

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ETIOLOGIA E GENÉTICA DA RESISTÊNCIA
À MANCHA BRANCA DO MILHO

Adriane Leite do Amaral
Engenheira Agrônoma, M.Sc.

Tese apresentada como um dos requisitos à
obtenção do Grau de
Doutor em Fitotecnia

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2005

TESE
DOUTOR EM FITOTECNIA

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pela oportunidade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro à pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Fernandes Barbosa Neto pela orientação na medida certa, com confiança e apoio de sobra para realizar este trabalho.

Ao Prof Dr. Fábio Kessler Dal Soglio pela co-orientação com dedicação e por todos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Fernando Irajá Félix de Carvalho meu orientador de iniciação científica e de mestrado, quem eu admiro e atribuo toda a base da minha formação profissional.

À empresa Agropecuária Oeste Ltda, em especial ao pesquisador Cláudio Natalino Nuss, pelo suporte de germoplasma para realização deste trabalho.

Ao Global Plant Clinic of CABI Bioscience pela identificação taxonômica dos fungos e em especial ao Dr. Eric Boa pelo incentivo nas publicações internacionais.

À pesquisadora Gisèle Fantin do Instituto Biológico (Campinas-SP) pela colaboração e envio de isolados do fungo.

Aos bolsistas do CNPq Agenor Wernz pela colaboração na fase inicial e Carolina na fase final deste trabalho. De maneira muito especial ao Márcio Luiz De Carli pelo companherismo e eficiência na execução dos experimentos e à sua família que viabilizou com esforço e carinho o experimento no campo da propriedade De Carli (Vila Maria-RS).

Aos professores Suzana S. Cavalli, Antonio Costa Oliveira e José A. Martinelli pela colaboração e participação em minha Comissão de qualificação.

Aos professores da Banca de Defesa de Tese: Fernando Cezar Juliatti, Suzana S. Cavalli, Fernando I. F. de Carvalho e Carla A. Delatorre pelas contribuições na Tese.

No Departamento Plantas de Lavoura, em especial aos professores Dra. Maria Jane Sereno e Dra. Carla A. Delatorre pelo exemplo e incentivo. Aos funcionários Alexandre, Alice e, em especial, ao Adroaldo por todo o auxílio prestado.

No Departamento de Fitossanidade, em especial aos professores Dr. Valmir Duarte e Dr. José A. Martinelli pelo acompanhamento e suporte nos laboratórios. Aos funcionários Valdir e Valmor e da Clínica de Fitopatologia, Miguel e as duas Marisas, que além de auxiliar, tornaram agradável a execução deste trabalho.

Ao Elton Vacaro pelas coletas em Goiás e ao Diego Pegoraro pela colaboração nas informações e coletas no Rio Grande do Sul.

À Marisa Bello pela dedicação ao PPG-Fitotecnia.

Aos colegas da pós-graduação por compartilharem com amizade desta etapa de minha vida: Carlos Renato, Carolina, Cristian, Felipe, Itamar, Jussara, Jéssica, Luis Felipe, Marcos, Mário, Rodrigo, Samira, Emerson, Vidal. Aos orientados do Zé: Léo Conceição, Paulo Fagundes e Sérgio Silva pelo incentivo e apoio no campo. Aos colegas do laboratório de biologia molecular: Cliciane, Danielle Serafin, Emerson, Fabiane, Karine, Laize, Luciane, Tatiana Terra, Paula Wittölter e em especial a Tatiana Boff e Paulo Roberto Silva por tudo que me ensinaram. Também sou grata aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular Fábio e Jonatah pela eficiência e amizade nesta fase final do doutorado. A Precila Zambotto pela amizade e exemplo de superação e também à Sirlei F. Reis pelo inestimável suporte e ensinamentos.

Ao apoio da família, em especial a Harald, Regina e Lurdes.

Ao Eduardo Malschitzky e Sofia Amaral Malschitzky por todo amor.

Ao amigo Fábio Pandini (*in memoriam*) pela busca do saber.

ETIOLOGIA E GENÉTICA DA RESISTÊNCIA À MANCHA BRANCA DO MILHO¹

Autor: Adriane Leite do Amaral
Orientador: José Fernandes Barbosa Neto
Co-orientador: Fábio Kessler Dal Soglio

RESUMO

A Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* é considerada uma das mais importantes moléstias do milho no Brasil. Atualmente, existem dúvidas quanto ao agente causal e o melhoramento genético tem dificuldade de desenvolver cultivares resistentes estáveis. Neste estudo os objetivos foram identificar os fungos causadores da moléstia, estudar a herança da resistência, sob infestação natural e artificial, e identificar marcadores moleculares ligados à resistência à moléstia. Quatro fungos foram associados às lesões de *Phaeosphaeria*. *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp. foram patogênicos e *Phoma* sp. não foi testado. Os fungos *P. sorghina* e *Phoma* sp. foram, respectivamente, o predominante e o menos freqüente na lesão para todos os quatro ambientes coletados. *Phyllosticta* sp. e *Sporormiella* sp. foram os de mais baixa freqüência e restritos a locais. Estudos sob infestação natural, com três cruzamentos, em um único ambiente e com três tipos de avaliação de severidade evidenciaram a presença de variabilidade genética para a resistência e proporcionaram estimativas de herdabilidade intermediárias (0,48-0,69). No estudo de médias de gerações o modelo aditivo-dominante explicou as bases genéticas da resistência, sendo a ação gênica de dominância a mais importante. A inoculação artificial de um cruzamento com *Phyllosticta* sp. e *P. sorghina*, confirmaram a presença de dominância. Nos estudos moleculares, a fenotipagem foi realizada sob infestação natural e para um único ambiente e a genotipagem com marcadores microssatélites. A percentagem de polimorfismo obtida foi de 36%, sendo que seis *QTLs* foram identificados. Estes resultados indicam que vários fungos estão envolvidos na produção dos sintomas da moléstia conhecida por Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* e a composição de fungos na lesão pode variar conforme o ambiente. A estimativa de herdabilidade indica a possibilidade de êxito com a seleção em gerações segregantes, principalmente porque os efeitos gênicos preponderantes para a resistência envolvem aditividade e dominância. A análise de *QTL* permitiu explicar grande parte da variância fenotípica (80%) e genotípica (58%); entretanto, outros ambientes devem ser testados para a sua efetiva confirmação.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (83p) Março, 2005.

**AETIOLOGICAL AND GENETIC OF THE RESISTANCE
TO THE CORN DISEASE
KNOWN AS PHAEOSPHAERIA LEAF SPOT²**

Author: Adriane Leite do Amaral
Adviser: José Fernandes Barbosa Neto
Co-adviser: Fábio Kessler Dal Soglio

ABSTRACT

Phaeosphaeria leaf spot (PLS) is one of the most important corn diseases in Brazil. However, doubts exist about the causal agent and plant breeding has difficulty to developing stable and resistant cultivars. This study aimed to identify the pathogens causing the disease, to study the inheritance for the resistance of disease PLS of maize, under natural and artificial infection, and to identify molecular markers associated to the resistance to disease. Four fungi were associated to leaf lesions. *Phyllosticta* sp., *Phoma sorghina* and *Sporomiella* sp. were pathogenic fungi and *Phoma* sp. was not tested. The fungi *P. sorghina* and *Phoma* sp. were, respectively, the predominant and the less frequent in the leaf lesions, and occurred in all environments. *Phyllosticta* sp. and *Sporomiella* sp. were the less frequent and were restricted to some places of RS and GO, respectively. Studies under natural and artificial infection, with three crosses in only one environment and with three types of severity evaluation evidenced genetic variability for the resistance and provided estimates of intermediary heritability (0,48-0,69). In the study of generation means the additive-dominant model explained the genetics of the resistance. The dominance effect was important in the manifestation of the resistance. The artificial inoculation in only one cross, with fungi *Phyllosticta* sp. and *Phoma sorghina* confirmed the dominance gene action presence. In molecular studies, the phenotype was evaluated under natural infection, for only one environment, and the genotype with microsatellites markers. The percentage of polymorphism was 36% and six *QTL* were identified. These results indicated that several fungi are involved in the symptoms of the disease known by Phaeosphaeria leaf spot and the fungi composition in the lesion can be influenced by environmental conditions. The heritability estimate indicates the possibility of success with selection in early generations, mainly because the preponderant effects for the resistance involve additivity and dominance. The *QTL* analysis allowed explaining an important fraction of the phenotype (80%) and genotype (58%) variances, however other environments should be tested to confirm this result.

² Doctoral Thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (83p) March, 2005.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Distribuição geográfica e importância econômica	4
2.2. Sintomatologia e etiologia	5
2.3. Teste de patogenicidade	9
2.4. Resistência genética às moléstias	10
2.5. Avaliações de severidade à Mancha Foliar de <i>Phaeosphaeria</i>	16
2.6. Experimentos com inoculação artificial	17
2.7. Marcadores microssatélites	18
2.8. Mapeamento genético	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Estudos etiológicos	25
3.1.1. Material vegetal	25
3.1.2. Isolamento de fungos da Mancha Foliar de <i>Phaeosphaeria</i>	26
3.1.3. Composição de fungos na Mancha Foliar de <i>Phaeosphaeria</i>	27
3.1.4. Testes de patogenicidade	27
3.1.5. Análise estatística	29
3.2. Genética da resistência à Mancha Foliar de <i>Phaeosphaeria</i>	29
3.2.1. Germoplasma	29
3.2.2. Experimento com infestação natural	30
3.2.3. Experimento com inoculação artificial	33
3.3. Identificação de <i>QTL</i> associados à resistência à Mancha de <i>Phaeosphaeria</i>	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Etiologia da Mancha Branca do Milho	38
4.2. Estudos com infestação natural	49
4.2.1. Diferenciação da resistência em linhagens e híbridos padrão	49
4.2.2. Variabilidade para resistência nas populações segregantes	51
4.2.3. Variância fenotípica, genética e herdabilidade	54
4.2.4. Análise de média de gerações	56
4.2.5. Análise de distribuição de frequências da AACPD	58
4.3. Estudos com inoculação artificial	61
4.4. Análise molecular da resistência à Mancha Branca do Milho	68
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

Relação de Tabelas

	Página
1. Números de lesões típicas da Mancha Branca do Milho, de estruturas reprodutivas obtidas e de colônias fúngicas desenvolvidas em dois tempos de câmara-úmida com plantas de milho cultivadas em quatro ambientes. FA-UFRGS. 2003.....	40
2. Número de colônias fúngicas obtidas a partir do resgate de estruturas reprodutivas (picnídios ou pseudotécios) produzidos no centro ou bordo das lesões Mancha Branca do Milho em folhas amostradas em quatro ambientes e submetidas à câmara-úmida de 96 horas. FA-UFRGS. 2004.....	41
3. Frequência média da ocorrência de fungos patogênicos na lesão foliar da Mancha Branca do Milho em diferentes ambientes do Brasil. FA-UFRGS. 2004.....	48
4. Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) à Mancha Branca do Milho em três cruzamentos. Vila Maria-RS. 2004.....	53
5. Variâncias fenotípica, genética, de ambiente e herdabilidade (h^2_a) para severidade à Mancha Branca do Milho estimadas pela área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) em cruzamentos de milho. Vila Maria-RS. 2003-2004.....	55
6. Número de indivíduos, média e variância para área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) para a Mancha Branca do Milho, em gerações de três cruzamentos. Vila Maria-RS. 2003-2004.....	56
7. Valores estimados para os parâmetros média [m], aditividade [a] e dominância [d] e significância do teste de escala para severidade à Mancha Branca do Milho estimada pela área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) em três cruzamentos. Vila Maria-RS. 2003-2004.....	58
8. Frequências das classes fenotípicas da área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM) para a Mancha Branca do Milho, por geração, em três cruzamentos distintos, linhagens e híbridos padrão. Vila Maria-RS. 2003-2004.....	59

9. Frequências de plantas nas classes fenotípicas de avaliação da Mancha Branca do Milho quanto à presença, tempo de latência para clorose e necrose e diâmetro das lesões, por geração, no cruzamento LA67xLA27, linhagens e híbridos padrão, sob inoculação artificial de *Phyllosticta* sp. e de *Phoma sorghina*. UFRGS. 2004..... 62
10. Marcadores microssatélites (*Primers*), *locus* ligado, seqüência repetitiva (Rep), local no mapa e polimorfismo na análise molecular da população F₂: LA67xLA27 visando a identificação de *QTL* para resistência à Mancha Branca do Milho. FA-UFRGS. 2004..... 70
11. *Loci* de microssatélites relacionados a *QTLs* para área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade na folha (SFOLHA) da Mancha Branca do Milho, efeitos gênicos, probabilidades e coeficientes de determinação. FA-UFRGS. 2004..... 71

