab
	P1630H	6	68,7 ± 6,8	12,3 ± 2,5 a	2,1 ± 0,4	86,2 ± 7,4 ab	13,5 ± 4,9 a	1,6 ± 0,3 ab
	Fortuna	6	61,2 ± 12,7	10,6 ± 3,9 ab	1,9 ± 0,2	82,5 ± 9,4 ab	7,0 ± 0,9 bc	1,9 ± 0,2 a
	DKB 240	6	56,8 ± 13,9	8,1 ± 2,2 ab	1,9 ± 0,3	81,2 ± 7,4 ab	5,4 ± 1,9 cd	1,5 ± 0,3 ab
	Bandeirante	6	60,4 ± 12,4	6,8 ± 3,3 ab	1,9 ± 0,7	73,1 ± 4,7 b	11,7 ± 5,2 ab	2,0 ± 0,5 a
	30F53VYHR	5	53,5 ± 6,2	7,4 ± 2,5 ab	1,7 ± 0,8	80,4 ± 11,4 ab	3,7 ± 0,6 d	1,2 ± 0,2 b
	Status Viptera	5	50 ± 18,2	7,0 ± 2,4 ab	1,6 ± 0,3	82,9 ± 2,9 ab	5,1 ± 0,7 cd	1,6 ± 0,1 ab
	32R48YH	6	59,4 ± 4,7	12,2 ± 4,7 a	2,3 ± 0,4	80,4 ± 3,3 ab	6,5 ± 1,5 bc	1,9 ± 0,18 a
	AG8011	5	46,8 ± 14,9	5,4 ± 0,6 b	1,6 ± 0,1	89,0 ± 8,0 a	5,9 ± 2,6 cd	1,3 ± 0,4 ab
CR04	6	70,2 ± 12,1	7,3 ± 4,1 ab	1,4 ± 0,3	85,4 ± 7,1 ab	5,7 ± 1,2 cd	1,8 ± 0,4 ab	

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas (dentro do experimento A, B ou C) apresentam diferença significativa de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Onde não há letras significa que o teste F não foi significativo. Temperatura média (mínima e máxima): Exp. A: 24,8°C (17,6 – 36°C); Exp. B: 24,6°C (17,2 – 35,4°C); Exp. C: 24,3°C (17,2 – 35,4°C).

Nos experimentos com menor pressão de inóculo (Tabela 5), os genótipos apresentaram maior comprimento de lesão (6,02 mm na primeira e 8,36 mm na segunda avaliação), em relação ao experimento anterior, com alta pressão (4,03 e 5,56 mm). Acredita-se que isso ocorreu em função da inoculação, dez vezes menos concentrada.

Acredita-se que com menor pressão de inóculo, os conídios germinaram e tiveram espaço para colonizar os tecidos foliares, com menor interferência da competição intraespecífica. Possivelmente, isso refletiu nas notas, que para alguns genótipos foram menores (Tabela 5). Por outro lado, mesmo com lesões menores, é possível observar que a severidade foi maior sob maior pressão de inóculo (Tabela 4) devido ao grande número de lesões por planta.

Diversos autores definem a resistência qualitativa à doença de várias formas, geralmente relacionando tanto geneticamente, quanto fenotipicamente (YANG, BALINT-KURTI, & XU, 2017). Para a resistência quantitativa a doenças entende-se que se trata da redução, porém não necessariamente com a completa eliminação dos sintomas, comparando-se aos fenótipos mais suscetíveis. No aspecto genético, a resistência baseia-se na ação combinada de um ou muitos genes agindo de forma conjunta, ou seja, normalmente tem uma base multigênica (NIKS, QI & MARCEL, 2015; POLAND et al., 2009).

Por fim, oito genótipos de milho foram inoculados com *B. maydis* sob baixa pressão de inóculo. Neste caso, observou-se que a cultivar 30K75Y recebeu nota 3, enquanto AG3700 e Status Viptera receberam nota 4. Os demais genótipos testados, sendo eles CR 06 “rajado”, P1630H, Colorado, 30F53VYHR e Bandeirante, apresentaram notas 6.

Para os demais parâmetros avaliados, observou-se o mesmo padrão de comportamento dos genótipos, onde a cultivar 30K75Y apresentou as menores médias de severidade, comprimento e largura das lesões (3,3%, 3,9 mm e 1,2 mm), seguido das cultivares AG3700 e Status Viptera. As maiores médias foram observadas principalmente para a cultivar P1630H (13,3% de severidade, 11,2 mm e 2,0 mm de comprimento e largura das lesões, respectivamente), mas também para as variedades Colorado, Bandeirante e a crioula CR 06 “rajado” (Tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação dos sintomas de helmintosporiose em 8 genótipos de milho. Inoculação com *B. maydis* ( $1 \times 10^2$  conídios.mL<sup>-1</sup>).

Genótipo	Nota	Severidade (%)	Tamanho da Lesão	
			Comp. (mm)	Larg. (mm)
CR06	6	10,3 ± 0,8 bc	7,2 ± 2,2 abc	1,8 ± 0,6 ab
Colorado	6	15,2 ± 2,9 a	7,4 ± 2,1 abc	1,4 ± 0,3 ab
Bandeirante	6	10,3 ± 1,5 bc	6,0 ± 1,9 bc	1,6 ± 0,4 ab
P1630H	6	13,3 ± 4,1 ab	11,2 ± 3,4 a	2,0 ± 0,3 a
30F53VYHR	6	9,0 ± 1,1 cde	10,0 ± 2,6 ab	1,9 ± 0,3 a
AG3700	4	7,3 ± 2,8 cde	4,1 ± 1,0 c	1,2 ± 0,2 b
Status Viptera	4	5,83 ± 2,7de	4,9 ± 2,3 c	1,2 ± 0,3 b
30K75Y	3	3,3 ± 1,9 e	3,9 ± 1,2 c	1,2 ± 0,2 b

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas apresentam diferença significativa de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Temperatura média (mínima e máxima): 16,8°C (5,2 – 30,0°C).

Para estes 8 genótipos que foram testados quatro vezes, sob diferentes pressões de inóculo, foi possível sugerir uma classificação quanto à reação de resistência a *B. maydis*, com base nos resultados de severidade e notas médias, nas condições experimentais testadas de casa de vegetação e estágio fenológico V4 (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação dos genótipos de milho quanto à reação de resistência a *B. maydis*, quando inoculados no estágio fenológico V4 em casa de vegetação.

Genótipo	Tipo	Nota Média	Sev. Relativa (%) *	Classificação
P1630H	CH	5.75	100,4	S
CR 06 "rajado"	VC	5.75	100,0	S
Bandeirantes	VAP	5.75	89,4	S
Colorado	VAP	5.50	106,4	S
30F53VYHR	CH	4.75	73,8	MS
Status Viptera	CH	4.50	71,8	MS
30K75Y	CH	4.00	67,5	MR
AG3700	CH	3.25	67,1	MR

Legenda: CH: cultivar híbrida; VC: variedade crioula; VAP: variedade de polinização aberta; S: suscetível; MS: medianamente suscetível; MR: medianamente resistente. \*Severidade relativa ao padrão de suscetibilidade (CR06 "rajado"), calculada a partir dos experimentos mostrados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

Destaca-se que dentre todos os testados não foram encontrados genótipos resistentes. Somente duas cultivares híbridas foram classificadas como medianamente resistentes e outras duas como medianamente suscetíveis. Por fim, uma variedade crioula, duas variedades de polinização aberta, uma cultivar híbrida foram classificadas como suscetíveis, pois estes genótipos apresentaram níveis de doença similares aos do genótipo utilizado como padrão de suscetibilidade (CR06 “rajado”). Os resultados demonstram a grande variabilidade existente dentro dessa espécie vegetal.

Apesar das variedades crioulas estarem sob contínuo melhoramento e seleção natural, ainda não possuem tecnologias de resistência às pragas e doenças, como é o caso de algumas variedades híbridas ou transgênicas. Porém, conforme Miranda et al. (2007), em muitos casos parentes silvestres ou variedades crioulas possuem genes de resistência.

As variedades de polinização aberta, assim como as crioulas, apresentam alta variabilidade genética. As variedades de polinização aberta Fortuna, Catarina e Colorado foram lançadas pela EPAGRI de Santa Catarina nos anos de 2006, 2009 e 2010, respectivamente. Estas cultivares são resultado de cruzamentos de grãos provenientes de vários tipos de cultivares, podendo ser materiais crioulos, variedades melhoradas ou híbridos (DIAS, 2014).

A cultivar P1630H é uma cultivar híbrida simples e transgênica (AIRES et al., 2013), desenvolvida para ter o ciclo hiperprecoce, com alto potencial produtivo (Du Pont Pioneer1, 2019). Em muitos casos na busca por características desejáveis, como elevada produtividade e precocidade, o material acaba sendo mais vulnerável às doenças (NIHEI & FERREIRA, 2012). Isto foi observado neste estudo, no qual a cultivar P1630H se apresentou entre os genótipos mais suscetíveis a *B. maydis*.

A cultivar híbrida 30F53VYHR é uma cultivar melhorada geneticamente, disponível também em outras versões como 30F53, 30F53R e 30F53VYH. O genótipo 30F53VYHR possui a tecnologia *Leptra*, de proteção contra insetos. Não há informações sobre resistência a doenças, porém recomenda-se manejo preventivo para ferrugem (*Puccinia polissora*) (Du Pont Pioneer2, 2019). De acordo com Campos (2017) na safra 2017/2018 o híbrido 30F53, em suas diferentes versões, foi o mais vendido no Brasil e um dos mais vendidos pela empresa produtora no mundo. Isto, provavelmente em função da alta produtividade desta cultivar, que já supera 14 toneladas por hectare. Neste estudo, a cultivar

30F53VYHR foi classificada como medianamente suscetível em função dos níveis de severidade e notas apresentados.

Do mesmo modo, a cultivar Status Viptera também foi classificada como medianamente suscetível. Esta cultivar tem ciclo precoce e foi melhorada geneticamente para ter baixa suscetibilidade a viroses e proteção contra lagartas. De acordo com Syngenta (2019), a cultivar apresenta-se moderadamente resistente à *Puccinia sorghi*, *P. polissora* e *Cercospora zea-maydis*, todos patógenos foliares.

As cultivares AG3700 e 30K75Y foram as que mais se destacaram em relação à resistência genética à *B. maydis*, entre todos os genótipos testados.

A cultivar AG3700 é um híbrido simples de ciclo precoce. Não há informações sobre a resistência dessa cultivar especificamente à *B. maydis*. Porém, para outras doenças foliares, sabe-se que AG3700 é altamente tolerante à *Puccinia sorghi* e tolerante à mancha-branca e *E. turcicum* (CRUZ et al., 2015).

A cultivar 30K75Y também é um híbrido simples melhorado geneticamente com a tecnologia *Bt* a partir da sua linhagem anterior 30K75. A cultivar apresenta resistência à mancha-branca, a *Cercospora zea-maydis* e a *E. turcicum* (CRUZ et al., 2015). Esta informação sobre a resistência às doenças demonstra que possivelmente o trabalho de melhoramento genético sobre essa cultivar levou em consideração a resistência a doenças foliares, além da resistência a Lepidópteros (tecnologia *Bt*).

De acordo com Chang & Peterson (1995), a resistência ao fungo *B. maydis* é controlado por dois genes recessivos. O gene dominante fornece suscetibilidade a este patógeno. No caso de *E. turcicum* a resistência é controlada por um ou vários genes, conferindo resistência qualitativa ou quantitativa.