Relação de Figuras

	Página
1. Sintomas da Mancha Branca do Milho originários de infecção natural de plantas de milho cultivados em diferentes ambientes, safras e anos, de 2001 a 2003. RS e GO. 2001-2003.....	39
2. Colônias de fungos isolados da Mancha Branca do Milho em plantas cultivadas em quatro ambientes no Brasil. RS e GO. 2001-2004.....	42
3. Estruturas reprodutivas e esporos de três fungos isolados da Mancha Branca do Milho em plantas cultivadas em quatro ambientes no Brasil. RS e GO. 2001-2003.....	43
4. Lesões foliares em genótipo suscetível de milho (AS32) resultante de inoculação artificial <i>Phyllosticta</i> sp., <i>Phoma sorghina</i> , <i>Sporormiella</i> sp., em condições de casa-de-vegetação. FA-UFRGS. 2003.....	46
5. Severidade à Mancha Branca do Milho pela área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final da planta (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) para linhagens (LA) e híbridos (AS) padrão de milho. Vila Maria-RS. 2004.....	50
6. Lesões foliares produzidas em prova monocíclica por inoculação artificial dos fungos <i>Phyllosticta</i> sp. e <i>Phoma sorghina</i> em plantas de milho. FA-UFRGS. 2004.....	65
7. Genotipagem de indivíduos da população segregante F2: LA67xLA27, com o marcador microssatélite Bnlg439 em gel de agarose 3%. FA-UFRGS. 2004.....	69

1. INTRODUÇÃO

A área plantada com milho (*Zea mays* L.) tem diminuído sistematicamente em todas as regiões do país pelo crescimento da cultura da soja; entretanto, a produtividade nacional com esse cereal vem apresentando um crescimento expressivo devido ao alto potencial genético das novas variedades aliado à eficiência das técnicas de manejo. Atualmente, as moléstias foliares, incluindo a Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*, representam uma ameaça à produção nacional de milho, sendo que um fator de incentivo às moléstias é o cultivo em safrinha, ou de segunda safra, de janeiro a abril. Cultivos de safrinha estão em plena expansão correspondendo hoje a $\frac{1}{4}$ da produção total do milho nacional e remunerando 5% a mais os produtores do que na safra normal. Nesse período, a cultura do milho encontra situação de inversão de temperatura e fotoperíodo, gerando estresse e menor rendimento de grãos. Assim sendo, uma moléstia de menor importância e típica de final de ciclo, como era considerada a Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*, está sendo favorecida pelo ambiente.

A moléstia conhecida no Brasil por Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*, Mancha Branca ou Pinta Branca foi uma das mais severas manchas foliares do milho nas regiões central, sudeste e sul do Brasil durante a década de 1990. Nesse período, o incremento de utilização

da semeadura direta, sem rotação de culturas, e com cultivos sucessivos de milho, em safra e safrinha, com altas densidades de semeadura e uso de irrigação, favoreceram a ocorrência de moléstias, especialmente aquelas causadas por fungos necrotróficos.

O melhoramento genético, que é considerado a melhor alternativa de controle de moléstias em plantas, tem encontrado dificuldades para o desenvolvimento de resistência estável para a Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* entre os diversos ambientes de cultivo do Brasil, onde até genótipos de milho indígena têm apresentado suscetibilidade à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*. Publicações sobre a etiologia da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* são raras no exterior e controversas no Brasil. O fungo *Phaeosphaeria maydis* (anamorfa *Phyllosticta* sp.) é apontado como o único agente causal da moléstia nos Estados Unidos da América (EUA). Por outro lado, no Brasil, com exceção de pesquisas no estado de São Paulo, a grande maioria das pesquisas apresenta baixas frequências de *Phaeosphaeria maydis* nas lesões, além de detectar outros patógenos nas lesões. Como consequência da indefinição da etiologia da moléstia no Brasil, programas de melhoramento não devem basear sua seleção apenas na infestação natural, sendo que a distribuição e interação dos diferentes agentes causais devem ser investigadas, para o desenvolvimento de ferramentas de diagnose eficientes para a Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*.

Na herança da resistência à mancha de *Phaeosphaeria* os estudos são recentes e apontam para uma herança simples, com poucos genes de grande efeito no fenótipo resistente. Contudo, existe a importante participação de vários genes de efeito menor, que determinam distribuição contínua entre os fenótipos resistentes e suscetíveis. Em comum, os estudos corroboram com o modelo aditivo-dominante para explicar as bases genéticas dessa resistência. Recentemente, estudos com marcadores moleculares têm encontrado associação com genes para resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*. Desta forma, os

melhoristas poderão dispor de mais uma ferramenta para a identificação, localização e auxílio na transferência dos genes de interesse para a obtenção de genótipos superiores.

A identificação do agente etiológico da moléstia é importante porque permite traçar estratégias de seleção adequada ao tipo de resistência necessária (parcial e não específica à raça ou total e específica à raça). O conhecimento do modo de herança indica em que momento, e com que facilidade, o melhorista poderá realizar a seleção artificial, para combinar genitores e obter híbridos ou populações superiores. Mesmo diante de incertezas quanto à etiologia da moléstia, se a estratégia for a identificação de genes de resistência parcial, devido ao princípio de não especificidade à raça de patógeno, é provável que estes genes, em conjunto, sejam efetivos a mais de um patógeno, ou até mesmo a um complexo deles, tornando possível e efetiva a estabilidade da resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*.

Assim sendo, este trabalho, constituído de estudos etiológicos, de herança da resistência e com marcadores moleculares teve como objetivos: (i) identificar o(s) fungo(s) agente(s) etiológico(s) da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*; (ii) caracterizar o modo de herança da resistência, pela estimativa de herdabilidade, do número provável de genes e identificação do tipo e magnitude de ação gênica envolvidos e (iii) detectar marcadores moleculares ligados aos genes de resistência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Distribuição geográfica e importância

A mancha de *Phaeosphaeria* está amplamente disseminada entre as áreas tropicais e subtropicais produtoras de milho no mundo e sua ocorrência predomina em áreas altas dos trópicos, onde as chuvas são abundantes e as temperaturas são moderadas (Carson, 1999). A moléstia foi identificada primeiro na Índia, depois nas Américas do Sul, Central e Norte, incluindo o Hawaii, e na África do Sul e Central. Nos Estados Unidos da América (EUA) apareceu primeiro ao Sul da Flórida em 1990, quando foi atribuído potencial de causar grande epidemia, pela predominância de cultivares suscetíveis na região do *Corn Belt* (Carson, 1991 e 1999). Contudo, passada uma década, variedades resistentes foram lançadas e a moléstia não alcançou *status* de grande epidemia. Atualmente, a moléstia é classificada como de menor importância e de ocorrência limitada nos EUA (White, 2000). Por outro lado, Brasil e África do Sul, principalmente nas zonas subtropicais, têm apresentado, incidência e severidade crescentes da mancha de *Phaeosphaeria* (Flett, 2003).

No Brasil, anterior a década de 1980, a moléstia ocorria tipicamente no final do ciclo do milho, sem causar danos importantes à qualidade e ao rendimento de grãos do milho,

sendo desta forma considerada de importância secundária (Balmer & Pereira, 1987). No entanto, durante a década de 1990, a moléstia foi considerada como a mais severa entre as manchas foliares do milho nas regiões central, sudeste e sul do Brasil (Fernandes & Oliveira, 1997; Luz, 2001).

Com relação ao dano causado pela moléstia, perdas de até 60% na produção de grãos foram observadas com cultivares suscetíveis (Fernandes & Oliveira, 1997). Também foi constatada falta de relação entre dano e intensidade da moléstia, onde folhas com 20% de severidade apresentaram uma redução de 50% na taxa fotossintética (Godoy et al., 1998).

A resistência genética à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* não tem apresentado estabilidade (Souza & Duarte, 2002) sendo inconsistente entre diferentes ambientes de cultivo (Brunelli et al., 2002). A ocorrência da moléstia tem sido generalizada, inclusive em genótipos de milho indígena do norte e centro-oeste do Brasil (Silva et al., 2004). Para o controle químico da Mancha de *Phaeosphaeria* existe registro recente no Ministério da Agricultura de dois fungicidas (Paiva, 2004).

2.2. Sintomatologia e etiologia

Os sintomas da Mancha de *Phaeosphaeria* são caracterizados pelo aparecimento de lesões redondas ou elípticas, com 0,3 a 2,0 cm de diâmetro, inicialmente cloróticas e depois necróticas, de coloração esbranquiçada e com os bordos bem definidos de cor pardo-escura (White, 2000). No Brasil, a mancha de *Phaeosphaeria*, também conhecida por Feosféria, Faeosfaeria, pinta branca ou Mancha Branca do Milho (Reis & Casa, 1996), apresenta uma descrição muito ampla para suas lesões. A coloração das lesões pode variar da cor branca até palha, o tamanho, de 1 até 20 mm de diâmetro, nem sempre com margens definidas de cor pardo-escura, e estas lesões podem coalescer, comprometendo grande parte da área fotossintética das folhas (Godoy et al., 1998). Para a maioria dos genótipos de

milho, os sintomas surgem primeiro nas folhas inferiores, progredindo rapidamente em direção ao ápice da planta, e tornam-se mais severos após o pendoamento (Reis & Casa, 1996; Sawazaki et al., 1997). Ao final do ciclo das plantas de milho, dependendo das condições de ambiente, estruturas reprodutivas do fungo agente causal (picnídios ou pseudotécios) podem ser visíveis no centro das lesões. Já houve relato de infecção em plantas jovens de milho, o que compromete, ainda mais, a qualidade e o rendimento de grãos (Fantin, 1994).

Publicações sobre a etiologia da moléstia são raras no exterior e controversas no Brasil. Rane et al. (1966) indicou *Phaeosphaeria maydis* (P.Henn) Rane, Payak, & Renfro (sin. *Metasphaeria maydis* (Henn.) Höhnelt; *Leptosphaeria zea-maydis* Saccas) como o agente causal da Mancha de Phaeosphaeria e atribuiu como anamorfa *Phyllosticta* sp. Contudo, mais recentemente, para a anamorfa de *Phaeosphaeria maydis* foi designado *Phoma maydis* Fautrey, que difere de *Phyllosticta maydis* Arny & Nelson (sin. *Phoma zea-maydis* Punith.), anamorfa de *Mycosphaerella zea-maydis* Mukunya, & Boothroyd, agente causal de outra moléstia no milho a *yellow leaf blight* (YLB) (Arny & Nelson, 1971; Punithalingam, 1983; Punithalingam, 1990; Carson, 1999).

Quanto à classificação, *Phaeosphaeria maydis* é considerado um Ascomiceto (ou Ascomycotina), Loculoascomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae. A teleomorfa apresenta ascósporos hialinos, fusiformes, com três septos, sendo constricto apenas no primeiro septo, e quatro células, com uma das células medianas mais alargada, e freqüentemente gutulados. *Phyllosticta* sp. está classificada em Deuteromycotina, Coelomycetes, Sphaeropsidales, Sphaeropsidaceae (Shoemaker & Babcock, 1989). A anamorfa apresenta conídios hialinos, unicelulares, tipicamente uni ou bigutulados.

O ciclo vital de Ascomicetos apresenta uma fase de reprodução assexual e outra sexual. A fase assexual ocorre durante o desenvolvimento da planta, enquanto as condições são favoráveis ao fungo. Quando o ambiente se torna desfavorável, o fungo pode sobreviver formando estruturas de resistência, como os clamidósporos, ou reproduzir sexualmente formando ascas com ascósporos, os quais são mais resistentes que conídios, e servirão como inóculo primário, para iniciar a moléstia em um novo ciclo da planta (Amorin, 1995a). Seguindo este ciclo vital, *Phaeosphaeria maydis* (Rane et al., 1966) pode ser caracterizado como um fungo hemibiotrófico, porque possui habilidade de invadir e crescer em células vivas do hospedeiro, assim como de continuar a crescer e esporular após a morte da planta hospedeira. Segundo Pereira (1997) o inóculo primário é oriundo de restos culturais, nenhum hospedeiro intermediário foi identificado até o momento e a disseminação ocorre por vento e chuva.