Pacheco et al. (1998) explicam que a resistência ao *B. maydis* se apresenta pela combinação de alelos decorrentes de seleção recorrente. Geralmente associam-se características de resistência a uma cultivar da qual ela é proveniente. Kurosawa et al. (2018) ainda sugerem que os mecanismos que controlam a resistência a *B. maydis* ou *E. turcicum* são diferentes e por esse motivo os programas de melhoramento devem ser precisos na combinação dessas doenças em progênies em seleção.

No trabalho de Wisser et al. (2011) associou-se o gene GST, um gene relacionado à enzima glutathione S-transferase, à resistência de milho à *B. maydis*.

Os mesmos autores explicam que este gene está associado ao desenvolvimento e à morte celular em milho. Outro trabalho desenvolvido por Zhao et al. (2012) demonstrou que o *locus* recessivo de resistência *rhm1* tem grande importância na resistência de milho à este patógeno. Entretanto, outros estudos demonstraram que 29 loci independentes implicam na resistência quantitativa de milho à *B. maydis*, caracterizando a natureza multigênica da resistência (KUMP et al., 2011; POLAND et al., 2011).

Acredita-se que outro aspecto relacionado à resistência no patossistema milho e *B. maydis* esteja ligado à infecção e à esporulação nas lesões. No caso deste patógeno, a infecção se inicia quando o fungo lança o tubo germinativo sobre a superfície foliar e penetra diretamente ou por aberturas naturais. As hifas se ramificam no mesófilo da planta viva e leva entre 2 e 3 dias para causar a morte celular. *E. turcicum*, outro agente causal de mancha foliar em milho, apresenta o mesmo padrão de infecção, porém pode levar até 15 dias para causar morte celular (LIM & HOOKER, 1971; CUQ et al., 1993; BASHAN et al., 1995).

Há uma explicação para que, de forma geral, os genótipos mais resistentes estivessem entre as cultivares híbridas. Considera-se o melhoramento genético do milho um dos maiores triunfos da genética vegetal. As cultivares híbridas apresentam elevado potencial produtivo, e geralmente são selecionadas as plantas saudáveis para o cruzamento. Porém, há inconvenientes nas cultivares híbridas melhoradas geneticamente. Quase sempre estas cultivares são altamente dependentes de insumos externos e alta tecnologia. Desta forma, os produtores que antes eram autônomos passam a depender de pacotes tecnológicos de alto custo (SILVEIRA et al., 2015).

No Brasil e no mundo, a maior parte das propriedades já realiza o plantio de cultivares híbridas. Contudo, em condições de baixo emprego de tecnologia, como é o caso de muitas pequenas propriedades rurais, as cultivares híbridas podem apresentar o mesmo ou menor desempenho do que as variedades crioulas (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2010).

As populações crioulas têm grande potencial de adaptação ambiental. Segundo Cecarelli et al. (1994), o uso de material crioulo traz maiores benefícios ambientais, pois são genótipos adaptados localmente e que mantêm a diversidade da espécie. Além disso, a adaptação às mais diversas condições ambientais e

sistemas de cultivo mantêm os genótipos crioulos em processo evolutivo permanente (CUNHA, 2013).

Pela riqueza de variabilidade genética também podem ser usadas em programas de melhoramento para buscar genes de tolerância ou resistência a doenças (PATERNIANI et al., 2000; ARAÚJO & NASS, 2002) e são uma alternativa para a sustentabilidade de pequenos agricultores (ABREU; CANSI & JURIATTI., 2007).

Carpentiere-Pipolo et al. (2010) observaram que, com baixo emprego de tecnologia, quatro variedades crioulas superaram a produção da variedade comercial mais produtiva. Bisogin et al. (1997) compararam genótipos melhorados com crioulos e observaram maior produção pelas variedades crioulas do que o melhor híbrido testado.

Ainda, variedades locais ou crioulas se destacam quanto à estabilidade e rendimento, mesmo com baixo emprego de insumos, pequenos controle de daninhas, baixa fertilidade do solo e déficit hídrico, mantendo a produtividade (MACHADO et al., 2006). Estes resultados demonstram a capacidade de tolerância dos genótipos crioulos, principalmente em condições adversas.

Genótipos crioulos com essas características apresentam potenciais genes de resistência ou tolerância em relação aos estresses bióticos e abióticos que já existem e que podem vir a existir (MERCER et al., 2012).

Em Santa Catarina já há distribuição de mais de 12 mil sacas de sementes das variedades de polinização aberta Fortuna e Colorado para pequenas propriedades, com custo cinco vezes menor do que a média de sementes híbridas, com boa produtividade e a possibilidade do agricultor produzir a própria semente (DIAS, 2014).

Neste contexto, destacam-se a variedade crioula CR 01 “branco de índio” e a variedade de polinização aberta Fortuna. Sugere-se o estudo da tolerância a patógenos dessas variedades a campo, com avaliação de produtividade. Sugere-se também seu estudo em programas de melhoramento, além de outras variedades acessadas de diferentes locais de origem, na busca de fontes de genes visando resistência a doenças, assim como as cultivares híbridas AG3700 e 30K75Y.

#### 5.4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste capítulo, entre os genótipos testados a variedade crioula CR 06 “rajado” e a cultivar híbrida P1630H mostraram-se como as mais suscetíveis a *B. maydis*. As cultivares AG3700 e 30K75Y se apresentaram como as mais resistentes ao patógeno, representando uma alternativa para o plantio em áreas com histórico da doença.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L.; CANSI, E.; JURIATTI, C. Avaliação do rendimento sócio-econômico de variedades crioulas e híbridos comerciais de milho na microregião de Chapecó. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, p. 1230-1233, 2007.
- AIRES, R. F.; CARGNELUTTI FILHO, A.; EMYGDIO, B. M.; SANTOS, F. M.; MACHADO, J. R. A.; CARAFFA, M. **Ensaio estadual de híbridos de milho safra 2012/13**. 58ª Reunião Técnica Anual do Milho. Pelotas/RS, 2013.
- ALVES, S. P. L. **Marketing Verde e os Desafios na Preservação do Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2014, 68 p.
- ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; TEIXEIRA, R. N.; ANJOS, S. S. N. Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, 2004, p. 656 – 658.
- ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.
- ASPTA. **Biodiversidade e biotecnologias: um glossário**. ASPTA/RJ, 1993. Centro ecológico. Curso de Biodiversidade agrícola. Ipê, 2002.
- BASHAN, B.; LEVY, R. S.; COJOCARU, M.; LEVY, Y. Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. **Physiol Mol Plant Pathol** v. 47, p. 225–235, 1995.
- BISOGNIN, D. A.; CIPRANDI, O.; COIMBRA, J. L. M.; GUIDOLIN, A. F. Potencial de variedades de polinização aberta de milho em condições adversas de ambiente. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 3, n. 1, p. 29-34, 1997.
- CAMPOS, F. Híbrido 30F53 bate recorde de 10 milhões de sacas vendidas no Brasil. **Revista Cultivar**, 2017. Disponível em: <  
<https://www.grupocultivar.com.br/noticias/hibrido-30f53-bate-recorde-de-10-milhoes-de-sacas-vendidas-no-brasil>> Acesso em: 09 de maio de 2019.
- CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; DE SOUZA, A.; DA SILVA, D. A.; BARRETO, T. P.; GARBUGLIO, D. D.; FERREIRA, J. M. Avaliação de cultivares de milho crioulo em sistema de baixo nível tecnológico. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 2, p. 229-233, 2010.
- CECCARELLI, S. Specific adaptation and breeding for marginal conditions. **Euphytica**, v. 77, n. 3, p. 205 – 219, 1994.
- CHANG, R.; PETERSON, P.A. Genetic control of resistance to *Bipolaris maydis*: one gene or two genes?. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 94-97, 1995.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111555>.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E.; SIMÃO, E. P. **Quatrocentas e setenta e sete cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra de 2015/16**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2015, 29 p.

CUNHA, F. L. **Sementes da paixão e as políticas públicas de distribuição de sementes na Paraíba**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013, 184 p.

CUQ, F.; HERRMANN-GORLINEA, S.; KLAEBEA, A.; ROSSIGNOLA, M.; PETITPREZ, M. MONOCERIN in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and a study of its phytotoxicity. **The International Journal of Plant Biochemistry** v. 34, p. 1265–1270, 1993.

DIAS, G. Milhos VPA Epagri oferecem boa produtividade com menor custo. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 27, n. 2, p. 20 - 24, 2014.

Du Pont Pioneer 1. **Híbrdos de milho P1630H**. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/milho/central-de-produtos/produtos/p1630h>>. Acesso: 06 de abril de 2019.

Du Pont Pioneer 2. **Híbridos de Milho 30F53VYHR**. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/milho/central-de-produtos/produtos/30f53vyhr>> Acesso: 09 de maio de 2019.

EMYGDIO, B. M. Cultivares do tipo varietal: opção para a pequena propriedade. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 650, p. 41,. 2004.

HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. **Plant disease: an advanced treatise. How plants defend themselves**. New York, Academic Press, v.5. 1980.

KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. 3ª edição. Ed. Ceres, 1997.

KUMAR S.; STECHER G.; LI M.; KNYAZ C.; TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** v. 35, p. 1547-1549, 2018.

KUMP K. L.; BRADBURY, P. J.; WISSER, R. J.; BUCKLER, E. S.; BELCHER, A. R.; OROPEZA-ROSAS, M. A.; ZWONITZER, J. C.; KRESOVICH, S.; McMULLEN, M. D.; WARE, D.; BALINT-KURTI, P. J.; HOLLAND, J. B. Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population. **Nature Genetics**, v. 43, p.163–168, 2011.

KUROSAWA, R. N. F.; VIVAS, M.; AMARAL JUNIOR, A. T.; RIBEIRO, R. M.; MIRANDA, S. B.; PENA, G. G.; LEITE, J. T.; MORA, F. Popcorn germplasm resistance to fungal diseases caused by *Exserohilum turcicum* and *Bipolaris maydis*. **Bragantia**, v. 77, n. 1, p. 36-47, 2018.

LABCLIMAGRI. Laboratório de Climatologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. **Série de dados meteorológicos**. 2019. Disponível em: <<http://www.labclimagri.ufsc.br/dados.html>> Acesso em: 13 de agosto de 2019.

LIM, S.M.; HOOKER, A. L Southern corn leaf blight: Genetic control of pathogenicity and toxin production in race T and race O of *Cochliobolus heterostrophus*. **Genetics** v. 69, p. 115–117, 1971.

MACHADO, A. T.; ARCANJO, J. N.; MACHADO, C. T. T.; NASS, L. L.; BETTERO, F. C. R. Mejoramiento participativo em maiz: su contribución em el empoderamiento comunitário em el município de Muqui, Brasil. **Agronomia Mesoamericana**, Costa Rica, v. 17, p. 393-405, 2006.

MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. **Studies in Micology**, v. 79, p. 221-288, 2014.

MARTINEZ-FRANZENER, A. S. **Avaliação do dano provocado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Marechal Cândido Rondon, 2006. 41 p.

MERCER, K.; PERALES, H. R.; WAINWRIGHT, J. D. Climate change and the transgenic adaptation strategy: Smallholder livelihoods, climate justice, and maize landraces in Mexico. **Global Environmental Change**, v. 22, p. 495-504, 2012.

MIRANDA, G. V.; SOUZA, L. V. de.; SANTOS, I. C. dos.; MENDES. Resgate de variedades crioulas de milho na região de Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, p. 1145 – 1148, 2007.

NIHEI, T. H., FERREIRA, J. M. Análise dialéctica de linhagens de milho com ênfase na resistência a doenças foliares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47: 369-377, 2012.

NIKS, R. E.; QI, X. Q.; MARCEL, T. C. Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 53, p. 445–470, 2015.

ODUM, E.P; BARRET, G.W. **Fundamentos de Ecologia**. 5. ed., Editora Thomson Pioneira, 2007. 616p

OGLIARI, J. B. **Identificação e localização de um gene de resistência de milho à *Xserothium turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. através do uso de marcadores microsatélites**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, 1999. 115p.

PACHECO, C. A. P.; GAMA, E. E. G.; GUIMARÃES, P. E. O.; SANTOS, M. X.; FERREIRA, A. S. Estimativas de parâmetros genéticos nas populações CMS-42 e CMS-43 de milho pipoca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 1995-2001, 1998.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. Vol. 1. Ceres, São Paulo, Brasil, v.1, p. 593-635, 2011.

PATERNIANI, E.; NASS, L.L.; SANTOS, M.X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. Em: UDRY, C.W.; DUARTE, W. (Org.) **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**, v. 15, p. 11 - 41, 2000.

PAVÃO A. R.; FILHO J. B. S. F. Impactos econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49 n.1, 2011.

PINHO, D. B.; MACHADO, A. R.; FIRMINO, A. L. Princípios e métodos para identificação molecular de fungos. Em: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2ª edição. Editora UFV, 2016. 516 p.

POLAND, J. A.; BALINT-KURTI, P. J.; WISSER, R. J.; PRATT, R. C.; NELSON, R. J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends Plant Sci**, v.14, p. 21–29, 2009.

POLAND, J. A.; BRADBURY, P. J.; BUCKLER, E. S.; NELSON, R. J. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. **Proc Natl Acad Sci** v. 108, p. 6893–6898, 2011.

SASSE, S. **Caracterização de variedades locais de milho provenientes de Anchieta-SC quanto à resistência a *Exserohilum turcicum***. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. 101 p.

SILVA, H. P., BARBOSA, M. P. M., NASS, L. L., CAMARGO, L. E. A. Capacidade de combinação e heterose para resistência a *Puccinia polysora* Underw. em milho. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 777 - 783, 2001.

SILVA, P. A. G. da. **Leveduras para o controle da helmintosporiose em Milho (*Zea mays*)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina. 2018. 87 p.

SILVEIRA, D. C.; BONETTI, L. P.; TRAGNAGO, J. L.; NETO, N.; MONTEIRO, V. Caracterização agromorfológica de variedade de milho crioulo (*Zea mays* L.) na região noroeste do Rio Grande do Sul. **Ver. Ciência e Tecnologia**, v. 1, n.1, p. 1-11, 2015.

SIVANESAN A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Mycological Papers** v. 158, p. 1–261, 1987.

STATSOFT. **Electronic Statistics Textbook**, 2007. Disponível em:  
<<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>>.

Syngenta. Portal Syngenta: **Status Viptera 3**, 2019. Disponível em:  
<<https://www.portalsyngenta.com.br/sementes-milho-status-viptera-3>> Acesso em:  
30 de abril de 2019.

TOJU, H.; TANABE, A.S.; YAMAMOTO, S.; SATO, H. **High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples**. PLoS ONE 7: e40863, 2012.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Em **PCR protocols a guide to methods and applications**, p. 315 - 322. Academic Press, San Diego, 1990.

WISSER, R. J.; KOLKMAN, J. M.; PATZOLDT, M. E.; HOLLAND, J. B.; YU, J. M.; KRAKOWSKY, M.; NELSON, R. J.; BALINT-KURTI, P.J. Multivariate analysis of maize disease resistances suggests a pleiotropic genetic basis and implicates a GST gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p.7339 - 7344, 2011.

YANG, Q.; BALINT-KURTI, P.; XU, M. Quantitative Disease Resistance: Dissection and Adoption in Maize. **Molecular Plant**, v. 10(3), p. 402 - 413, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.02.004>

ZHAO, Y.; LU, X.; LIU, C.; GUAN, H.; ZHANG, M.; LI, Z.; CAI, H.; LAI, J. Identification and fine mapping of rhm1 locus for resistance to southern corn leaf blight in maize. **J. Integr. Plant Biol.** v. 54, p. 321 - 329, 2012.

## **6 CAPÍTULO 2 – MECANISMOS DE DEFESA ENVOLVIDOS COM A RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE MILHO A *Bipolaris maydis***

### **6.1 INTRODUÇÃO**

O milho é uma gramínea domesticada e cultivada há milhares de anos e a planta tem evoluído ao mesmo tempo em que os patógenos da cultura. Pela alta demanda do produto para os mais diversos fins, é uma espécie cultivada em praticamente todos os continentes. Muitos patógenos acometem os cultivos de milho. Porém, uma das doenças mais antigas e importantes dessa cultura é causada pelo fungo *Bipolaris maydis* e recebe o nome de helmintosporiose ou mancha foliar de bipolaris. Assim como a cultura, a doença está espalhada em todas as regiões do planeta e tem alto potencial destrutivo (BORÉM, 1999; KIMATI et al., 1997).

O patógeno causa lesões foliares alongadas, inicialmente cloróticas, que necrosam com o passar do tempo. Algumas raças podem provocar sintomas em outros locais das plantas, como bainha, bráctea e espiga. O fungo sobrevive na planta viva e nos restos de cultura. A raça T ainda tem a possibilidade de disseminação pelas sementes, que dão origem a plântulas sintomáticas. Em condições ambientais favoráveis, o patógeno é capaz de causar grandes perdas na produção (KIMATI et al., 1997; CHAGAS et al., 2015).

O principal método de controle da helmintosporiose é o uso de genótipos resistentes. A resistência genética vegetal tem sido a principal forma de controle de diversas doenças em várias culturas (LEACH et al., 2014). Neste patossistema, a aplicação de fungicidas não é completamente eficiente e economicamente só é viável em campos de produção de sementes (KIMATI et al., 1997; GIANASI et al., 1996).

Os mecanismos de defesa formados após o contato da planta com o patógeno podem estar ausentes ou em um nível muito inferior antes da infecção. Entre estes mecanismos de defesa, destacam-se os estruturais que impedem a entrada ou colonização através de barreiras físicas (PASCHOLATI, 2011). Possivelmente estas barreiras estão envolvidas com a capacidade do patógeno germinar sobre a superfície foliar, lançar tubo germinativo e formar apressórios. Exemplos de mecanismos estruturais são modificações estomáticas, presença de tricomas e parede celular espessa. Uma estratégia de defesa do trigo contra o fungo

*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* é descrita no trabalho clássico de Hart (1929), onde a planta abre os estômatos no escuro, pois o patógeno somente consegue penetrar pelos estômatos sob condições de luminosidade, pois é sensível a CO<sub>2</sub>.

Outros mecanismos podem apresentar importância na resistência vegetal. Plantas de cevada apresentam modificações na parede celular e acúmulo de calose após o ataque por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (CHOWDHURY et al., 2014). Algumas gramíneas formam halos e papilas em resposta à penetração fúngica, como por exemplo, em trigo contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (DEACON & LEWIS, 1986) ou em milho contra *Colletotrichum graminicola* (SHERWOOD et al., 1987).

Já os mecanismos bioquímicos de defesa são representados por compostos com ação antimicrobiana ou que podem, por exemplo, reforçar a parede celular (HOAGLAND, 1990; CHANG et al., 2008).

A síntese de substâncias como as fitoalexinas estão diretamente ligadas à resistência vegetal e já foram identificadas em várias gramíneas, como arroz, sorgo, trigo, cevada e milho (PASCHOLATI, 2011). Enzimas como as peroxidases têm sido associadas ao processo de polimerização e síntese de lignina, que conferem maior resistência física à penetração fúngica. Aumentos na atividade de fenilalanina amônia-liase e acúmulo de compostos fenólicos também estão envolvidos com a síntese de fenóis e lignina, principais formadores de barreiras físicas contra infecções. A lignificação ainda torna as células mais resistentes ao ataque de enzimas do patógeno, diminuindo a difusão das toxinas lançadas pelo ataque à planta, como ocorre no patossistema trigo e *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (PRUSKY et al., 1996; MOERSCHBACHER et al., 1986).

Contudo, sabe-se que nem sempre um mecanismo sozinho é responsável pela resistência, mas sim o somatório dos mecanismos agindo de forma conjunta contra o patógeno (MISAGHI et al., 1982).

Apesar da importância da resistência genética vegetal para o controle da helmintosporiose em milho, ainda há poucos trabalhos na literatura onde se avaliou o modo como ocorre essa resistência. Neste sentido, este capítulo objetivou elucidar alguns mecanismos, estruturais e/ou bioquímicos, que possivelmente estão associados com a resistência de milho ao fungo *B. maydis*.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Planta, patógeno e avaliação da doença

A partir dos resultados do capítulo anterior, foram selecionados quatro genótipos contrastantes quanto à resistência a *B. maydis*: P1630H e Colorado como genótipos suscetíveis e AG3700 e 30K75Y como medianamente resistentes.

Plantas de milho desses quatro genótipos foram cultivadas em casa de vegetação e ao atingirem o estágio fenológico V4 foram inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>). O patógeno *B. maydis* foi obtido a partir de plantação de milho localizada em Florianópolis, isolado e identificado conforme item 3.2.1. Foram realizadas cinco repetições para cada genótipo, onde um vaso contendo duas plantas se constituiu a unidade experimental.

Para a avaliação da intensidade da doença, foram atribuídas notas para os sintomas de helmintosporiose, com base em um escala de notas (Tabela 1). Além disso, foi avaliada a severidade média de cada genótipo, com base na escala diagramática adaptada de Martinez-Franzener (2006) (Figura 1). As lesões foram mensuradas com paquímetro, dez lesões por planta.

### 6.2.2 Análises microscópicas

Plantas das cultivares P1630H, Colorado, AG3700 e 30K75Y foram cultivadas em casa de vegetação. Ao atingirem o estágio de desenvolvimento V4 foram cortados fragmentos de 10 cm da porção média das terceira e quarta folhas. Dois fragmentos foram acondicionados sobre papel filtro umedecido com 5 mL de água destilada em caixas gerbox, com a face adaxial voltada para cima. Uma caixa gerbox com dois fragmentos de folha foi considerada uma repetição. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento. Sobre cada fragmento foram pipetadas 10 gotas (1 gota = 10 µL) de suspensão de conídios de *B. maydis* ( $1 \times 10^4$  conídios.mL<sup>-1</sup>) separadas equidistantemente sobre o limbo foliar.

Após 24 h foram seccionados fragmentos, com 1 cm<sup>2</sup>, contendo uma gota do inóculo. Estes pequenos fragmentos foram colocados em solução de clareamento de Etanol:Ácido Acético (3:1 v/v). Esta solução foi trocada uma vez por dia durante três dias, conforme adaptação de Stadnik & Buchenauer (2000).

Para realizar a análise do processo infeccioso foi realizada montagem de lâminas contendo fragmentos já totalmente descoloridos de cada um dos tratamentos e coloração com 50 µL de solução de azul de anilina (0,05% em tampão fosfato de potássio 0,06 M pH 8,0), coberto com lamínula para posterior observação no microscópio óptico (modelo DM500 Leica®). Foi realizada a contagem de 150 conídios por repetição, contabilizando-se a porcentagem de conídios germinados e conídios que apresentaram formação de duplo apressório (adaptado de BORSATO, 2009).