Os fungos Ascomicetos, especificamente do tipo Loculoascomicetos e da ordem *Pleosporales* podem ser incluídos em gêneros de patógenos importantes em cereais como *Cochliobolus* sp. e *Pyrenophora* sp., assim como gêneros de patógenos fracos como *Pleospora* sp. e *Leptosphaeria* sp., (Alexopoullus et al., 1996) e gêneros de saprófitas como *Sporormiella* sp. (Webster, 1980). Segundo Hanlin (1992) *Leptosphaeria* sp. e *Phaeosphaeria* sp. são freqüentemente sinônimos e possuem anamorpha *Phoma* sp. Particularmente, *Phoma* sp. e *Phyllosticta* sp. são considerados similares e com freqüência, tratados como sinônimos, apesar de que, por convenção, *Phoma* sp. seja considerado um patógeno que produz lesões em várias partes da planta e *Phyllosticta* sp. causador de lesões especialmente em folhas (Barnett & Hunter, 1998).

A grande maioria das pesquisas realizadas no Brasil não confirma a etiologia da moléstia e são baseadas em infestação natural (Pegoraro et al., 2001; Souza & Duarte,

2002). Apesar da ocorrência de *Phaeosphaeria maydis* ter sido documentada em São Paulo (Fantin, 1994; Fantin & Balmer, 1997), também foi sugerida a existência de raças distintas do patógeno, para explicar as inconsistências na resistência genética de genótipos de milho, em diferentes ambientes do estado de São Paulo (Brunelli et al., 2002). Em outros estados do Brasil, as pesquisas não confirmam a etiologia previamente descrita para a mancha de *Phaeosphaeria*. Já foi demonstrado que picnídios e pseudotécios presentes na lesão típica da moléstia pertencem a fungos diferentes e não aos estados anamórfico e teleomórfico de um único agente (Cervelatti et al., 2002). Existe referência do envolvimento da bactéria *Pantoea ananas* na produção de lesões típicas da mancha de *Phaeosphaeria* (Paccola-Meirelles et al., 2001). *Phoma sorghina* foi identificada como o fungo prevalente da mancha conhecida por *Phaeosphaeria* (Amaral et al., 2004) e, recentemente, uma espécie nova de *Sclerophthora* (*Peronosporaceae*) foi encontrada consistentemente nas lesões de *Phaeosphaeria* (Oliveira et al., 2004a). Até o presente, apenas as pesquisas com *Phaeosphaeria maydis*, *Pantoea ananas* e *Phoma sorghina* realizaram a prova de patogenicidade e podem de fato confirmar ou contestar a etiologia da moléstia. As baixas frequências de isolamento de *Phaeosphaeria maydis*, em torno de 10% (Paccola-Meirelles et al., 2001), e de 7% para a sua anamorfa *Phyllosticta* sp. (Amaral et al., 2004), conjuntamente com a identificação e prova da patogenicidade de outros agentes patogênicos encontrados em alta frequência na lesão de *Phaeosphaeria* são utilizadas como evidências de que a moléstia conhecida por mancha de *Phaeosphaeria* no Brasil não corresponde a mesma moléstia descrita por Rane et al. (1966) e que ocorre nos EUA (White, 2000). Diante dessas diferenças no Brasil, hipóteses estão sendo elaboradas. Uma tenta explicar pela ocorrência de um complexo patogênico envolvendo a bactéria

P. ananas, onde a relação com fungos não foi ainda esclarecida, (Paccola-Meirelles et al., 2001; Paccola-Meirelles et al., 2004), e a outra hipótese, pela existência de diferentes fungos, causadores de manchas similares à da *Phaeosphaeria*, que podem ocorrer juntos na lesão e variar conforme o ambiente de cultivo no Brasil, onde a presença da bactéria não foi investigada (Amaral et al., 2005). Existe informação de que a bactéria predominaria em lesões jovens, tipo anasarca e que apenas fungos seriam encontrados em estádios mais avançados de necrose na lesão (Marriel et al., 2004; Bomfeti et al., 2004). A importância de fungos na moléstia foi demonstrada recentemente, por testes de patogenicidade (Amaral et al., 2004; Amaral et al., 2005), por análises com microscopia ótica e eletrônica (Oliveira et al., 2004b) e, indiretamente, pela efetividade de fungicidas no controle da moléstia, obtida com o princípio ativo *Pyraclostrobin* (Souza et al., 2004; Jann et al., 2004a; Jann et al., 2004b).

2.3. Teste de Patogenicidade

Quando a etiologia de uma moléstia é desconhecida, ou quando existem dúvidas quanto ao agente causal dos sintomas observados, segundo Amorin & Salgado (1995) é imprescindível a aplicação do teste de patogenicidade, que está baseado nos Postulados de Koch. Estes postulados foram descritos em 1881 para patógenos humanos, adaptados à fitopatologia e até os dias de hoje empregados como método clássico de diagnose de plantas. Para o estabelecimento da relação causal entre uma moléstia e um microorganismo, devem ser cumpridas todas etapas do teste de patogenicidade. Inicialmente, deve ser encontrada associação constante entre patógeno-hospedeiro. Depois, o patógeno associado aos sintomas deve ser isolado da planta doente e multiplicado axenicamente para ser inoculado em plantas sadias, reproduzindo os mesmos sintomas já

observados. Finalmente, o patógeno deve ser novamente isolado das lesões provocadas pela inoculação artificial das plantas (Amorin & Salgado, 1995).

A aplicação dos postulados de Koch permite associação de apenas um agente causal para uma moléstia, sendo considerada uma visão tradicional da fitopatologia sobre a natureza das moléstias de plantas (Amorin & Salgado, 1995). Isto porque existem moléstias nas quais as relações causais envolvem mais de um agente, podendo estes atuar seqüencial ou concomitantemente. No caso de atuação seqüencial, o patógeno primário altera condições na planta, as quais favorecem ao patógeno secundário. Na atuação concomitante, os patógenos estabelecem uma relação ecológica próxima e conjuntamente, produzindo sintomas que são diferentes daqueles induzidos por cada um individualmente. Para exemplificar, existe um complexo de fungos, incluindo *Phoma terrestris* (E.M.Hans), causando moléstia radicular em milho, conhecida por *red root rot*. Nesta moléstia existem duas hipóteses, *Phoma terrestris* como patógeno primário em associação com *Pythium* sp. e *Fusarium* sp.; ou como patógeno secundário importante, que infectaria as raízes do milho já debilitadas por *Pythium* sp. ou por outro fungo ainda não determinado (White, 2000).

2.4. Resistência Genética às moléstias

Resistência genética é considerada o método mais racional que existe para controle de moléstias das plantas cultivadas e a contribuição do melhoramento genético tem sido expressiva e inestimável com o desenvolvimento de cultivares resistentes (Robinson, 1996; Casela, 2004; Niks & Lindhout, 2004). A resistência genética às moléstias tem importância quando soluciona epidemias, como a do fungo *Helminthosporium maydis* sobre o milho, na década de 1970 nos EUA (Ullstrup, 1977); assim como é extremamente importante quando evita novas epidemias, como tinha sido previsto para *Phaeosphaeria maydis* nos EUA (Carson, 1999).

Segundo Parlevliet (1997), resistência genética pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em suportar, parcial ou completamente, o crescimento e o desenvolvimento do patógeno, e para sua compreensão seria ideal avaliar todos os aspectos: a expressão da resistência (completa, parcial ou residual), a herança da resistência (monogênica ou poligênica), a especificidade da resistência às raças do patógeno, os mecanismos de resistência (hipersensibilidade, pré ou pós-haustório) e a durabilidade ao longo dos anos de cultivo. Contudo, a maioria das publicações utiliza as denominações de resistência qualitativa ou quantitativa para resumir os tipos de resistência mais estudados em plantas (Camargo, 1995). Nestes casos, a resistência qualitativa caracteriza-se por ser específica à raça do patógeno, completa e controlada por um ou poucos genes dominantes ou recessivos. A resistência quantitativa, também chamada de parcial, é o resultado da ação combinada de vários genes, geralmente não específicos à raça do patógeno. Este último tipo de resistência tem o efeito de reduzir a eficiência e a quantidade do inóculo, a colonização e multiplicação do patógeno; é influenciado pelo ambiente, pelo vigor e idade da planta hospedeira, é geralmente incompleta, apresenta variação contínua da moléstia, desde severidade muito baixa até muito alta, e é considerado o tipo de resistência mais durável que existe. Até o momento não existem relatos de erosão de resistência quantitativa contra fungos (Parlevliet, 1997). Contudo, a resistência parcial durável em milho pode incluir muitos genes, como são os exemplos contra *Cochliobolus heterostrophus* e *Setosphaeria turcica* (Leonard, 1993), ou, poucos genes aditivos, como contra *Puccinia sorghi* (Kim et al., 1977).

Quanto à especificidade, existe a hipótese de Vander Plank (1968) com dois tipos de resistência: Específica à raça do patógeno, ou vertical, monogênica e não durável, ou não específica à raça ou horizontal, poligênica e durável. Esta hipótese tornou-se muito popular

porque explica a maioria dos exemplos de moléstias estudadas, contudo não representa a realidade complexa na natureza. Como exemplo de exceção, em milho existe a resistência à *Periconia circinata* que, apesar de ser do tipo patógeno específica e monogênica, é também de grande durabilidade.

Atualmente, se atribui a durabilidade da resistência mais ao mecanismo de resistência (Parlevliet, 1997). Na hipersensibilidade, células invadidas pelo patógeno, mais as células vizinhas, entram em colapso e resultam em lesão necrótica, que param o crescimento do patógeno. Esta resistência, determinada por genes de grande efeito e específicos à raça teria uma relação gene a gene com a avirulência do patógeno. A expressão da resistência parcial é geralmente considerada de grande durabilidade e combina a ação de vários componentes como a menor frequência de infecção, o maior período de latência e a redução na taxa de esporulação (Parlevliet, 1979). São também importantes o número de esporos produzidos nas lesões e o tamanho das lesões (Vale, et al., 2001).

Resistência à moléstia em plantas, determinada por poucos genes de grande efeito no fenótipo é condição que exerce grande pressão de seleção sobre a população do patógeno, para a mudança de frequências gênicas em direção a virulência e, conseqüentemente, determina a quebra da resistência da planta em um curto espaço de tempo. Por outro lado, genes de resistência de pequeno efeito, podem representar um modelo de resistência mais durável, devido a menor pressão de seleção sobre a população do patógeno (Parlevliet, 1997). Desta forma, genótipos que apresentam comportamento de progresso lento da moléstia, como conseqüência da ação de vários genes de pequeno efeito no fenótipo, devem ser valorizados, principalmente quando genes de grande efeito não são efetivos para a resistência, ou quando estes últimos determinam numa resistência pouco durável.

Estudos de herança da resistência servem de base para estabelecimento das estratégias de seleção no melhoramento plantas. Tradicionalmente, estudos de herança da resistência são baseados em estimativas de médias e variâncias de gerações de cruzamentos, com avaliação fenotípica do caráter alvo (Allard, 1971). Com estes estudos, pode-se descobrir se a resistência é controlada por um ou poucos genes de grande efeito no fenótipo, ou por muitos genes de pequeno efeito, se a ação gênica é aditiva ou não-aditiva e se a herdabilidade é alta ou baixa. Todos estes conhecimentos determinam com que facilidade o melhorista pode obter êxito na seleção artificial.

Genes de resistência a moléstias têm ação aditiva quando a sua expressão pode ser incrementada pela presença de dois ou mais genes no hospedeiro, sendo que o mesmo nível de resistência pode ser oriundo de diversas combinações genicas (Russel, 1981).

A maioria dos estudos de herança da resistência à Mancha de *Phaeosphaeria* sob infestação natural, ressaltam a importância da aditividade (Lima et al., 1998; Paterniani et al., 1998, Carson, 2001; Pegoraro et al., 2002; Silva, 2002; Lopes, 2003), embora a participação da dominância também tem sido pronunciada, ou até mais importante que a aditividade (Das et al., 1989a,b). Genericamente, o caráter resistência à *Phaeosphaeria* tem sido apontado como de herdabilidade alta (Das et al., 1989; Carson, 2001; Pegoraro, 2002; Silva, 2002; Lopes, 2003).