Para observação da formação de calose, fragmentos totalmente descoloridos foram submetidos a solução de calcofluor (Calcofluor White MR2) (0,01%) cinco a dez minutos antes da observação no microscópio de fluorescência (modelo Nikon-Eclipse 50i, Nikon®, Melville, NY). As observações foram feitas sob luz UV (excitação de 330 a 380 nm com filtro de barreira de 420 nm). Foram analisados três fragmentos por repetição, cinco repetições por tratamento, para contagem do número de pontos de fluorescência (caloses) por cm<sup>2</sup> (adaptado de HUGHES & McCULLY, 1975).

### 6.2.3 Análises bioquímicas

Para determinação da atividade das enzimas peroxidase, fenilalanina-amônia-liase e lipoxigenase, compostos fenólicos totais e flavonoides foi conduzido um experimento com as cultivares P1630H, Colorado, AG3700 e 30K75Y. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e ao alcançarem o estágio de desenvolvimento V4 foram inoculadas por aspersão com *B. maydis* (1 x 10<sup>3</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>) e permaneceram em condição de câmara úmida escura durante 24 h. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento (genótipo), e a unidade experimental foi representada por um vaso contendo duas plantas.

Para as análises bioquímicas, foram realizadas coletas às 0 h (minutos antes da inoculação), 36, 72, 108 e 144 h após a inoculação. Cada amostra consistiu em duas folhas (terceira e quarta folhas). As folhas foram cortadas com auxílio de tesoura, imediatamente colocadas em envelopes plásticos e mantidas no gelo durante a coleta. As folhas foram maceradas com nitrogênio líquido e o pó armazenado em tubos falcon de 50 mL a -80°C até o momento das análises. Cada

análise foi realizada em duplicata, sendo utilizado o valor médio de cada duplicata para análise dos resultados. As leituras de absorbância foram realizadas em leitor de microplaca (SpectraMax® Paradigm Multi-Mode, Microplate Reader).

As atividades das enzimas e os teores dos fenóis foram quantificados e comparados a cada tempo de coleta foliar. Posteriormente, a partir dos resultados obtidos ao longo dos tempos de avaliação, foi calculada a área abaixo da curva de progresso de cada enzima ou composto (AACPEC) para as cultivares.

$$\text{AACPEC} = \sum_i^{n-1} \{ [(x_i + x_{i+1})] \times [(t_{i+1} - t_i)] / 2 \}$$

onde, n é o tempo de coleta, x é o valor da enzima/composto e  $[t_{i+1}-t_i]$  é o intervalo de avaliações consecutivas.

#### 6.2.3.1 Determinação da atividade da peroxidase

A metodologia foi adaptada de Hammerschmidt et al. (1982). Para proceder com a análise foi necessário preparar um extrato proteico. Para tanto, foi misturado 150 mg de tecido vegetal macerado com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0), contendo ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA 1 mM) e polivinilpirrolidona (PVPP 0,1%). Esta mistura foi centrifugada a 18.000 g durante 30 min a 4°C e ao final deste processo o sobrenadante (extrato proteico) foi retirado.

Para reação, foi preparado tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0), contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM. A reação foi realizada em duplicata, em microplaca de poliestireno de 96 poços. Para tanto foi colocado 5 µL de extrato proteico acrescido de 295 µL do tampão de reação.

A atividade da enzima foi avaliada por espectrofotometria, através da conversão de guaiacol em tetraguaiacol. Os valores de absorbância foram anotados a cada 30 s, durante 3 min (470 nm). Os valores foram expressos em densidade óptica (D.O 470 nm/mg proteína/minuto).

#### 6.2.3.2 Determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase

A metodologia foi adaptada de Fálcon et al. (2008). Para tanto, foram misturados 100 mg de tecido foliar macerado com 1,5 mL de tampão borato de sódio

(25 mM, pH 8,8), contendo EDTA (1 mM) e PVPP (0,1%). A mistura foi centrifugada a 18.000 g durante 30 min a 4°C e o sobrenadante (extrato proteico) foi recolhido.

Para reação, foi preparado tampão borato de sódio (100 mM, pH 8,8), contendo fenilalanina (50 mM). A reação ocorreu em tubo eppendorf, no qual foram colocados 50 µL do extrato proteico e 450 µL do tampão de reação. Essa mistura foi incubada a 40°C durante 1 h. Passado esse período, foram adicionados a cada tubo 200 µL de ácido clorídrico (HCl 5N) e os tubos foram submetidos a banho de gelo durante 5 min para interromper a reação. Por fim, adicionaram-se 300 µL de água destilada a cada amostra.

A atividade da enzima foi avaliada por espectrofotometria *end point* (290 nm), com resultados expressos em nmol de ácido transcinâmico formado/mg de proteína/minuto. A curva padrão do ácido trans-cinâmico foi mensurada de 0 - 100 µg/mL.

#### 6.2.3.3 Determinação da atividade da lipoxigenase

A metodologia foi baseada em Axelrod et al. (1981). Inicialmente foi preparada uma solução de linolato de sódio 10 mM, que ficou armazenado a -20°C até o momento do uso. O extrato proteico foi feito com a mistura de 100 mg de tecido foliar macerado com tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0), contendo cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub> 20 mM). A mistura foi centrifugada a 5.500 g durante 10 min a 4°C e o sobrenadante (extrato proteico) foi recuperado.

A reação ocorreu em microplaca de poliestireno de 96 poços. O tampão de reação foi tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,5). Na microplaca foram colocados 5 µL do extrato proteico, adicionado de 250 µL de tampão de reação e por fim 20 µL da solução de linolato de sódio 10 mM.

A atividade da enzima foi avaliada por espectrofotometria com leituras de 20 em 20 s, durante 1 min (234 nm), através da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado. Foi quantificado o aumento na absorbância ao longo de 1 min e os resultados foram expressos em D.O 234 nm/mg proteína/minuto.

#### 6.2.3.4 Determinação de proteínas totais

Para expressão dos resultados das três enzimas analisadas foi necessário fazer a determinação da quantidade de proteínas totais por amostra. As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Foi colocado em microplaca 20  $\mu\text{L}$  de extrato proteico (o mesmo extrato utilizado para determinação da atividade de peroxidase) e adicionado 260  $\mu\text{L}$  de reagente concentrado Bradford®. Após cinco minutos foi realizada a leitura da absorbância (595 nm). A concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em  $\mu\text{g}$  de albumina de soro bovino (BSA/mL) de amostra, utilizando a curva padrão de concentrações de BSA (0 - 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 6.2.3.5 Quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides

O extrato metanólico para quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides foi feito a partir da mistura de 200 mg de tecido foliar macerado com adição de 1,5 mL de metanol acidificado (metanol:HCl 80:1 v/v, pH 2,0). Essa mistura permaneceu incubada no escuro em temperatura ambiente durante uma hora. Após esse período foi feita a centrifugação 3.000 g por 5 min. O sobrenadante (extrato metanólico) foi recuperado.

Para quantificação de compostos fenólicos totais foi empregada a metodologia descrita por McCue (2000). Em um tubo eppendorf foi adicionado 110  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico, 110  $\mu\text{L}$  de metanol 95% (nesta etapa os tubos foram levemente agitados), 220  $\mu\text{L}$  de etanol 95%, 220  $\mu\text{L}$  de água destilada, 110  $\mu\text{L}$  do corante Folin-Ciocalteu. Após 5 min, foi adicionado 220  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5%). As amostras ficaram incubadas por mais 1 h no escuro em temperatura ambiente e por fim foi feita a leitura da absorbância (725 nm). Os resultados foram expressos em equivalentes ácido gálico/mg massa foliar fresca ( $\mu\text{gEAG}/\text{mgMF}$ ).

Para quantificação de flavonoides foi utilizada metodologia adaptada de Zacarias (2007). Em um tubo eppendorf foi colocado 145  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico, 710  $\mu\text{L}$  de etanol 99% e 145  $\mu\text{L}$  de solução cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$  2%) em metanol. Os tubos foram levemente agitados e incubados no escuro em temperatura

ambiente. A leitura da absorbância (420 nm) foi realizada e os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina/mg de massa foliar fresca ( $\mu\text{gEQ/mgMF}$ ).

#### **6.2.4 Análises estatísticas**

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado. Os resultados, quando homogêneos, foram submetidos a análise de variância e quando o  $F < 0,05$  significativo, seguiu-se com o teste de separação de médias, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no *software* Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Paralelamente às coletas para análises bioquímicas foi realizada a avaliação da doença helmintosporiose nas plantas de milho. Corroborando com os resultados do primeiro capítulo, observou-se que a cultivar P1630H apresentou as maiores médias de severidade, seguida da Colorado. Já as cultivares 30K75Y e AG3700 apresentaram as menores médias nas avaliações de severidade e tamanho de lesão.

Isso refletiu na avaliação das notas, na qual a menor nota foi observada para a cultivar 30K75Y, seguida da cultivar AG3700 e as maiores notas foram observadas para P1630H e Colorado (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da doença helmintosporiose (*B. maydis*). Inoculação  $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

Genótipo	Notas	Severidade	Tamanho da Lesão	
			Comp. (mm)	Larg. (mm)
Colorado	5	19,8 ± 6,4 a	5,8 ± 2,3 ab	1,14 ± 0,19 ab
P1630H	5	22,3 ± 8,7 a	6,4 ± 2,1 a	1,20 ± 0,25 a
AG3700	4	15,6 ± 4,9 b	4,5 ± 1,8 bc	1,16 ± 0,24 ab
30K75Y	3	8,5 ± 3,2 c	3,9 ± 1,7 c	1,01 ± 0,02 b

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas apresentam diferença significativa de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Onde não há letras significa que o teste F não foi significativo. Temperatura média (mínima e máxima): 22,1°C (13,3 – 33,3°C).

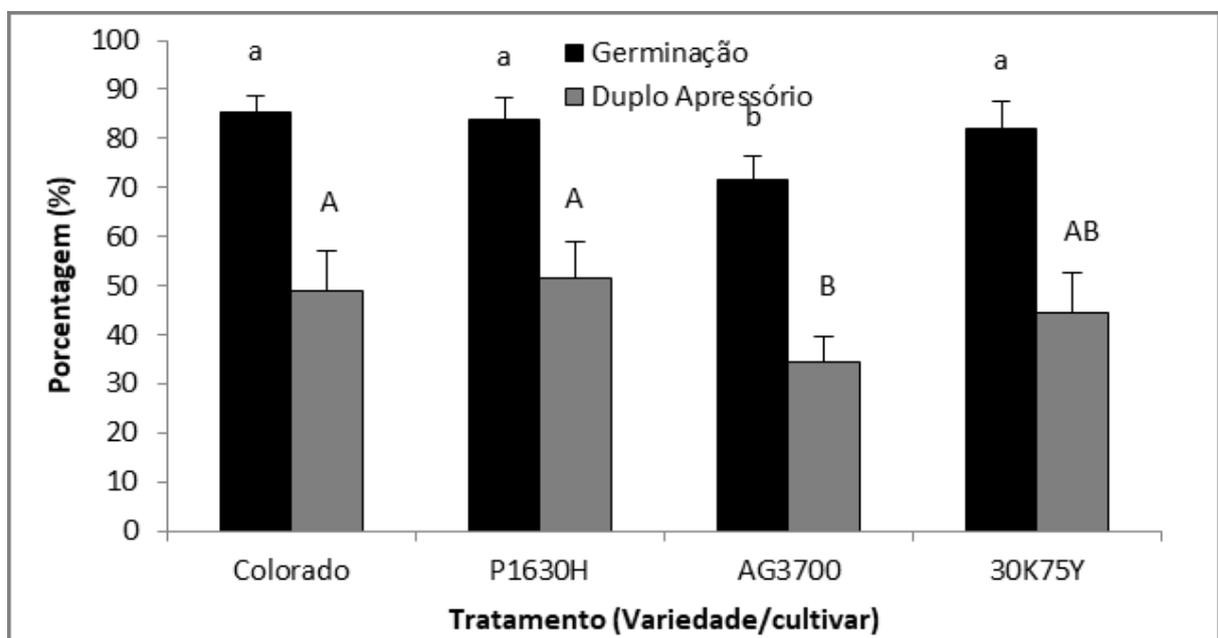
Esta avaliação mostrou-se coerente com os resultados do capítulo anterior. Constatou-se que AG3700 e 30K75Y apresentam maior nível de resistência entre os genótipos testados.