Programas de melhoramento para resistência a moléstias na sua maioria utilizam para seleção métodos onde plantas jovens são submetidas a altas concentrações de um inóculo específico. Esta é uma estratégia que seleciona o tipo de resistência baseada em um ou poucos genes de grande efeito e é ineficiente na identificação de pequenas diferenças, causadas por genes de menor efeito. Além disso, somado a concepção de que resistência poligênica é difícil de selecionar no programa de melhoramento genético, chega-se à

situação presente, de predominância da resistência monogênica, enquanto resistência parcial não tem sido explorada (Vale et al., 2001). Estudos com a moléstia Helminthosporiose (*Exserohilum turcicum*) em milho já demonstraram que genótipos resistentes podem ser obtidos utilizando resistência do tipo monogênica e poligênica, interagindo entre si, uma reforçando o efeito da outra. Nesses casos, a resistência baseada no número de lesões está sobre controle multigênico, predominando a ação gênica aditiva e, aquela baseada no tipo de lesão (clorótica ou necrótica) está condicionada por um gene dominante (Casela, 2004).

Com a necessidade de obtenção de uma resistência mais durável, alguns autores sugerem que a seleção seja um processo contínuo de identificação de genótipos com baixos níveis de severidade da moléstia, devendo ser eliminadas plantas muito suscetíveis e muito resistentes, porque nestas últimas os genes de grande efeito não permitem visualizar resistência parcial (Parlevliet & Ommeren, 1988).

Além da relevância dos tipos e estratégias para seleção artificial da resistência, é extremamente importante o conhecimento dos fatores que poderiam afetar a expressão da resistência da planta e atrapalhar a seleção artificial para resistência. Dentre eles existem os fatores bióticos, que podem ser relacionados ao patógeno ou hospedeiro, e os abióticos, relacionados ao ambiente. Como fatores bióticos, baixas densidades de inóculo podem determinar que plantas suscetíveis apresentem baixa severidade, simulando uma falsa resistência. Quanto à origem do inóculo, se endógena, o patógeno será virulento com frequência, a menos que a resistência seja utilizada; se for exógena, o patógeno poderá ou não ser virulento, podendo variar no tempo e com o tipo de dispersão. A densidade e arranjo da população hospedeira podem favorecer a epidemias, assim como extensas áreas com uma única cultura, ou a ausência de rotação de culturas. A resistência pode apresentar

variações durante o desenvolvimento da planta, podendo diferir entre as fases de plântula e planta adulta. A taxa de crescimento da planta, assim como a situação nutricional, também pode favorecer a moléstias pelo estímulo à produção de tecidos jovens e tenros. Dentre os fatores abióticos que afetam a resistência a moléstias fúngicas no hospedeiro, podem ser enumerados: a temperatura, a luminosidade e a umidade. Estes fatores abióticos também afetam o patógeno, onde a umidade é importante nas fases de germinação, infecção, e dispersão dos esporos, já que essas fases dependem de água livre na superfície vegetal. A temperatura pode ser importante na regulação do tempo para a infecção, duração do período de latência para surgimento de sintomas e reprodução de fungos (Bedendo, 1995). Entre os vários trabalhos que documentam a alteração da expressão da resistência em plantas pela influência de fatores abióticos, a temperatura recebe destaque (Qayoum, 1985).

Para a seleção de resistência genética em plantas, é recomendada a inclusão de cultivares padrão suscetível e resistente para escapar de inconsistências geradas pelos fatores previamente relacionados (Niks & Lindhout, 2004). Logo, a comparação de severidade, quantidade do patógeno por planta, ou em parte desta com as cultivares padrão, fornecem a informação de limites de resistência e suscetibilidade a ser considerado para cada situação em específico.

Para estimar resistência a moléstias em plantas, o ideal seria avaliar a quantidade de patógeno presente nos tecidos da planta. Contudo isto pode ser muito difícil e pouco prático (Amorin, 1995). Como alternativa, quantificar o tecido afetado pelo patógeno pode servir de estimativa da quantidade de patógeno presente, assim como do nível de resistência, no caso de moléstias que causam manchas foliares (Parlevliet, 1997).

2.5. Avaliações de severidade à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*

O parâmetro severidade, que compreende a proporção de tecido doente na planta em comparação com o tecido sadio, em porcentagem, é considerado mais apropriado para quantificar moléstias causadoras de manchas, porque retrata melhor a intensidade da moléstia do que a incidência, onde são feitas contagens para obter frequência de plantas ou órgãos afetados com a moléstia (Bergamin-Filho & Amorin, 1996). Escalas diagramáticas facilitam avaliações de severidade e por isso são predominantes nas quantificações de manchas foliares. A escala diagramática mais utilizada no Brasil para a mancha de *Phaeosphaeria* é a da Agrocere (1996), onde a severidade pode ser avaliada na planta inteira ou na folha posicionada abaixo do ponto de inserção da espiga principal. A mancha de *Phaeosphaeria* tem sido constatada em vários estádios de desenvolvimento do milho, contudo a maior incidência é frequentemente relatada no florescimento. Devido a grande incidência de moléstias no florescimento da planta de milho, este estágio é considerado preferencial para a avaliação de moléstias (Agrocere, 1996). Para uma avaliação de resistência ao longo da epidemia, é indicado o uso da representação gráfica de “área abaixo da curva de progresso da moléstia” (AACPM), que nada mais é do que a quantidade de tecido doente ao longo do tempo. Em comparação, AACPM pode representar melhor a resistência geral da planta durante a epidemia do que avaliações de severidade baseadas numa única avaliação (Bergamin-Filho, 1995). Por outro lado, Vale et al. (2001) consideram AACPM apenas uma medida acumulativa de severidade, muito laboriosa e que na maioria das vezes fornece resultado similar àquela avaliação de severidade feita no período de maior intensidade da moléstia. Da mesma forma, os autores consideram apropriada uma única avaliação de severidade para acessar resistência quantitativa ou parcial.

Na prática do melhoramento genético para resistência não tem sido observado o uso da AACPM, muito provavelmente por ser trabalhosa e constituída de várias avaliações. Na avaliação de resistência à Mancha de *Phaeosphaeria* já foi indicado que apenas uma avaliação de severidade da planta inteira, aos 75 dias após a semeadura, pode proporcionar os mesmos resultados que AACPM, em 4 avaliações com intervalos de 10 dias (Souza & Duarte, 2002). Da mesma forma, já foram sugeridas com equivalência, as medidas de severidade da planta inteira ou de uma única folha, localizada logo a baixo do ponto de inserção da primeira espiga (Silva & Moro, 2004).

Estudos da incidência e severidade da Mancha de *Phaeosphaeria*, no Brasil, têm atribuído importância à época de cultivo do milho. Quando a semeadura do milho foi realizada tardiamente, houve aumento progressivo de incidência da moléstia, de setembro a fevereiro, pela temperatura e umidade mais adequadas para a infecção e desenvolvimento do patógeno (Fernandes, 1995; Pegoraro et al., 2001). O aumento da severidade pelo avanço da época de semeadura tem sido justificado pelo acúmulo de inóculo no campo, em decorrência de cultivos sucessivos de milho (Godoy et al., 1998).

2.6. Experimentos com inoculação artificial

A técnica de inoculação artificial compõe uma etapa do teste de patogenicidade e também serve para estudos da resistência a moléstias, onde se pode ter maior controle do inóculo e das condições ambientais durante o cultivo das plantas. Na inoculação, patógeno e hospedeiro são colocados em contato, sob condições favoráveis à infecção. Para fungos, patogênicos de parte aérea, a inoculação é feita geralmente pela aspersão de uma suspensão de esporos. Após a inoculação, as plantas devem ser submetidas a uma câmara úmida por, pelo menos 24 horas, período necessário para a germinação dos esporos e penetração no hospedeiro (Amorin & Salgado, 1995).

Geralmente, o objetivo maior com a inoculação artificial é a uniformização do tipo e da concentração de esporos, e das condições do ambiente, de maneira que as plantas desenvolvam de maneira normal, sem estresses, reduzindo ao máximo as interferências na expressão da resistência (Fox, 1998). Além disso, experimentos com inoculação artificial são a única forma de criar uma prova monocíclica da moléstia para viabilizar estudos genéticos dos componentes da resistência parcial (Niks & Lindhout, 2004).

Trabalhos com inoculações artificiais da Mancha de *Phaeosphaeria* são raros e geralmente fazem referência à investigação da etiologia da moléstia e métodos de inoculação do fungo *Phaeosphaeria maydis* (Fantin & Balmer, 1997; Fantin & Resende, 1999; Fantin et al., 2001). Na sua maioria, os trabalhos que existem com a mancha de *Phaeosphaeria*, no Brasil ou no exterior, foram realizados sob situação de infestação natural e estão relacionados à identificação de reação de resistência em genótipos, seleção artificial para resistência ou herança da resistência (Pegoraro, 2001; Souza & Duarte, 2002). Além destes, também podem ser encontrados trabalhos que utilizaram o acréscimo de inóculo no campo, sem qualquer outro tipo de controle da infestação da moléstia (Carson, 1999; Silva & Moro, 2004).

2.7. Marcadores microssatélites

Atualmente, existem ferramentas biotecnológicas que podem auxiliar na seleção fenotípica de genótipos superiores. Os marcadores moleculares têm este potencial e estão sendo utilizados para identificar resistência a moléstias, inclusive contra a Mancha de *Phaeosphaeria* em milho (Carson, 1996; Pedrosa, 2002; Lopes, 2003).

Para milho, o uso de marcadores moleculares está bastante difundido, de tal forma que seus cromossomos estão divididos em regiões delimitadas por marcadores RFLPs de posição conhecida, a cada 20 centimorgans (cM), chamadas de *Bins* (McMullen & Sincox,

1995a). Logo, a posição de um gene é dada por uma combinação de números, onde o primeiro se refere ao grupo de ligação e o segundo, à posição relativa do *Bin* dentro do grupo de ligação. A informação em *Bins* tem sido útil para a descoberta de genes de resistência importantes em milho, apesar da imprecisão existente na relação de 2140 kpb/cM entre a distância genética do conjunto haplóide do milho e a distância física, que ainda varia dependendo da região do genoma (Lynch & Walsh, 1998).

Marcadores microssatélites, também denominados de SSR (seqüências simples repetidas) são marcadores codominantes que apresentam alto grau de polimorfismo (Sênior, 1996). Este marcador baseia-se naquelas seqüências curtas de 1 a 13 nucleotídeos que se repetem em *tandem*, ou seja dispostos lado a lado, no genoma e são flanqueadas por seqüências não repetidas, as quais são usadas como molde para construção de oligonucleotídeos, variáveis de 18 a 30 pb e conhecidos por *primers* de microssatélites. A partir dos *primers*, o *locus* microssatélite pode ser amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e visualizado mediante eletroforese em géis de alta resolução. Géis de agarose são os mais utilizados pela facilidade de elaboração, contudo até as altas concentrações (acima de 3%) não possibilitam distinguir polimorfismos inferiores a 5 pb. Géis de poliacrilamida (6%) são mais trabalhosos, demandam tempo para revelação mas permitem visualizar polimorfismos acima de 2 pb (Maize GDB, 2004).

A partir da premissa de Thoday (1961), de que efeitos fenotípicos de um gene podem ser indiretamente estudados tomando por base um gene vizinho, marcadores moleculares passaram a ser aplicados no mapeamento de caracteres quantitativos. Para a maioria dos caracteres das plantas com determinação genética quantitativa e de interesse econômico poucas informações existem sobre números de *loci*, posição cromossômica, magnitude de efeito e interações entre *loci* que controlam a sua expressão. Estes *loci* são denominados de

QTLs, *quantitative trait loci*, ou seja, *loci* controladores de caráter quantitativo (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Nos últimos anos, porém, vem crescendo o número de associações entre marcadores moleculares e *QTLs* de importância econômica, especialmente os microsatélites, que têm sido identificados em grande número de espécies vegetais e são considerados como uma das melhores opções para mapeamento genético (Litt & Luty, 1989; Milach, 1998).

2.8. Mapeamento genético

Os mapas genéticos de marcadores moleculares oferecem a possibilidade de identificar, localizar e medir a magnitude do efeito dos principais fatores genéticos envolvidos no controle de caracteres quantitativos, permitindo manipular estes fatores individualmente, durante os procedimentos de recombinação genética e seleção (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A seleção assistida por marcadores moleculares pode ser considerada como a aplicação prática dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas, onde a seleção pode ser praticada diretamente sobre o genótipo, as variâncias de ambiente e de interação genótipo X ambiente são eliminadas e variância aditiva e diferencial de seleção podem ser elevados ao extremo (Hallauer & Miranda, 1988; Tanksley, 1989). Esta seleção tem sido mais utilizada para caracteres de herança simples e, em menor escala para caráter quantitativo e de herança complexa. Marcadores moleculares como auxiliares na seleção para resistência a moléstias proporcionam vantagens como a possibilidade de introdução de resistência a patógenos exóticos, onde a presença do patógeno seria necessária somente na fase de identificação dos marcadores ligados a resistência e na verificação final da variedade resistente a ser lançada; para distinguir os genótipos que possuem resistência específica à raça, muito útil na estratégia de piramidização de genes; para monitorar e

agilizar o processo de retrocruzamento para transferência de resistência; para a seleção de genótipos resistentes a múltiplos patógenos e para identificar *QTLs*, possibilitando assim o incremento do nível de resistência quantitativa (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Niks & Lindhout, 2004).

Para a realização de mapeamento genético são necessários: a escolha criteriosa de genitores contrastantes para o caráter de interesse, a obtenção de uma população segregante e a fenotipagem desta população segregante (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Dentre os vários tipos de população segregante que podem ser utilizados, as F_2 são comumente empregadas com a vantagem de que cada indivíduo é formado por dois gametas com *loci* em desequilíbrio de ligação, representando o dobro dos retrocruzamentos e, proporcionando uma redução no esforço de avaliações genotípicas. Contudo, como desvantagem, cada indivíduo é considerado único, impossibilitando repetições das avaliações fenotípicas em vários locais. Alternativamente, para possibilitar repetições em vários locais, podem ser utilizadas famílias F_3 (Pedrosa, 2002) ou, preferivelmente, linhagens recombinantes.

Estudos de mapeamento genético do milho geraram evidências de que os genes de resistência a diversos patógenos estejam organizados em *clusters* ou seja, em disposição agregada no genoma do milho (McMullen & Sincox, 1995b). No mínimo seis regiões já foram localizadas: *bin* 1.04, *bin* 3.04, braço curto do cromossomo 4, *bin* 6.01, cromossomo 8 e no braço longo do cromossomo 10. Esta disposição agregada de genes de resistência pode ter um significado funcional, relacionado à sinalização ou à cascata de eventos da interação patógeno-hospedeiro (McMullen & Sincox, 1995b). Vários genes e *QTLs* para resistência a moléstias em milho foram encontrados dentro ou muito próximos aos *clusters*. No cromossomo 1, próximo ao centrômero, no *bin* 1.04, foram encontrados genes de

resistência para *Cercospora*, *Giberella*, à raça 1 de *Cochiobolus carbonum* e à virose *maize streak vírus*. No cromossomo 3, em região centromérica, genes para resistência à *Puccinia sorghi* e para as viroses *maize mosaic virus* e *wheat streak mosaic virus*, além de *QTL* para *Giberella*. No braço curto do cromossomo 4 encontra-se o gene para resistência à *Puccinia sorghi* e *QTLs* para *Cercospora*, *Giberella* e *Helminthosporium*. No cromossomo 6, genes para *Helminthosporium*, *Wheat streak vírus* e *Maize dwarf mosaic virus*. No braço longo do cromossomo 8 encontram-se dois genes para resistência a *Exserohilum* e *QTLs* para *Cercospora* e *Helminthosporium*. No braço longo do cromossomo 10 estão os genes para *wheat streak mosaic vírus*, além de *QTL* para *Giberella* e *Cercospora* (McMullen & Sincox, 1995b).

Especificamente e com relação ao mapeamento para a Mancha de *Phaeosphaeria* já foram encontrados vários *QTLs*. Carson et al. (1996) foi o primeiro a encontrar *QTLs*, num total de seis, em estudos na Flórida, EUA. Pedrosa (2002) encontrou de 7 a 8 *QTLs*, conforme população e local, e Lopes (2003) encontrou no mínimo quatro *QTLs* consistentes entre épocas e populações distintas, sendo que todos os estudos foram realizados em Minas Gerais, Brasil. Estes três trabalhos de mapeamento apresentam em comum a localização de *QTLs* nos cromossomos 1, 5, 6, 7 e 8, apesar das diferenças entre genótipos de origem temperada e tropical e, entre os ambientes de cultivo do milho. Estes trabalhos também sugerem uma maior saturação com marcadores moleculares naquelas regiões cromossômicas que foram importantes com detecção de *QTLs*.

Para a detecção de *QTLs* é recomendada a construção de mapas genéticos saturados com marcadores moleculares, preferencialmente equidistantes por no máximo 20cM. Como o mapa do milho está dividido em 90 *Bins*, seria interessante usar um marcador molecular polimórfico para cada um destes locais. Contudo, devido ao alto custo dos

marcadores, mapas genéticos podem ser construídos, primeiramente, utilizando-se um marcador polimórfico para cada braço dos cromossomos de milho, totalizando um mínimo de 20 marcadores polimórficos e, posteriormente saturando as regiões mais associadas ao caráter (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Os mapas genéticos do milho mais recentes (Vuylsteke et al. (1999); Ajmone-Marsan et al. (2001)) têm combinado o uso de microssatélites com AFLPs (*amplified fragment length polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados).

Para a detecção de *QTLs* existem várias análises estatísticas. A escolha da análise apropriada é feita de acordo com a densidade de marcadores polimórficos localizados no mapa genético. Em suma, para distâncias inferiores a 15cM, análises por ponto ou intervalo proporcionam resultados similares, enquanto que se as distâncias forem maiores, acima de 35cM, entre dois marcadores, a análise por intervalo mostra-se ineficiente em detectar o *QTL*. Nas distâncias usuais de 20 a 35cM, com eventuais permutas entre marcadores e *QTL*, a análise mais adequada é a de intervalo (Doerge, 2002). As análises podem ser feitas com uma, duas ou mais marcas simultaneamente. Na análise de marca simples cada *locus* marcador é examinado separadamente para a distribuição do fenótipo e não requer conhecimento prévio da localização do marcador no genoma. A desvantagem deste método reside na baixa probabilidade de detectar o *QTL* quanto maior for a distância entre marcador e *QTL* (Tanksley, 1993) e inclusive pela dificuldade de distinção entre *QTL* de pequeno efeito situado próximo ao marcador daquele *QTL* de grande efeito, situado mais longe (Lynch & Walsh, 1998). Como alternativa para minimizar estes efeitos, é sugerido o uso de um grande número de marcadores para garantir uma boa cobertura do genoma, ou seja, a cada 15 cM (Tanksley, 1993).

Para evitar falsos *QTLs* alguns autores recomendam trabalhar com probabilidades de até 1% naqueles testes que avaliam a segregação do marcador com o fenótipo (Doerge, 2002), isto porque, numa probabilidade de erro de 5% ($\alpha=0,05$), é aceito que a cada 100 *QTLs*, cinco sejam falsos. Segundo Barbosa-Neto et al. (2000) para a confirmação de *QTLs* verdadeiros, três estratégias podem ser úteis: incrementar o tamanho da população, fenotipar a mesma população em diferentes ambientes e fenotipar uma segunda população, concentrando marcadores na região cromossômica do *QTL* putativo. Se a segunda população possuir um genitor em comum com a primeira, fica favorecida a detecção do mesmo *QTL*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos a respeito da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* foram realizados com três enfoques principais. O primeiro foi a caracterização do agente causal da moléstia e foi conduzido nos Laboratórios e em câmeras de crescimento do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e, em estufa e campo experimental do Departamento de Plantas de Lavoura, na Faculdade de Agronomia da UFRGS durante o período de março de 2001 a setembro de 2004. O segundo foi a análise da herança da resistência do milho à moléstia, sendo realizados trabalhos no campo, em Vila Maria-RS, e no Laboratório da Flora Ruderal (LAFLOR) do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS. O terceiro consistiu no mapeamento de *QTLs* para a resistência, sendo conduzido no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura.

3.1. Estudos etiológicos

3.1.1. Material vegetal

Folhas de milho com lesões típicas de *Phaeosphaeria* foram coletadas em lavouras após o pendoamento, estágio VT segundo classificação de Ritchie et al. (1992), nas

localidades de Cristalina (47°W,16°S, com altitude de 1250m) no estado de Goiás (GO), em duas épocas de cultivo, safra (semeada em setembro de 2001) e safrinha (semeada em dezembro de 2002); e de Vila Maria (52°W,28°S, com altitude de 596m), Rio Grande do Sul (RS), na safrinha (fevereiro de 2002) e safra (setembro de 2003). As quatro coletas serviram de referência para estudo da moléstia em quatro ambientes distintos. O tamanho médio de lesões foi estimado pela medida de diâmetro em 250 lesões foliares de cada local e época de cultivo.

3.1.2. Isolamento de fungos da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*

As folhas foram desinfestadas e submetidas a câmara-úmida com dois períodos de incubação, 48 e 96 horas, em fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 22±2°C para propiciar o desenvolvimento de estruturas reprodutivas (picnídios ou peritécios) de fungos na Mancha Foliar típica de *Phaeosphaeria*. Segmentos foliares, medindo 10x20mm e com lesões foram desinfestados por lavagem em água destilada com Tween 20® (2gotas/100mL) mais imersão em álcool (70%) por um minuto, outra imersão em solução 2% de Hipoclorito de Sódio comercial (com 2,5% de Cloro ativo) por 4 minutos e em seguida três enxágües em água destilada esterilizada. Uma segunda desinfestação foi realizada quando o tempo de incubação superou 48 horas mediante imersão dos segmentos foliares em álcool 70% e em solução 1% de Hipoclorito de Sódio comercial por 30 segundos cada, mais três enxágües em água destilada esterilizada. De cada lesão foliar, picnídios ou pseudotécios formados no tecido foliar necrótico ou clorótico, equivalentes ao centro e bordo das lesões, respectivamente, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (200g/L batata + 20g/L de Dextrose + 7g/L Agar + 0,02% de estreptomicina, totalizando 1L com água destilada = BDA) com o auxílio de microscópio-estereoscópico e sob condições assépticas de capela-de-fluxo-

laminar. Placas de Petri com picnídios ou pseudotécios em meio-de-cultura foram incubados à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante um período de até trinta dias para germinação e desenvolvimento dos fungos.

3.1.3. Composição de fungos na Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*

Para estimar a composição de fungos na Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* foi utilizada uma amostra de 176 lesões foliares pertencentes aos quatro ambientes. Cada lesão foi considerada uma unidade amostral, onde dez estruturas reprodutivas foram resgatadas e serviram para o cálculo da frequência relativa de fungos na lesão. Os fungos isolados foram caracterizados de acordo com características macroscópicas da colônia (cor e tipo de micélio), tipos de estrutura reprodutiva e de esporos, assim como pela localização na lesão (centro ou bordo). Fungos isolados consistentemente associados à lesão de *Phaeosphaeria* foram enviados ao CABI-Bioscience, Egham, Surrey, Reino Unido, para identificação.

3.1.4. Testes de patogenicidade

Os testes de patogenicidade foram realizados com fungos isolados neste estudo e com um isolado de *Phaeosphaeria maydis* “Anhembí”, obtido pelo Instituto Biológico (Campinas-SP) em 1994, considerado como padrão do agente etiológico no presente estudo. A identificação deste isolado também foi confirmada como sendo do gênero *Phaeosphaeria* sp. por Cervelatti et al. (2002). Os fungos foram cultivados *in vitro* para produção de esporos em placas de Petri com meio BDA ou meio de Aveia (40g/L farinha de aveia + 20 g/L Dextrose + 7g/L Agar + 0,02% de estreptomicina, totalizando 1L com água destilada) e foram incubados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas até desenvolverem estruturas reprodutivas na colônia.

A inoculação artificial constou de suspensão de esporos na concentração de 1×10^4 esporos/mL borrifada na direção do cartucho das plantas. O estágio de desenvolvimento

das plantas no momento da inoculação foi o da emissão da 6^a a 8^a folha, V6 a V8 (Ritchie et al., 1992) para aquelas cultivadas em vasos, e o da emissão do pendão, estágio VT, para as cultivadas no campo. As plantas de milho foram cultivadas em até três ambientes distintos. A sala climatizada proporcionou condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 12 horas, luminosidade de 400W por m^2 e umidade relativa do ar de 60%. A estufa plástica permitiu proteção de ventos e chuvas e menor amplitude de temperatura ambiente do que o campo (19 a 28°C). No campo, foi simulada a condição de cultivo comercial, com adubação, por hectare, de 44 kg de uréia, 41 kg de superfosfato-triplo (SFT) e 48 kg de cloreto de potássio (KCL). As temperaturas mínima e máxima durante o período foram de 11 e 35°C , respectivamente. Para os ambientes de sala climatizada e de estufa plástica, as plantas de milho foram cultivadas aos pares em vasos de 7L com substrato, numa mistura de solo e matéria orgânica, onde foram aplicados em cada vaso e antes da semeadura 0,75g de SFT e 0,63g de KCL, e depois 1,5g de uréia quando as plantas atingiram o estágio da terceira folha, V3. A partir deste estágio as plantas foram fertirrigadas semanalmente com 150mL de solução nutritiva de Hoagland (Dhingra & Sinclair, 1995). Os híbridos comerciais AS3466 e AS32, respectivamente resistente e suscetível (Pegoraro et al., 2001) foram utilizados como genótipos padrão para a verificação da efetividade das inoculações artificiais. No mínimo quatro plantas de cada híbrido foram inoculadas artificialmente com cada fungo. Outras quatro plantas de cada híbrido receberam apenas água, servindo como testemunhas. Na estufa plástica e sala climatizada as plantas inoculadas ou apenas borrifadas com água foram totalmente cobertas, ou seja, isoladas individualmente com coberturas plásticas por 72 horas. No campo, apenas oito folhas do ápice da planta foram cobertas com saco plástico por 48 horas, criando uma câmara-úmida na região onde foi aspergida a suspensão de esporos.