Posteriormente, apresentam-se os resultados dos testes para tentar elucidar os mecanismos de ação possivelmente envolvidos com a resistência ao patógeno nestes quatro genótipos.

O primeiro teste de microscopia avaliou o processo infeccioso, através da porcentagem de conídios germinados e com germinação pelas duas extremidades, além da formação de duplo apressório sobre as folhas das diferentes cultivares analisadas.

Observaram-se médias de germinação de conídios de 85,3%, 83,8% e 82,1% sobre as folhas das cultivares Colorado, P1630H e 30K75Y, respectivamente. A cultivar AG3700 diferiu estatisticamente das demais cultivares, onde foi observada germinação de conídios média de 71,4%. Com relação à formação de duplos apressórios as cultivares Colorado e P1630H mantiveram as maiores médias (48,8 e 51,6%.) e AG3700 manteve a menor média (34,3%) (Figura 5).

Figura 5 - Porcentagem de germinação e de formação de duplos apressórios de *B. maydis* sobre folhas de diferentes cultivares de milho.



Médias seguidas por letras diferentes nas colunas apresentam diferença significativa de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas: representam diferenças na formação de duplos apressórios. Letras minúsculas: representam diferenças na germinação de conídios.

A capacidade de um fungo fitopatogênico formar apressórios é descrita por Pascholati (2011) como um mecanismo de grande importância no processo de infecção, pois é através dele que o micro-organismo consegue se fixar na superfície foliar e penetrar diretamente sobre a cutícula.

A planta por sua vez conta com diversos mecanismos que podem auxiliar na defesa contra a infecção. Entre esses mecanismos, destacam-se os mecanismos estruturais, dos quais a cutícula é um exemplo. Trata-se de uma camada lipídica que

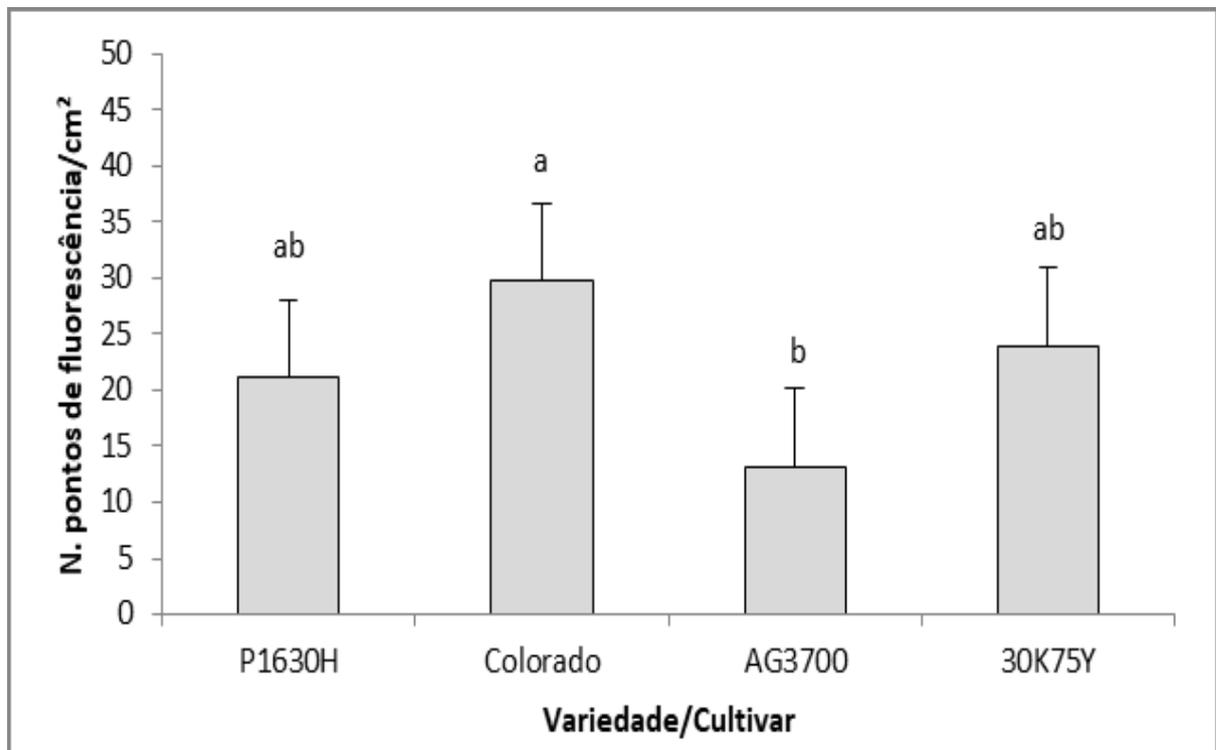
recobre as células, composta de ceras e cutina. Há formação inclusive de substâncias tóxicas na cutícula, já relatadas em macieiras, algodoeiros e fumo. Além disso, a espessura da cutícula pode contribuir na resistência das plantas contra patógenos que penetram diretamente em tecidos do hospedeiro, como é o caso de *B. maydis*. Outros mecanismos podem interferir na germinação e formação de apressórios, como por exemplo, o número e a morfologia dos estômatos, presença de pelos e tricomas e parede celular espessa (PASCHOLATI, 2011).

Há também a possibilidade da planta se defender, ativando seus mecanismos de defesa depois do contato com o patógeno. Exemplos desse tipo de defesa são: formação de halos e papilas, calose, fortalecimento da parede celular (lignificação), além de mecanismos bioquímicos de defesa, como síntese de fitoalexinas, que são compostos antimicrobianos ou antifúngicos, ou mesmo síntese de espécies reativas de oxigênio (PAXTON, 1981; PASCHOLATI, 2011).

Todos esses mecanismos podem auxiliar no atraso ou mesmo na inibição da germinação de conídios e formação de apressórios, o que está diretamente relacionado à infecção e consequente manifestação de sintomas da doença. Nesta avaliação, o resultado corroborou com a manifestação de sintomas nas plantas, pois, a cultivar AG3700, na qual o fungo teve maior dificuldade para germinar, foi considerada uma das mais resistentes dentre os genótipos testados, juntamente com 30K75Y. Este resultado sugere que há mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos atuando sobre a resistência das cultivares de milho AG3700 e 30K75Y à *B. maydis*, contudo para saber com precisão qual é este mecanismo, estudos mais aprofundados fazem-se necessários.

No segundo teste foram observados pontos fluorescentes próximos aos apressórios e de formatos distintos. Observou-se que a cultivar Colorado apresentou o maior número de pontos fluorescentes/cm<sup>2</sup>, diferindo-se significativamente da cultivar AG3700, que apresentou a menor média (Figura 6).

Figura 6 - Pontos de fluorescência em folhas de diferentes cultivares de milho em resposta à inoculação com *B. maydis*.



Letras diferentes nas colunas representam diferença estatística entre os tratamentos de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Há uma hipótese de que os pontos de fluorescência podem estar relacionados à formação de papilas. As papilas são formadas de material heterogêneo, constituídas de calose ( $\beta$  1,3 glucanas), podendo conter também lignina, derivados de compostos fenólicos, celulose, silício ou suberina, e se apresentam no sítio de infecção (PASCHOLATI, 2011). O mesmo autor ainda afirma que a formação de papilas é comum em folhas de gramíneas em resposta à presença fúngica, como por exemplo em milho e *E. turcicum*, *Colletotrichum graminicola* e *B. maydis*. Contudo o papel desta estrutura na resistência das plantas contra fitopatógenos não está totalmente elucidado.

Há outra hipótese de que a interação entre o patógeno e as células vegetais possa sintetizar substâncias resultantes da germinação e consequente penetração, como mucilagens, por exemplo. Isso explicaria porque houve maior observação de pontos fluorescentes na cultivar Colorado, considerada suscetível e menos pontos na cultivar AG3700 classificada como medianamente resistente. Pois, como

constatado na Figura 5, a cultivar Colorado apresenta maior germinação e formação de duplos apressórios do que a cultivar AG3700.

Contudo, a metodologia escolhida para avaliar a formação de calose foi a de calcofluor, um corante não específico. Sendo assim, não é possível afirmar com exatidão do que se tratavam os pontos de fluorescência, podendo ser celulose, polissacarídeos carboxilados, glucanas, pectinas ou alguns polissacarídeos de mucilagens (ALFENAS & MAFIA, 2007).

Desta forma, sugere-se em estudos futuros a utilização de outras metodologias específicas para avaliar estruturalmente e de forma específica, por exemplo, a calose (papilas), mas também mucilagens, lignina e compostos fenólicos.

As plantas apresentam mecanismos bioquímicos para se defender do ataque de patógenos. Neste sentido, relaciona-se o aumento da atividade de proteínas relacionadas à patogênese e síntese de fitoalexinas com a resistência vegetal. Um exemplo em milho foi descrito por Silva (2018) que observou aumentos na atividade de enzimas como peroxidases e fenilalanina amônia-liases em plantas elicidadas com *Saccharomyces cerevisiae*, as quais também apresentaram as menores severidades de helmintosporiose (*B.maydis*).

No presente estudo foi realizado um controle não inoculado para cada tempo de coleta. Porém, o fator inoculação não foi significativo e considerou-se o experimento não fatorial. Observou-se que em relação à atividade cinética da peroxidase, a análise de variância indicou diferença significativa entre as cultivares, dentro do tempo de coleta 36 horas. Os maiores valores específicos de atividade desta enzima foram observados na cultivar medianamente resistente AG3700 que diferiu estatisticamente da cultivar suscetível P1630H (Figura 7A). Além disso, observou-se que ao longo do tempo, a cultivar AG3700 apresentou maior atividade de peroxidases, enquanto P1630H apresentou menor atividade. Isto ficou evidenciado pelo cálculo da área abaixo da curva de progresso da enzima ou composto (AACPEC), na qual houve diferença significativa entre estes dois genótipos (Tabela 9).

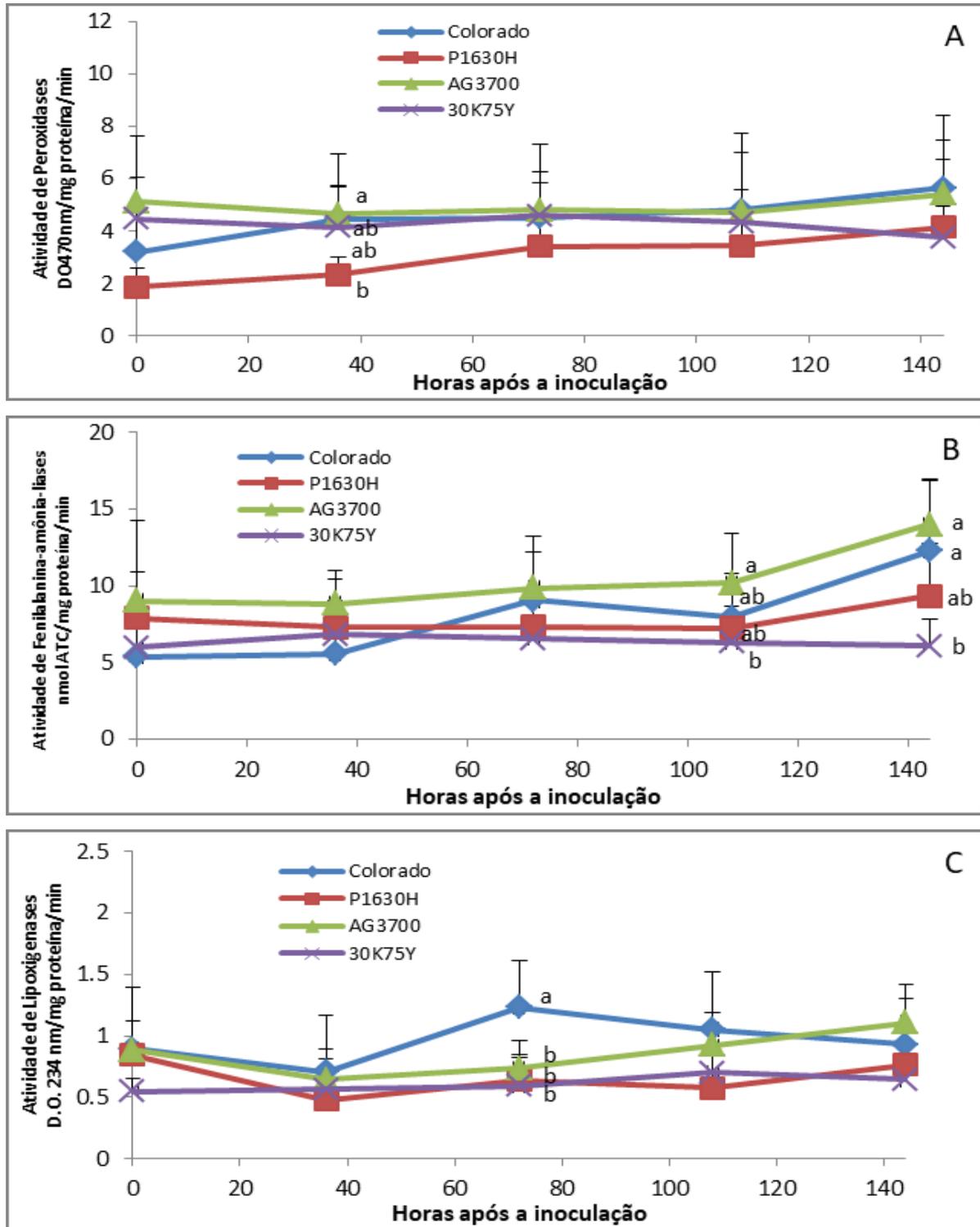
Em se tratando da fenilalanina amônia-liase, só foi observado diferenças estatísticas significativas a partir das 108 horas após a inoculação. A atividade específica da FAL foi maior na cultivar AG3700, enquanto que 30K75Y apresentou a menor atividade às 108 horas após a inoculação. Às 144 horas após a inoculação, houve um aumento da atividade nas cultivares AG3700 e Colorado, ambas diferiram

significativamente da cultivar 30K75Y, ao passo que nestes dois tempos a cultivar P1630H apresentou atividade específica intermediária entre as demais cultivares testadas (Figura 7B). Ao longo do tempo AG3700 apresentou maior atividade da FAL em relação aos demais genótipos analisados (Figura 7B e Tabela 9).

No caso da enzima lipoxigenase, foi observada diferença estatística significativa somente no tempo de coleta 72 horas após a inoculação. A cultivar Colorado apresentou a maior atividade específica da LOX, em relação às demais cultivares testadas (Figura 7C).

A análise da AACPEC foi realizada porque se observou que nos gráficos da atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase a curva da cultivar medianamente resistente AG3700 manteve-se maior que as curvas das demais cultivares.

Figura 7 - Atividade de peroxidases (A); Fenilalanina amônia-liases (B); Lipoxigenases (C); em folhas de diferentes cultivares de milho inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>).



Letras diferentes dentro dos tempos de coleta representam diferença estatística entre as cultivares de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Tabela 9 - Área abaixo da curva de progresso da enzima ou composto (AACPEC) das diferentes cultivares de milho.

Cultivar	AACPEC				
	POX *	FAL *	LOX	CFT	FLA
Colorado	624,2 ± 204,8 ab	1025,4 ± 178,2 b	166,9 ± 57,5	319,9 ± 13,4	203,2 ± 28,8
P1630H	387,9 ± 32,6 b	1039,8 ± 224,6 b	96,1 ± 32,7	341,4 ± 46,3	183,1 ± 38,0
AG3700	693,7 ± 172,1 a	1445,2 ± 202,2 a	124,2 ± 31,4	333,5 ± 66,5	169,0 ± 28,8
30K75Y	668,4 ± 110,9 ab	922,1 ± 86,8 b	98,4 ± 16,6	297,5 ± 9,2	192,4 ± 18,9

Legenda: POX: peroxidase; FAL: fenilalanina amônia liase; LOX: lipoxigenase; CFT: compostos fenólicos totais; FLA: flavonoides. Letras diferentes nas colunas representam diferença estatística entre as cultivares de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Onde não há letras significa que o teste F não foi significativo.

Diversas revisões recentes apresentam discussões sobre a resistência qualitativa e quantitativa com base genética e molecular (YANG et al., 2017). Sendo assim, esperava-se que as diferentes cultivares de milho, com diferentes bases genéticas, apresentassem diferença na resistência ao patógeno *B. maydis*, o que foi comprovado neste trabalho.

A presença de um patógeno efetor pode desencadear uma resposta de defesa chamada de imunidade desencadeada por efetor. As PR-Proteínas estão frequentemente associadas à resistência qualitativa (DODDS & RATHJEN, 2010). Poland et al. (2009) também destacam a hipótese de que a resistência quantitativa baseia-se na regulação da morfologia da planta, dos estágios de desenvolvimento, além da síntese de substâncias químicas e rápida transdução dos sinais de defesa. Uma baixa resistência desencadeada pelo patógeno pode ocorrer pelas PR-proteínas que foram superadas.

Entre as principais respostas bioquímicas de defesa das plantas destacam-se as fitoalexinas e as proteínas relacionadas à patogênese (TAIZ & ZEIGER, 2004; DURRANT & DONG, 2004). Também é comum o aumento de algumas enzimas como as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (CAVALCANTI et al., 2005).

O aumento ao longo do tempo da atividade das enzimas peroxidases (POX) e fenilalanina amônia-liases (FAL) na cultivar AG3700 mostra que possivelmente ocorra a síntese de lignina nas cultivares medianamente resistentes. Pois, tanto POX

quanto FAL estão relacionadas com o processo de lignificação. Isto corrobora a hipótese inicial de que os genótipos mais resistentes tem maior atividade de PR-proteínas.

As peroxidases são enzimas envolvidas com o processo de lignificação. A peroxidase polimeriza álcool na presença de peróxido de hidrogênio, levando à síntese de lignina. Durante a fase inicial da lignificação da parede primária de células vegetais, a peroxidase também tem função importante (BELL et al., 1981; WHITMORE et al., 1978).

A FAL é a enzima chave que converte a fenilalanina em ácido trans-cinâmico, que por sua vez pode ser incorporado em compostos fenólicos que estão presentes na formação de flavonoides e lignina. Além disso, a FAL está diretamente ligada à rota dos fenilpropanoides necessários para que haja formação de lignina. A lignina confere maior resistência às paredes celulares vegetais e melhora a resistência da planta ao patógeno (VANCE; KIRK & SHERWOOD, 1980).

Desta forma, as enzimas POX e FAL juntas desempenham uma importante função na biossíntese de lignina. Pode-se dizer que o aumento dessas enzimas nos tecidos vegetais induzem diretamente o aumento de lignina em plantas que sofreram infecção (BELL et al., 1981; ASCENSÃO & DUBERY, 2000).

A lignina é um polímero aromático composto de alcoóis cinamílicos que tem como origem o ácido trans-cinâmico. Esse polímero constitui uma barreira estrutural que pode inibir a infecção de fitopatógenos e evitar que as toxinas do patógeno se espalhem no meio extracelular (MANDAL & MITRA, 2007).

As peroxidases ainda eliminam radicais livres, que são tóxicos a microorganismos, em explosão oxidativa (VAN LOON & VAN STREIN, 1999). O que causa a explosão oxidativa é o acúmulo das espécies reativas de oxigênio e corresponde a uma rápida resposta que leva a formação de vários íons oxigênio e peróxido de hidrogênio. O aumento das espécies reativas de oxigênio leva ao efeito de fortalecimento da parede celular, além de poder atuar como sinalizador para ativar genes de resistência (TORRES & DANGL, 2005).

Acredita-se que a resistência das cultivares AG3700 e 30K75Y esteja relacionada ao aumento de PR-proteínas, pois foram estas as cultivares com maior nível de resistência observadas ao longo deste estudo, e justamente as que apresentaram maior atividade de peroxidase e fenilalanina amônia-liase. Pascholati (2011) comentou que plantas expressando genes codificadores de PR-proteínas,

como quitinases e glucanases, exibem aumento na resistência contra fitopatógenos. Caruso et al. (2001) comprovaram em seu trabalho que as peroxidases desempenham função na defesa contra fitopatógenos de grãos de trigo. Souza et al. (2003) observaram que linhagens resistentes ao mosaico comum do milho expressaram maior atividade de peroxidase. Latha et al. (2009) testaram bioformulações de rizobactérias promotoras de crescimento para induzir resistência em tomateiros contra *Alternaria solani* e observaram que houve aumento significativo na atividade da FAL. Silva (2018) ainda observou que as plantas de milho (cv. P1630H) elicitadas com *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram menor severidade de helmintosporiose (*B. maydis*) e eram as mesmas plantas que tinham as atividades de peroxidase e fenilalanina amônia-liase mais elevadas, demonstrando a importância destas enzimas na resistência do milho.

Foi observado ao longo deste estudo que o aumento da POX ocorreu às 36 horas após a inoculação, enquanto que o aumento da FAL só foi evidenciado às 108 e 144 horas após a inoculação. Donald & Cipollini (1998) explicam que os vegetais sintetizam peroxidases contra as mais diversas situações de estresse e frequentemente, estas são as primeiras enzimas a aumentarem sua atividade. Porém, com a ativação de outros mecanismos essa enzima pode suspender sua atividade.

De modo geral, o ataque de patógenos biotróficos aciona a rota do ácido salicílico (onde atuam as enzimas POX, FAL, entre outras), enquanto que os patógenos necrotróficos acionam a rota do ácido jasmônico e etileno (CAMARGO, 2011). Contudo, dependendo do patossistema é possível que as duas rotas ocorram simultaneamente. Neste sentido, a atividade da LOX foi avaliada por se tratar de uma enzima da via do ácido jasmônico e etileno.