Para o cumprimento do teste de patogenicidade foram avaliadas três etapas: primeiro, a produção de sintomas, ou seja, formação de lesões típicas da moléstia, como consequência da inoculação artificial; segundo, o reisolamento do agente causal das lesões produzidas artificialmente, que deve ser idêntico ao fungo inoculado e, terceiro, a confirmação dos sintomas da moléstia pela inoculação artificial do fungo reisolado (Amorin & Salgado, 1995).

3.1.5. Análise estatística

As variáveis avaliadas nos testes de patogenicidade foram presença de lesões foliares nas plantas inoculadas e período de latência, correspondente ao tempo de aparecimento das primeiras lesões. A análise estatística foi realizada com o software MULTIV (Pillar, 2000). As frequências relativas dos fungos por lesão foram estimadas e uma análise multivariada da variância com teste de aleatorização, com probabilidade de 5%, comparou os ambientes quanto à composição de fungos na lesão.

3.2. Genética da resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*

Os estudos de genética da resistência foram realizados em duas condições de ocorrência da moléstia. Em condição de infestação natural, o experimento foi conduzido em campo experimental, na propriedade De Carli, localizada no município de Vila Maria (RS), a uma altitude de 596 m, no ano agrícola de 2003-2004. Em condição de inoculação artificial, foram conduzidos dois experimentos em estufa plástica no Departamento de Plantas de Lavoura de agosto a dezembro de 2004.

3.2.1. Germoplasma

O germoplasma utilizado neste trabalho foi cedido pela Empresa Agropecuária Oeste Ltda. (Agroeste). Foram considerados como padrão as linhagens LA06 (extremamente resistente), LA27 (resistente), LA67(suscetível), mais os híbridos duplo AS32 (suscetível)

e triplo AS3466 (resistente) cuja classificação foi previamente estabelecida (Pegoraro et al., 2001; Pegoraro et al., 2002) considerando diferentes épocas de semeadura (setembro a janeiro). Gerações F₁ fornecidas pela Agroeste LA06 x LA27, LA67 x LA06 e LA67 x LA27 foram autofecundadas para formação das respectivas F₂ no campo experimental do Departamento de Plantas de Lavoura.

3.2.2. Experimento com infestação natural

O campo experimental na propriedade De Carli apresenta histórico com cultivos comerciais de milho em safra e safrinha com trigo em sucessão, por cinco anos consecutivos, em sistema de plantio-direto, com ocorrência da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* há pelo menos quatro anos.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com duas repetições, sendo as parcelas constituídas pelas gerações P₁, P₂, F₁, F₂ e híbridos padrão. O tamanho de parcela variou conforme a geração, sendo as variedades híbridas (AS32 e AS3466) com 50 plantas cada; linhagens (LA06, LA27 e LA67) com 25 plantas cada; cruzamentos F₁ (LA06 x LA27, LA67 x LA06, LA67 x LA27) com 50 plantas cada e respectivas F₂ com, aproximadamente, 100 plantas. A densidade de semeadura planejada foi de cinco plantas por metro linear, sendo as linhas no campo de 5 m de comprimento, com espaçamento de 0,80 entre linhas. O híbrido suscetível AS32 foi utilizado como bordadura dos blocos e entre cruzamentos distintos. A semeadura foi realizada em 29 de novembro de 2003, com adubação de 300kg/ha da fórmula 5-20-20 (N-P-K) na base e de 100 kg/ha de nitrogênio em cobertura na forma de uréia.

As avaliações visuais de severidade da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* foram realizadas em cada planta individualmente. As avaliações tiveram início quando a incidência das primeiras lesões de *Phaeosphaeria* atingiram aproximadamente 30% das

plantas na área experimental. O período de avaliação durou 35 dias, de 22 de fevereiro até 27 de março de 2004. Foram realizados três tipos de avaliações fenotípicas para a severidade da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*. Inicialmente, a área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), calculada conforme descrição de Shaner & Finney (1977), foi constituída de cinco leituras de severidade da planta inteira, mediante o uso de escala diagramática da Agrocères (1996). As leituras foram espaçadas de seis a 13 dias, a partir dos 83 dias após a semeadura, quando a maioria das plantas atingiu a fase de pendoamento, estágio de desenvolvimento R3 (Ritchie et al., 1992). Como segunda avaliação, foi realizada a severidade final (SFINAL), em momento equivalente à quinta leitura de severidade da AACPM, em percentagem do tecido total da planta com lesões, realizada em 27 de março de 2004. Por último, a avaliação fenotípica da severidade da folha da primeira espiga (SFOLHA), em percentagem, foi realizada em 28 de março de 2004. Todas as avaliações de severidade foram realizadas por dois avaliadores, independentemente, gerando uma média entre os valores de percentagem do tecido da planta com lesões e entre as notas da escala diagramática, visando diminuir o erro experimental inerente à avaliação visual.

O grau de associação entre as variáveis de severidade, AACPM, SFINAL e SFOLHA, e entre as cinco avaliações que compõem a AACPM foram estimados através de análise de correlação de Pearson ($P < 0,01$).

A análise da variância, com complementação pelo teste de Tukey, foi utilizada para identificar resistência e suscetibilidade à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* entre as variedades padrão. O limite entre padrão resistente e suscetível foi considerado como ponto de truncamento para a análise das gerações segregantes. A análise da variância seguiu o modelo: $Y_{ijk} = m + r_j + t_i + e_{ij}$ onde Y_{ijk} = valor observado para as variáveis

AACPM, SFINAL e SFOLHA, m =média geral do experimento, r_j =efeito aleatório de repetição, t_i =efeito fixo de genótipo e e_{ij} =erro experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. As duas hipóteses de nulidade testadas através do teste F ($\alpha=0,05$) foram $H_{01}: r_j=0$ e $H_{02}: t_{ij}=0$.

A análise dos cruzamentos com suas respectivas gerações também foi realizada através de análise de variância segundo o modelo $Y_{ijk} = m + r_k + t_i + g/t_{ij} + e_{ijk}$, onde Y_{ijk} =valor observado para as variáveis AACPM, SFINAL e SFOLHA, m =média geral do experimento, r_k =efeito aleatório de repetição, t_i =efeito fixo de cruzamento, g/t_{ij} =efeito fixo de geração dentro de cruzamento e e_{ijk} =erro experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. As duas hipóteses de nulidade testadas através do teste F ($\alpha=0,01$) foram: $H_{01}: r_k=0$ e $H_{02}: g/t_{ij}=0$. A aceitação da hipótese $H_{01}: r_k=0$, permite reunir as duas repetições, ampliando o número de plantas para análise seguintes. A rejeição da hipótese $H_{02}: g/t_{ij}=0$, serve de pré-requisito para as estimativas de variabilidade genética e de parâmetros da herança da resistência.

Médias e variâncias foram calculadas para todas as gerações, P_1 (genitor 1), P_2 (genitor 2), F_1 (híbrido $P_1 \times P_2$) e F_2 (autofecundação da geração F_1) dos três cruzamentos para cada uma das avaliações fenotípicas, AACPM, SFINAL e SFOLHA. A comparação das médias F_1 , com os respectivos genitores permitiram inferências sobre ação gênica da resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*. Médias e variâncias também possibilitaram estimativa dos efeitos gênicos pelo modelo de três parâmetros, média (m), aditividade (a) e dominância (d), que foi realizada para todos os cruzamentos e avaliações fenotípicas, utilizando o método dos quadrados mínimos ponderados, segundo proposição de Cavalli (Mather & Jinks, 1982) e sua complementação pelo teste de escala em conjunto, que compara as médias observadas com as esperadas pelo teste de χ^2 . As variâncias originaram estimativas de variância fenotípica (σ^2F), genotípica (σ^2G) e variância do ambiente (σ^2E) e

da herdabilidade no sentido amplo (h_a^2), segundo as seguintes fórmulas: $\sigma^2F = \sigma^2F_2$, $\sigma^2E = (\sigma^2F_1 + \sigma^2P_1 + \sigma^2P_2) / 3$, $\sigma^2G = \sigma^2P - \sigma^2E$ e $h_a^2 = \sigma^2G / \sigma^2F$ (Allard, 1971).

As distribuições de frequências foram obtidas pelo agrupamento dos valores de AACPM em classes, sendo os intervalos de classe escolhidos de acordo com a diferenciação entre resistência e suscetibilidade nos padrões. Estas distribuições de frequências também serviram para fazer inferências de ação gênica, mediante comportamento da F_1 com relação aos genitores, e do número de genes, mediante estudo da segregação F_2 para resistência:suscetibilidade. A hipótese de segregação da geração F_2 foi verificada pelo teste de χ^2 .

3.2.3. Experimento com inoculação artificial

Dois experimentos independentes foram conduzidos, um para inoculação com o fungo *Phyllosticta* sp. e outro para *Phoma sorghina*. Apenas o cruzamento LA67xLA27 nas respectivas gerações P_1 , P_2 , F_1 e F_2 foi utilizado para a inoculação artificial das plantas de milho. As plantas foram mantidas em estufa plástica, de agosto a dezembro de 2004, com proteção de ventos e chuvas e com variação de temperatura de 15 a 35°C durante o período da semeadura até o espigamento das plantas de milho. As plantas foram cultivadas aos pares em vasos de 7 litros, com as mesmas características de substrato, adubação e irrigação usados nos testes de patogenicidade. Quando as plantas de milho atingiram o estágio da décima folha (V_{10}) foram inoculadas mediante a aspersão de suspensão de conídios, ajustada para 1×10^4 conídios mL^{-1} em água destilada autoclavada. As plantas inoculadas, com aproximadamente 5 mL de suspensão de esporos, foram mantidas fechadas em cobertura plástica por 72 horas, para obtenção do efeito de câmara-úmida, onde a temperatura máxima foi de 25°C e a umidade relativa do ar foi mantida acima de 90%. Para *Phyllosticta* sp. foram inoculadas 178 plantas das respectivas gerações LA67

(8), LA27 (6), F₁ (26) e F₂ (138), mais quatro plantas de cada híbrido padrão AS32 e AS3466. Para cobrir esta totalidade de plantas com a concentração de esporos estabelecida foi necessário a mistura de isolados do fungo provenientes de diferentes origens, sendo eles Anhembi e Mococa, de São Paulo, cedidos pelo Instituto Biológico em Campinas, e Vila Maria, no Rio Grande do Sul, da mesma área experimental onde procedeu-se os estudos de ocorrência natural da moléstia. Com *Phoma sorghina* foram inoculadas 199 plantas das respectivas gerações LA67 (10), LA27 (10), F₁ (29) e F₂ (150), mais 4 plantas de cada híbrido padrão AS32 e AS3466. Foram utilizados isolados de uma única origem, do campo experimental de Vila Maria. Como testemunhas, quatro plantas de cada híbrido padrão foram aspergidas com água estéril e, mantidas em câmara-úmida por 72 horas, isoladas daquelas plantas inoculadas.

Em condições de inoculação artificial de *Phoma sorghina* e *Phyllosticta* sp. a avaliação visual de incidência e severidade da moléstia foi realizada mediante presença/ausência e tamanho de lesões, pelo diâmetro máximo em milímetros. Para *Phyllosticta* sp. também foram avaliados os tempos de latência (dias) para a lesão apresentar clorose e necrose. Os resultados para tamanho de lesão e tempo de latência foram distribuídos em classes arbitrariamente estabelecidas.

3.3. Identificação de *QTLs* associados à resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*

Entre os cruzamentos com genitores contrastantes para o caráter resistência à mancha de *Phaeosphaeria*, foi escolhida para a análise molecular a geração F₂ do cruzamento LA67xLA27, que apresentou determinação gênica mais favorável ao estudo de *QTL*, com genes de pequeno efeito envolvidos na resistência. O cruzamento LA67xLA06, que

apresentou um forte efeito de dominância para a manifestação da resistência, foi considerado desfavorável ao estudo de *QTLs*.

A fenotipagem da resistência á Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* foi realizada sob condições de infestação natural em Vila Maria (RS) safra 2003-2004. A amostra foi constituída de 93 plantas F₂ (26 resistentes, 28 moderadamente resistentes e 41 suscetíveis) mais os dois genitores. A classificação da resistência e suscetibilidade, foi realizada utilizando o ponto de truncamento da AACPM (AACPM=85) estabelecido com os híbridos padrão e linhagens genitoras.

Para extração de DNA, amostras de folhas jovens, recém saídas do cartucho, coletadas quando as plantas estavam no estágio da décima folha, foram acondicionadas em sacos plásticos com sílica gel e enviadas para o laboratório. Os sacos hermeticamente fechados com sílica serviram para armazenamento até o início da extração do DNA, seis meses após a coleta das folhas. De cada planta, uma amostra de 20 mg de folhas desidratadas serviu para extração do DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Murray & Thompson (1980). O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,9%. Inicialmente, amostras de DNA foram diluídas 30 vezes, 3 µL de DNA da solução de extração em 87 µL de água ultrapura autoclavada e, posteriormente, aplicadas no gel de agarose em alíquotas de 10 µL. Estas amostras foram coradas com Brometo de etídio (10mg/mL), visualizadas sob luz ultravioleta e fotodocumentadas em câmara digital com o programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1. A comparação da intensidade de banda dos padrões de DNA fago λ, nas concentrações conhecidas (20, 40, 60 e 80 ng/µL), com as bandas do DNA de cada indivíduo permitiu estimar as quantidades de DNA (ng/µL). A partir dos resultados, foram realizadas novas diluições para obtenção da solução estoque de DNA (250 ng/µL) armazenada no freezer e da solução trabalho de

DNA (10 ng/ μ L) mantida em geladeira. Soluções trabalho foram preparadas em pequenos volumes (50 μ L) a cada 15 dias para evitar a degradação de DNA.

Na escolha dos *primers* de microssatélites foram incluídos *loci* de todos os cromossomos para que os grupos de ligação pudessem ser associados ao conjunto cromossômico do milho a partir de consulta à base de dados de milho (Maize GDB, 2004). A maioria dos SSRs foi escolhida por estarem localizados em regiões importantes relacionadas a estresses bióticos, como resistência a moléstias, ou abióticos, como tolerância ao encharcamento, sendo estes últimos indicados por Silva (2003).

As reações de PCR foram preparadas para um volume de 25 μ L cada. A mistura de reação continha: 60 ng de DNA genômico; Tampão 10X (Gibco BRL); 1,5 mM de MgCl₂ (Gibco BRL); 0,2 mM de dNTP (Gibco BRL); 1U de Taq-DNA Polimerase (Gibco BRL) e 0,2 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador. Uma amostra da mistura de reação sem DNA genômico foi utilizada como “controle negativo”. As amplificações foram realizadas em termociclador (modelo: PTC-100, MJ Research, Inc.). O programa para amplificação do DNA genômico foi do tipo *touchdown*, constituído de 18 ciclos, cada ciclo com uma etapa de 94°C por 1 minuto, seguida de uma etapa de anelamento com um decréscimo de 1°C a cada 2 ciclos (64°C a 55°C) e 72°C por 1 minuto e mais 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e uma etapa de alongamento de 72°C também por 1 minuto. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 3%. O gel de agarose, com duas linhas de aplicação, com 35 amostras cada, recebeu no poço da extremidade direita 4 μ L de um padrão de peso molecular (DNA Ladder 100pb). A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada com brometo de etídio em transluminador com lâmpadas ultravioletas. As imagens dos géis foram capturadas com o programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

Um total de 45 marcadores microssatélites foi analisado quanto à existência de polimorfismo com as linhagens genitoras LA67 e LA27. Marcadores foram considerados polimórficos quando detectada presença de bandas com informação diferenciada entre os genitores. Para a genotipagem da geração segregante F_2 foi utilizada apenas os microssatélites considerados polimórficos entre os genitores. Os fragmentos amplificados foram identificados conforme a similaridade com os genitores, sendo considerados homozigotos iguais ao genitor LA67, homozigotos iguais ao genitor LA27 ou heterozigotos.

A identificação do *QTL* foi realizada através de análise de regressão segundo o modelo $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \xi_i$, onde Y_i =valor fenotípico da i ésima planta F_2 para os caracteres AACPM, SFINAL e SFOLHA, X_i =valor genotípico da i ésima planta F_2 , β_0 e β_1 =parâmetros da análise e ξ_i =erro experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. Sempre que a estimativa do parâmetro β_1 foi significativa pelo teste F ($\alpha=0,01$) o marcador em questão foi considerado como associado ao fenótipo ou à herança do caráter. O coeficiente de determinação foi utilizado como indicativo da porcentagem da variação fenotípica total explicada por cada marcador individualmente (Draper & Smith, 1981). Após a análise individual de cada marcador empregado, uma análise de regressão múltipla foi realizada envolvendo somente aqueles marcadores que apresentaram associação significativa com o fenótipo. A análise de regressão linear múltipla dos marcadores foi realizada conforme Edwards et al. (1987), que consideram genótipos em locos marcadores como variáveis independentes e os fenótipos como variáveis dependentes. O coeficiente de determinação da regressão múltipla serviu para estimar a proporção da variância genética que foi explicada conjuntamente por todos os marcadores associados ao fenótipo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Etiologia da Mancha Branca do Milho

Devido a não confirmação de *Phaeosphaeria maydis* como o único agente etiológico da moléstia, a denominação Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* foi considerada inapropriada e foi substituída pela denominação “Mancha Branca do Milho”.

Neste trabalho, as lesões foliares da Mancha Branca do Milho apresentaram formato redondo ou oval, de coloração palha com bordos bem definidos de coloração parda e com uma amplitude no diâmetro de 2 a 10 mm. Essa descrição é similar a de White (2000) para a Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*, exceto pela diferença no tamanho e pela coloração branca, denominada *bleached* (Carson, 1991). Quando as lesões foliares da Mancha Branca do Milho foram examinadas quanto à origem, local e época de cultivo, apresentaram diferença de tamanho. Safra e safrinha de Goiás apresentaram diâmetro médio de 7 mm e as lesões do Rio Grande do Sul, 3 mm (Figura 1). Essas diferenças de coloração e tamanho das lesões podem ser atribuídas à interação planta x patógeno x ambiente, onde variações das lesões podem ser ocasionadas pela presença de variabilidade genética entre os genótipos de milho para resistência, pela ocorrência de diferentes espécies ou raças de

patógenos, ou pela influência das condições de ambiente durante o período de cultivo do milho (Kimati et al., 1997). A influência dos fatores genótipos de milho e variações de ambiente não foram investigados no presente trabalho, não sendo objetivo do estudo.

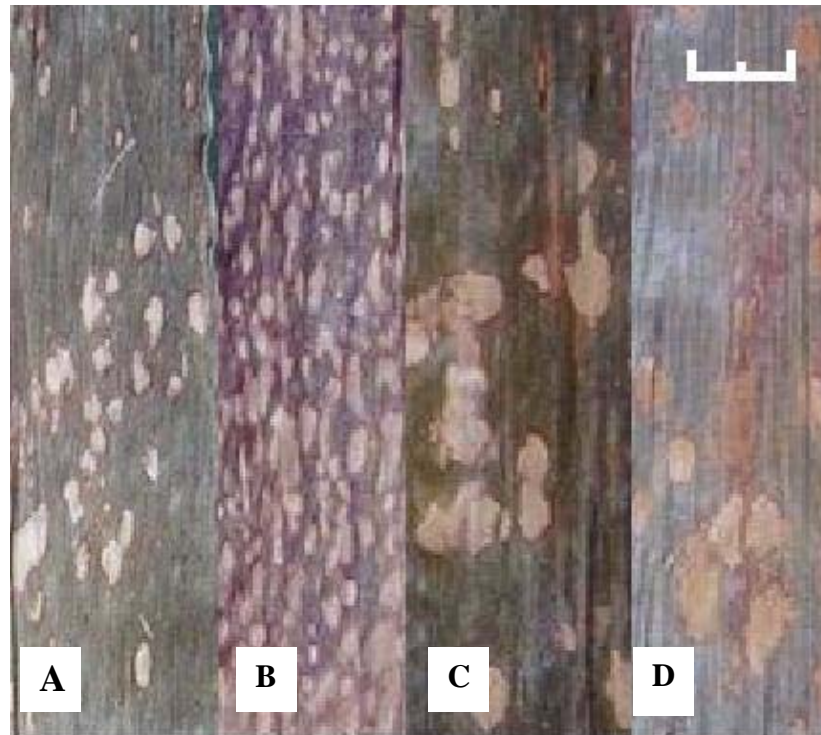


FIGURA 1: Sintomas da Mancha Branca do Milho originários de infecção natural de plantas de milho cultivados em diferentes ambientes, safras e anos, de 2001 a 2003. (A) RS- safra/2001, (B) RS- safrinha/2003, (C) GO- safra/2001, (D) GO-safrinha/2002. Barra = 1cm.

Fungos foram isolados das lesões foliares da Mancha Branca do Milho, somente a partir de câmaras-úmidas com 96 horas de incubação (Tabela 1). O maior tempo de incubação parece ter favorecido a maturação dos corpos de frutificação, assim como uma segunda desinfestação foi importante para a eliminação de fungos saprófitas. Lesões foliares quando submetidas à câmara-úmida com incubação de 96 horas possibilitaram o resgate de 2143 estruturas reprodutivas de fungos nos quatro ambientes. Desse total, 1554 eram provenientes do interior da lesão típica de *Phaeosphaeria* e 589 do bordo da lesão, em

tecido clorótico adjacente ao bordo da lesão. Em Goiás, 272 e 754 estruturas reprodutivas foram resgatadas em safra e safrinha, respectivamente. Destas estruturas reprodutivas foi possível desenvolver colônias fúngicas com êxito de 44% para a safra e de 35% para a safrinha. No Rio Grande do Sul, 564 e 553 estruturas reprodutivas foram resgatadas, com 82 e 28% de êxito na formação de colônias fúngicas, em safra e safrinha, respectivamente.

TABELA 1: Números de lesões da Mancha Branca do Milho, de estruturas reprodutivas obtidas e de colônias fúngicas desenvolvidas em dois tempos de câmara-úmida com plantas de milho cultivadas em quatro ambientes. FA-UFRGS.2003.

Ambientes	Câmara-úmida: 48 h			Câmara-úmida: 96 h		
	Lesões	Estruturas reprodutivas	Colônias	Lesões	Estruturas reprodutivas	Colônias
GO/safra	250	2616	0	180	272	121
GO/safrinha	na ¹	na	na	74	754	266
RS/safra	na	na	na	100	564	461
RS/safrinha	50	500	0	340	553	121
Total	300	3116	0	694	2143	969

1 na= não analisado

De todas as estruturas reprodutivas resgatadas em 96 horas para meio de cultura (n=2143), apenas 45% (n=969) desenvolveram colônias fúngicas, e, dentre estas, foi possível a identificação de quatro tipos de colônias com base no aspecto e esporos produzidos (Tabela 2). As colônias com coloração inicial branca que evoluíram para rosa-salmão e que finalmente ficaram rosa-escuro, com formação de picnídios nas porções negras da colônia, foram identificadas como *Phyllosticta* sp. (Figura 2A). Os picnidiosporos unicelulares e elípticos foram observados apenas em meio de aveia. Estas colônias, picnídios e picnidiosporos (Figuras 3A1 e 3A2) foram similares a *Phaeosphaeria maydis* isolado Anhembi recebido do Instituto Biológico, Campinas, SP.

TABELA 2: Número de colônias fúngicas obtidas a partir do resgate de estruturas reprodutivas (picnídios ou pseudotécios) produzidos no centro ou bordo das lesões da Mancha Branca do Milho em folhas amostradas em quatro ambientes e submetidas à câmara-úmida de 96 horas. FA-UFRGS. 2004.