Além da POX e FAL, as lipoxigenases (LOX) também estão associadas à resistência vegetal (YAN et al., 2002). Diversos sistemas enzimáticos e não enzimáticos podem estar envolvidos na síntese de espécies reativas de oxigênio, entre as enzimas destacam-se entre outras, as lipoxigenases (BOLWEL & WOJTASZEK, 1997). A função das lipoxigenases é a catálise da dioxigenação de ácidos graxos poli-insaturados para formação de hidroperóxidos, que originam moléculas reativas e culminam com a formação de ácido jasmônico dentro da rota bioquímica octadecanoide (FARMER & RYAN, 1992). Nas plantas, o ácido linoleico

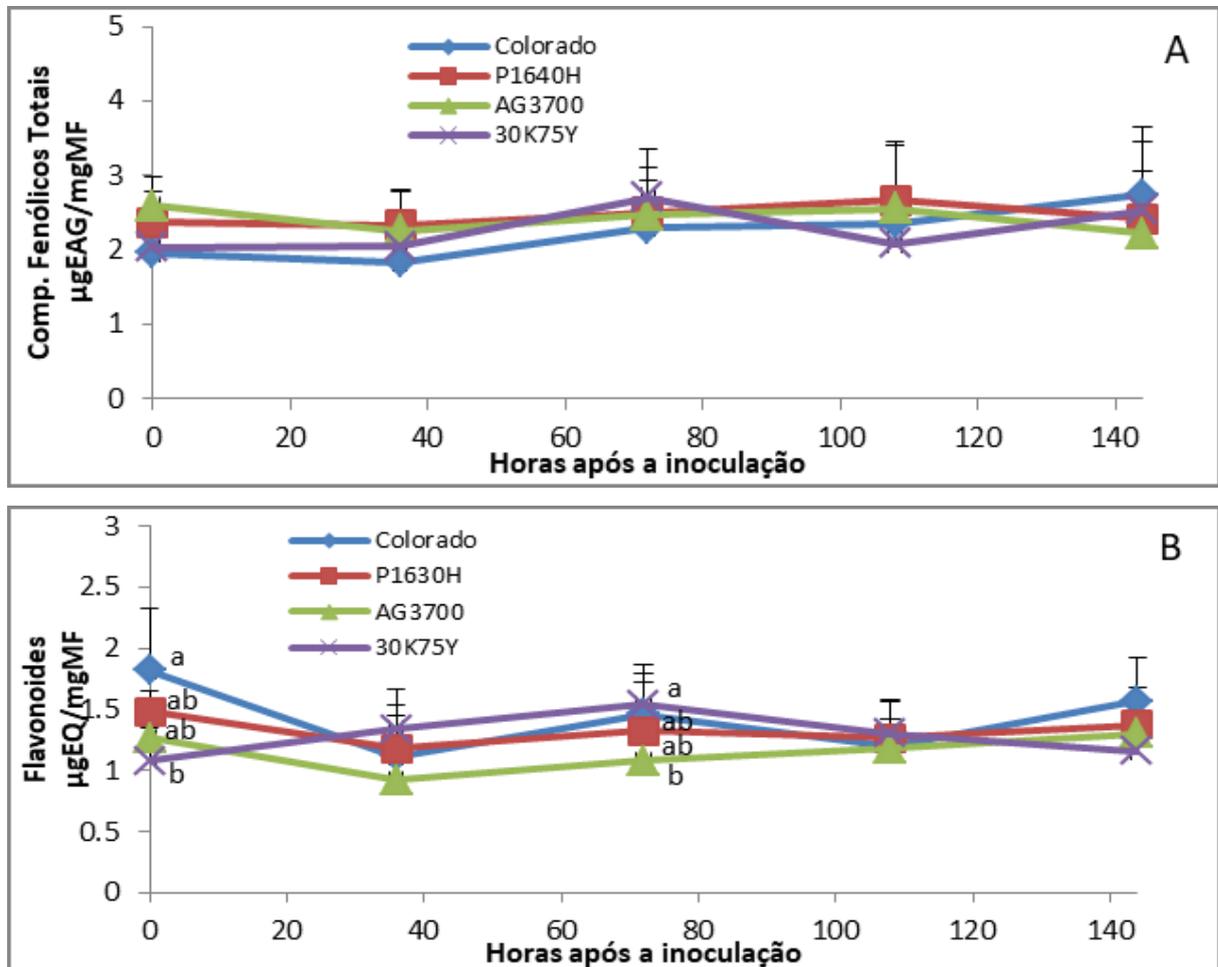
e o ácido linolênico atuam como substratos e os produtos dessa via estão ligados ao desenvolvimento e a defesa vegetal, reduzindo os danos causados por patógenos (SOARES & MACHADO, 2007; FEUSSNER & WASTERACK, 2002).

Apesar disso, somente a cultivar Colorado, classificada como suscetível à *B.maydis* apresentou atividade mais elevada que os demais genótipos às 72 horas após a inoculação. Nos demais tempos a atividade da LOX não apresentou diferença entre as cultivares testadas. Isto sugere que a LOX não esteve envolvida com a resistência neste patossistema e com as cultivares testadas.

Os resultados da análise de compostos fenólicos totais não permitiu diferenciar que uma das cultivares possuía mais fenóis que outras. Todas as médias, de todas as cultivares em todos os tempos de coleta, apresentaram valores médios entre 1840 e 2735 µgEAG/mg massa foliar (Figura 8A).

Entretanto, a quantidade de flavonoides extraído dos tecidos foliares foi diferente nas diferentes cultivares, mesmo antes da inoculação (0 hora). Isso mostra que independente do contato da planta com o patógeno, a cultivar Colorado tem uma maior concentração de flavonoides em seus tecidos, enquanto que 30K75Y tem a menor concentração. Ao passo que, às 72 horas após a inoculação a cultivar 30K75Y sofre um aumento e apresenta-se diferente da AG3700. De forma geral, observou-se ainda um decréscimo na concentração de flavonoides das 0 hora para 36 horas e o oposto foi observado de 108 horas para 144 horas, onde houve um aumento na concentração (a exceção de 30K75Y ) (Figura 8B).

Figura 8 - Concentração de compostos fenólicos totais (A); flavonoides (B); em folhas de diferentes cultivares de milho inoculadas com *B. maydis* ( $1 \times 10^3$  conídios.mL<sup>-1</sup>).



Letras diferentes dentro dos tempos de coleta representam diferença estatística entre os tratamentos de acordo com o Teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Com relação à avaliação de compostos fenólicos totais (CFT), esperava-se que AG3700 e 30K75Y apresentassem maior concentração nos tecidos vegetais, pois foram os genótipos que apresentaram menos sintomas da doença. Entretanto, isso não pode ser evidenciado neste trabalho. Acredita-se que a metodologia escolhida não foi sensível o suficiente para detectar diferenças entre as cultivares. Sugere-se para estudos futuros que se utilizem outras metodologias para detecção de CFT.

Do mesmo modo, esperava-se também que AG3700 e 30K75Y apresentassem as maiores médias de flavonoides. Entretanto, esse comportamento

só foi observado para 30K75Y nas 72 horas após a inoculação. Destaca-se ainda que antes da inoculação, a cultivar 30K75Y era a que tinha a menor concentração de flavonoides, mostrando que o contato com o patógeno pode influenciar na síntese deste composto.

As fitoalexinas são substâncias de baixo peso molecular resultantes do metabolismo vegetal secundário. Os compostos fenólicos são uma classe de compostos dentro das fitoalexinas e os flavonoides estão incluídos dentro dos compostos fenólicos. Este grupo de composto contribui com a defesa vegetal, pois se acumulam logo após a infecção, especialmente em variedades resistentes. Os compostos fenólicos apresentam grande diversidade, incluindo, além dos flavonoides, substâncias como a cumarina, o diterpeno, entre outros (LO et al., 1996; BRAGA, 2008).

Porém, é possível que não haja aumento na concentração de fenólicos totais, porque os mesmos podem sofrer oxidação a partir de enzimas polifenoloxidasas ou peroxidases, transformando-os em outros compostos, com maior poder antimicrobiano (CAMPOS et al., 2004). São substâncias com alto efeito antimicrobiano e são geralmente sintetizadas em resposta a estresses bióticos ou abióticos. Consideram-se as fitoalexinas prejudiciais ao desenvolvimento de bactérias, fungos e nematoides. Sobre os fungos, o modo de ação inclui granulação do citoplasma, desorganização celular, degradação da membrana plasmática e inativação de enzimas fúngicas. Esse efeito pode também refletir na germinação e alongação do tubo germinativo (LO et al., 1996; BRAGA, 2008; SMITH, 1996).

Os autores Misaghi et al. (1982) já comentaram que diferentes mecanismos de defesa agem de forma conjunta contra o patógeno, conferindo resistência nas plantas. Desta maneira, acredita-se que a resistência das plantas de milho ao patógeno *B. maydis* esteja relacionada com mecanismos estruturais e bioquímicos agindo simultaneamente.

#### 6.4 CONCLUSÃO

A cultivar classificada como medianamente resistente AG3700 apresentou a maior atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase, ambas relacionadas à lignificação. Este mecanismo pode ter dificultado a germinação e penetração de *B. maydis* sobre esse genótipo, resultando em menor severidade da mancha foliar.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Ed. UFV. Universidade Federal de Viçosa, 2007. 384 p.
- ASCENSÃO, A. R.; DUBERY, I. A. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race four. **Phytopathology**, v. 90, n. 10, p. 1173–1180, 2000.
- AXELROD, BC; CHEESBROUGH, TM; LAASKO, SL. Lipoxygenase from soybean. **Methods in Enzymology**, v.71, p.441- 451, 1981.
- BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, p. 21–81, 1981.
- BOLWELL, G.P; WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 51, n. 6, p. 347-366, 1997.
- BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Ed. UFV, 1999. 817p.
- BORSATO, L. C. **Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem e mecanismos de defesa elicitados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus***. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, 2009. 101 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n.1/2,p. 248 – 254, 1976.
- BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, p.305-346, 2008.
- CAMARGO, L. E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. Em: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. Vol. 1. Ceres, São Paulo, Brasil, v.1, p. 593-635, 2011.
- CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão a antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.637- 643, 2004.
- CARUSO, C.; CHILOSI, G.; LEONARD, L.; BERTIN, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**, v.58, p.743-750, 2001.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. Em: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 81-124, 2005.

CHAGAS, J. F. R.; SANTOS, G. R. dos; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SIMON, J.; MOURÃO, D. S. C. **Principais doenças foliares da cultura do milho no estado do Tocantins**. Circular Técnica n. 213. EMBRAPA Sete Lagoas, MG. 2015. 13p.

CHANG, P. F. L.; HSU, C. C.; LIN, Y. H.; CHEN, K. S.; HUANG, J. W.; LIOU, T. D. Histopathology comparison and phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene expressions in *Fusarium* wilt infected watermelons. Australian. **Journal of Agricultural Research**, v. 59, n. 12, p. 1146–1155, 2008.

CHOWDHURY, J.; HENDERSON, M.; SCHWEIZER, A P.; BURTON, R. A.; FINCHER, G. B.; LITTLE A. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. **New Phytologist**, v. 204, p. 650 – 660, 2014.

DEACON, J. W.; LEWIS, S. J. Invasion of pieces of sterile wheat root by *Gaeumannomyces graminis* and *Phialophora graminicola*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 167 – 172, 1986.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nat. Rev. Genet** v. 11, p. 539–548, 2010.

DONALD, F.; CIPOLLINI, J. The induction of soluble peroxidases activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. **American Journal of Botany**, Lancaster, v.85, n.11, p.1586-1591, 1998.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

FÁLCON, A. B.; CABRERA, J. C.; COSTALES, D.; RAMIREZ, M. A.; CABRERA, V. T.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.103 – 112, 2008.

FARMER, E. E; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound – inducible proteinase inhibitor. **Plant Cell**, vol. 4, n. 2, p. 129-134, 1992.

FEUSSNER, I; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 275-297, 2002.  
de 2017.

GIANASI, L.; CASTRO, H. A.; SILVA, H. P. Raças fisiológicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 214 – 217, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73 – 82, 1982.

HART, H. Relation of stomatal behavior to stem-rust resistance in wheat. **Journal of Agricultural Research**, v. 39, n. 12, 1929.

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. Em: Hoagland, R. E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington, American Chemical Society, p.87 - 113, 1990.

HUGHES, J.; McCULLY, M.E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology**, v. 50, p. 319-329, 1975.

KIMATI, H. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas**. 3ª edição. Ed. Ceres, 1997.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAGUPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, v .50(2), p. 85–93, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.03.002>

LEACH, J. E.; LEUNG, H.; TISSERAT, N. A. Plant Disease and Resistance. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, v. 4, p. 360–374, 2014.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00165-0>

LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.49, p.21-31, 1996.

MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 4-6, p. 201–209, 2007.

MARTINEZ-FRANZENER, A. S. Avaliação do dano provocado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Marechal Cândido Rondon, 2006. 41 p.

MCCUE, P.; ZHENG, Z.; PINKHAM, J. L.; SHETTY, K. A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. **Process Biochemistry**, v.35, p.603 – 613, 2000.

MISAGHI, I. J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. New York, Plenum Press, 1982.

MOERSCHBACHER, B. HECK, B.; KOGEL, K. H.; OBST, O.; REISENER, H. J. An elicitor of the hypersensitive lignification response in wheat leaves isolated from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. **Z. Naturforsch**, v. 41c, p. 839 – 844, 1986.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. Vol. 1. Ceres, São Paulo, Brasil, v.1, p. 593-635, 2011.

PAXTON, J. D. Phytoalexins – a working redefinition. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 101, p. 106-109, 1981.

POLAND, J. A.; BALINT-KURTI, P. J.; WISSER, R. J.; PRATT, R. C.; NELSON, R. J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends Plant Sci**, v.14, p. 21–29, 2009.

PRUSKY D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**. V. 34, p. 413- 434, 1996.

SHERWOOD, R. T. Papilla formation in corn root-cap cells and leaves inoculated with *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 77, p. 930- 934, 1987.

SILVA, P. A. G. da. **Leveduras para o controle da helmintosporiose em Milho (*Zea mays*)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina. 2018. 87 p.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**. v. 132, p. 1 - 45. 1996.

SOARES, A. M. S; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 10, 2007.

SOUZA, I. R. P. de; OLIVEIRA, E. de; PERES, M. A.; OLIVEIRA, A. C. de; PURCINO, A. A. C. Peroxidase activity in maize inbreed lines resistant or susceptible to maize dwarf mosaic vírus. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2003.

STADNIK, M. J & BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25 – 34, 2000.

STATSOFT. **Electronic Statistics Textbook**, 2007. Disponível em: <<http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre. Artmed, 2004. 719 p.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, n.4, p. 397 - 403, 2005.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85 - 97, 1999.

VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.

WHITMORE, F. W. Lignin-protein complex catalyzed by peroxidase. **Plant Science Letters**, v. 13, n. 3, p. 241 - 245, 1978.

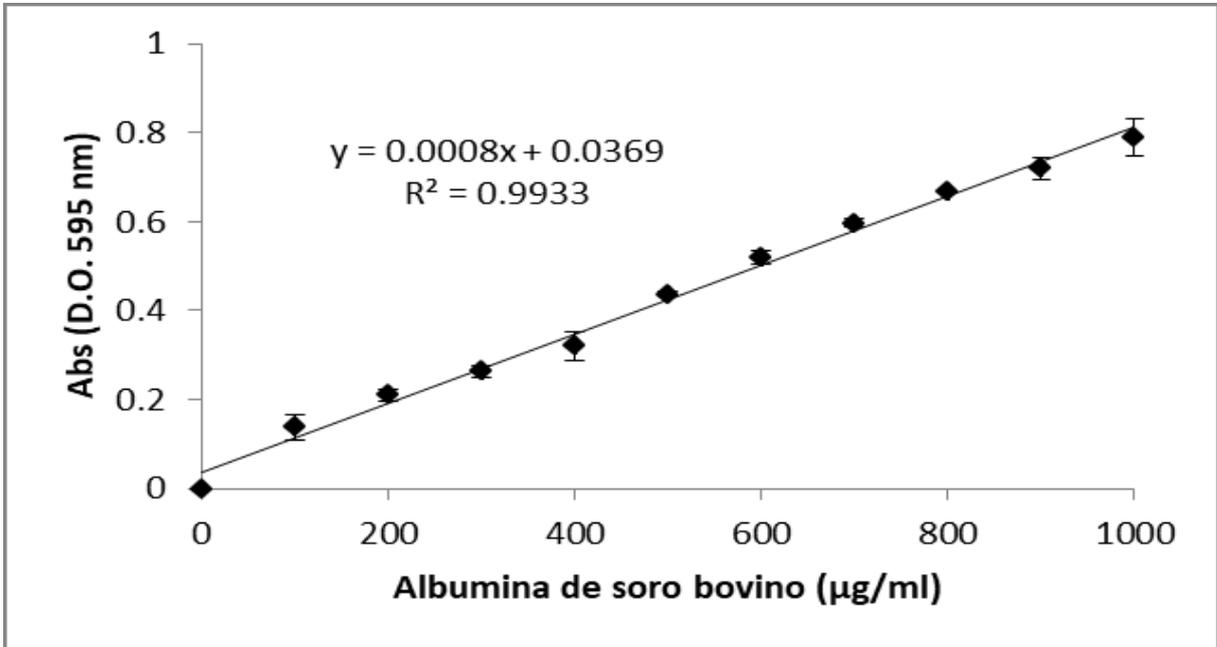
YAN, Z.; REDDY, M. S.; RYU, C. M.; Mc INROY, J. A.; WILSON, M.; KLOEPPER, J.W. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathol** v. 92, p. 1329 - 1333, 2002.

YANG, Q.; BALINT-KURTI, P.; XU, M. Quantitative Disease Resistance: Dissection and Adoption in Maize. **Molecular Plant**, v. 10(3), p. 402 - 413, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.02.004>

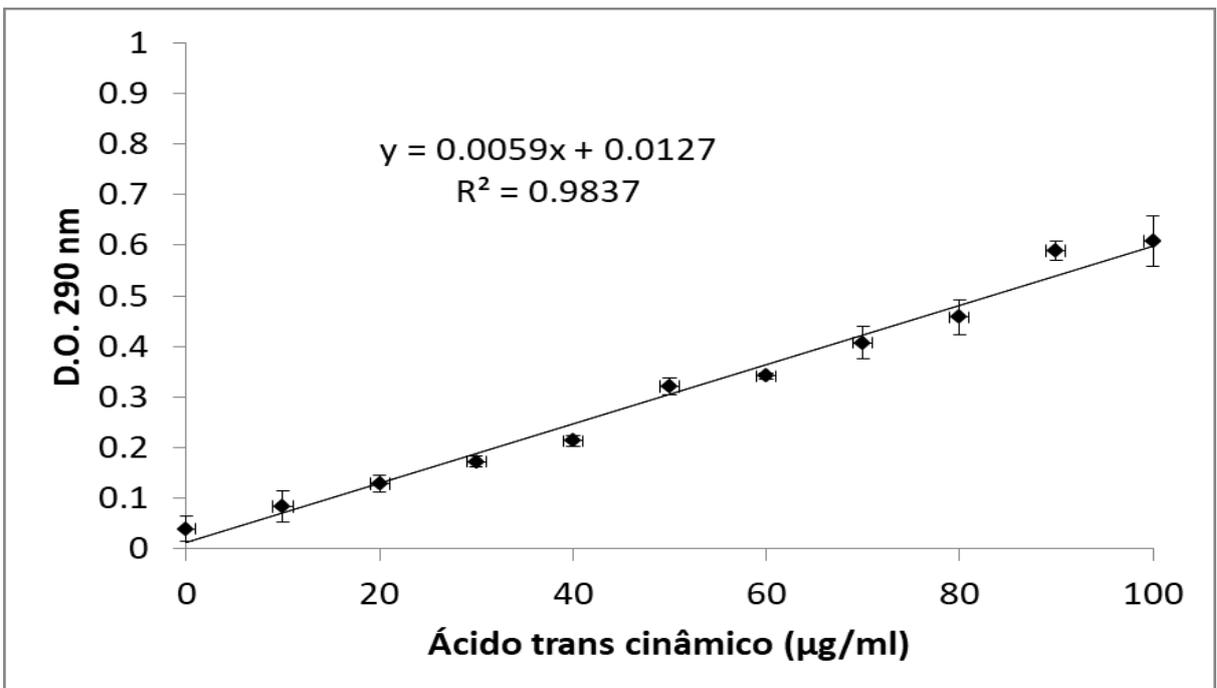
ZACARIAS, A. A.; MORESCO, H. H.; HORST, H.; BRIGHENTE, I. M. C.; MARQUES, M. C. A.; PIZZOLLATI, M. G. **Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla***. In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

## ANEXO A

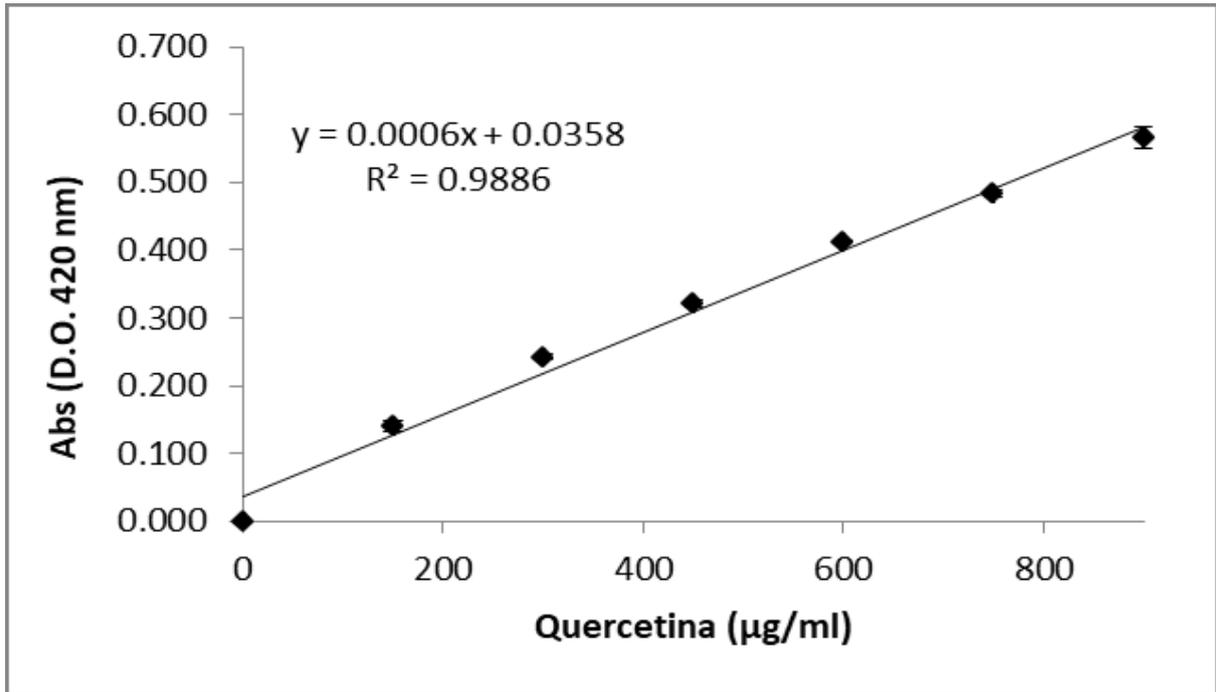
Curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) para determinação de proteínas totais.



Curva padrão do Ácido Trans-cinâmico (ATC) para determinação da atividade da FAL.



Curva padrão de Quercetina para determinação da concentração de Flavonoides.



Curva padrão de Ácido Gálico para determinação da concentração de Compostos Fenólicos Totais.