Ambiente	Estrutura reprodutiva	Total	Número de colônias			
			<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phoma</i> sp. (<i>Plenodomus</i>)	<i>Phoma sorghina</i>	<i>Sporormiella</i> sp.
GO/safra	Picnídios					
	Necrótico ^{1/}	188	0	30	158	na
	Clorótico ^{2/}	0	0	0	0	na
	Pseudotécios					
	Necrótico ^{1/}	0	na	na	na	0
	Clorótico ^{2/}	78	na	na	na	78
GO/safrinha	Picnídios					
	Necrótico ^{1/}	61	0	4	57	na
	Clorótico ^{2/}	48	0	9	39	na
	Pseudotécios					
	Necrótico ^{1/}	0	na	na	na	0
	Clorótico ^{2/}	12	na	na	na	12
RS/safra	Picnídios					
	Necrótico ^{1/}	461	68	25	368	na
	Clorótico ^{2/}	0	0	0	0	na
	Pseudotécios					
	Necrótico ^{1/}	0	na	na	na	0
	Clorótico ^{2/}	0	na	na	na	0
RS/safrinha	Picnídios					
	Necrótico ^{1/}	121	3	2	116	na
	Clorótico ^{2/}	0	0	0	0	na
	Pseudotécios					
	Necrótico ^{1/}	0	na	na	na	0
	Clorótico ^{2/}	0	na	na	na	0
Total		969	71	70	738	90

Aspecto do tecido foliar na retirada da estrutura reprodutiva:

1/necrótico (centro da lesão) e 2/clorótico (tecido adjacente ao bordo da lesão)

na = não analisado.

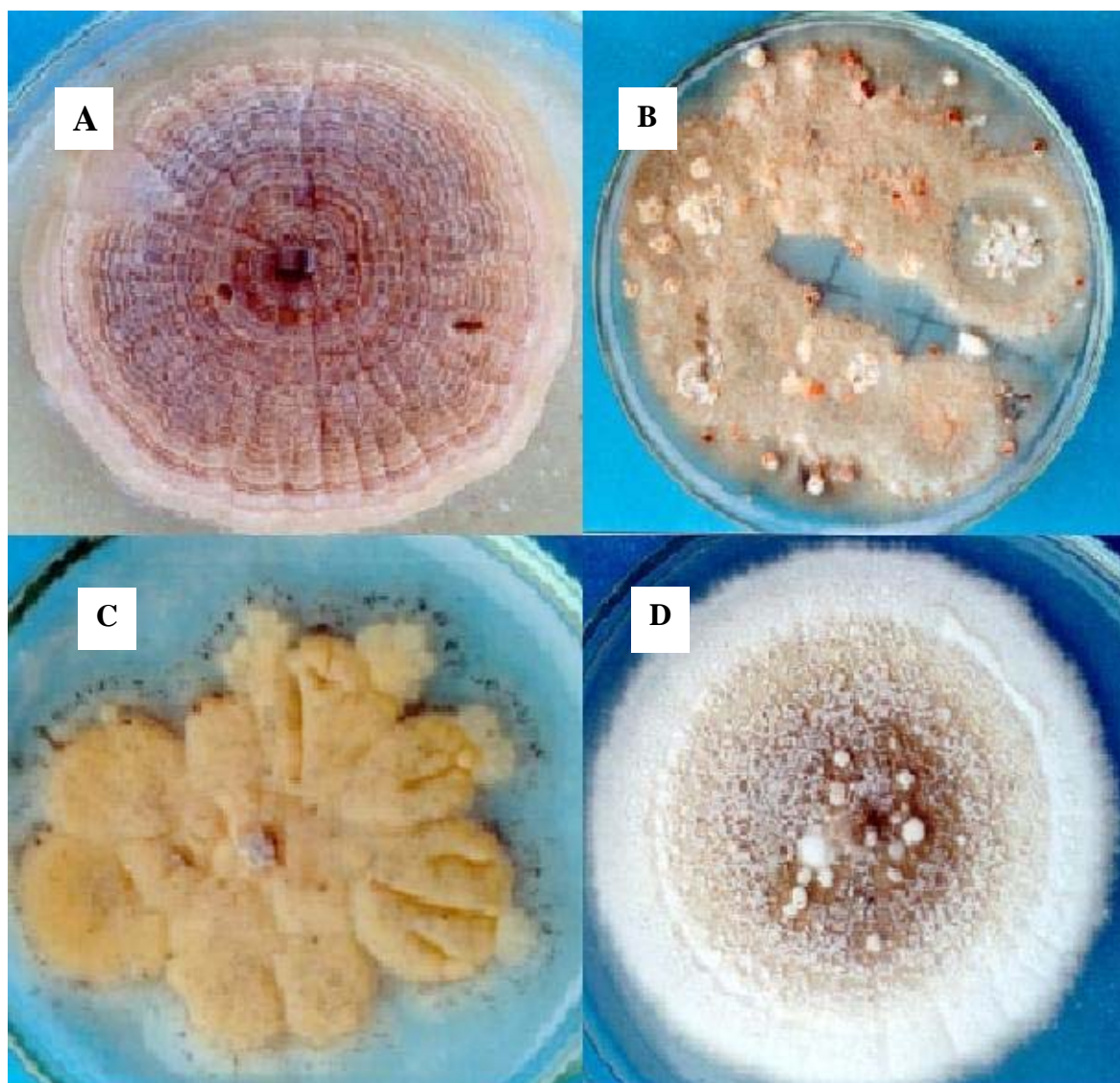


FIGURA 2: Colônias de fungos isolados da Mancha Branca do Milho em plantas cultivadas em quatro ambientes no Brasil. RS e GO. 2001-2004.
(A) *Phyllosticta* sp., (B) *Phoma sorghina*, (C) *Sporormiella* sp.,
(D) *Phoma* sp. (seção *Plenodomus*)

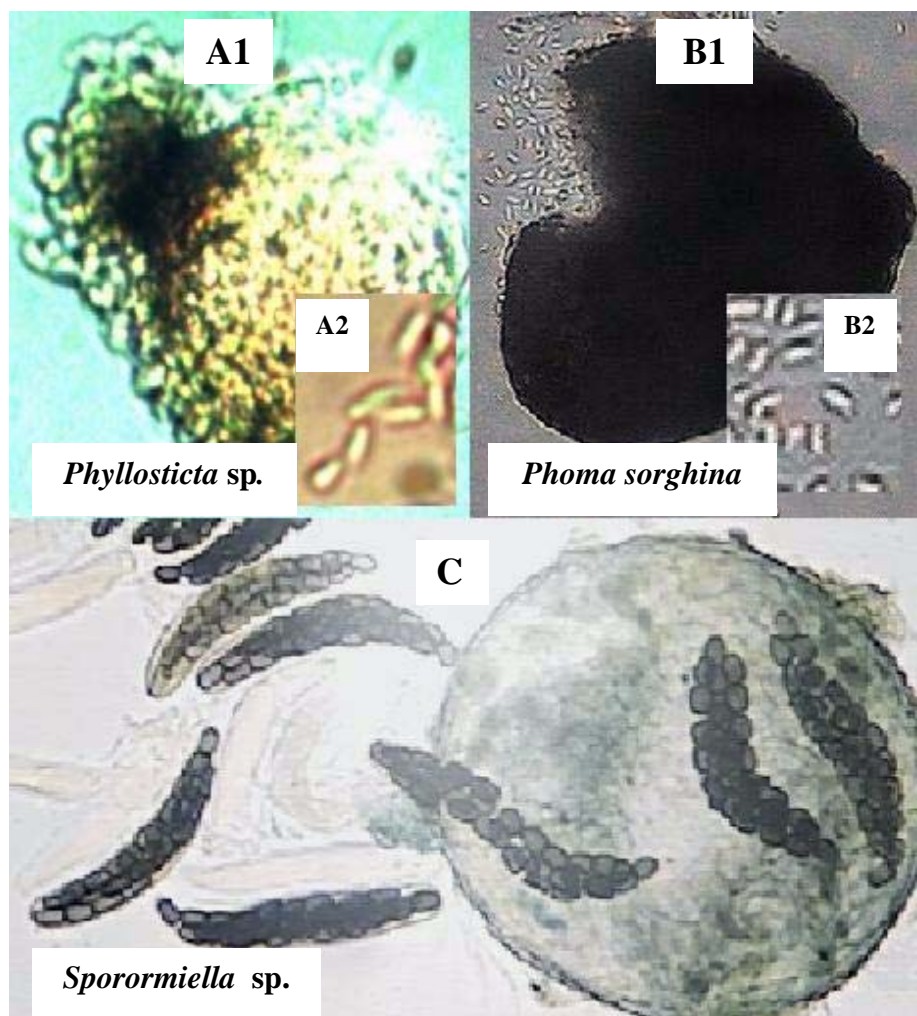


FIGURA 3: Estruturas reprodutivas e esporos de três fungos isolados da Mancha Branca do Milho em plantas cultivadas em quatro ambientes no Brasil. RS e GO. 2001-2003. Picnídio (400x): A1, B1; picnidiosporos: A2, B2; pseudotécio, ascas e ascósporos (100x): C.

Por outro lado, CABI – Bioscience identificou estas colônias como *Phyllosticta sp.*, possivelmente *Phyllosticta Zea-maydis*, anamorfa de *Mycosphaerella zea-maydis*. Como a teleomorfa não foi observada *in vivo*, nem *in vitro* no presente estudo, a identificação completa deste fungo não foi possível. Por esta razão, a denominação *Phyllosticta sp.* foi adotada. Colônias cor-de-rosa, com porções cinza em meio BDA, onde foram produzidos picnídios de cor marrom a negra, com um ou mais ostíolos e com formação de esporos unicelulares e elípticos (Figura 2B, 3B1 e 3B2) foram identificadas como *Phoma sorghina*.

Colônias de coloração clara, bege translúcida, em meio BDA, com pseudotécios transparentes através dos quais as ascas podem ser observadas (Figuras 2C e 3C), continham ascosporos de três septos e quatro células, capazes de separar-se em células para germinar individualmente, foram identificadas como sendo de *Sporormiella* sp. Colônias de coloração cinza e branca em meio BDA (Figura 2D) que desenvolveram picnídiosporos unicelulares e elípticos em picnídios de paredes pseudoparenquimatosas com duas camadas de células foram identificadas como sendo *Phoma* sp. (seção *Plenodomus*). *Phoma* sp. (seção *Plenodomus*) diferiu de *Phoma sorghina* pela morfologia da colônia e pela baixa habilidade em produzir estruturas reprodutivas *in vitro*, o que impediu a realização do teste de patogenicidade desse fungo.

Os fungos encontrados na Mancha Branca do Milho também foram caracterizados quanto à localização das estruturas reprodutivas, formadas em tecido foliar, de dentro ou do bordo da lesão, e quanto à presença nos ambientes amostrados (Tabela 2). *Phyllosticta* sp. foi obtido exclusivamente a partir de picnídios desenvolvidos em tecidos necrosados do interior das lesões no RS. *Phoma sorghina* e *Phoma* sp. (seção *Plenodomus*) ocorreram em nos quatro ambientes, desenvolvendo picnídios em tecidos cloróticos e necróticos, correspondentes ao tecido adjacente ao bordo e interior das lesões foliares, respectivamente. *Sporormiella* sp. foi encontrado exclusivamente em GO, em ambas estações de safra e safrinha, e desenvolveu seus pseudotécios apenas em tecidos cloróticos adjacentes ao bordo das lesões foliares.

Os testes de patogenicidade foram realizados para *Phaeosphaeria maydis* “Anhembi” e três fungos isolados: *Phyllosticta* sp. (isolado de um picnídio), *P. sorghina* (isolado de um picnídio) e *Sporormiella* sp. (isolado de três pseudotécios). O teste de patogenicidade do padrão de *Phaeosphaeria maydis* “Anhembi” foi realizado em sala-climatizada com

picnidiosporos da anamorfa, tendo em vista que pseudotécios não foram produzidos *in vitro*. A inoculação nas plantas produziu lesões cor palha de bordo pardo, com halo clorótico, 5 mm de diâmetro, dez a 17 dias após a inoculação dos híbridos padrão suscetível e resistente, respectivamente. As lesões evoluíram de cloróticas para necróticas em dez dias após seu aparecimento, produzindo picnídios 30 a 45 dias após a inoculação. Destes picnídios, colônias fúngicas similares a original foram obtidas e os picnidiosporos obtidos também foram capazes de causar os mesmos sintomas descritos anteriormente. Em plantas inoculadas em casa-de-vegetação e no campo, as lesões apareceram 15 dias após a inoculação e apresentaram coloração palha, bordo pardo e com halo clorótico, com 5 mm de diâmetro. Picnídios resgatados destas lesões não foram viáveis. No campo, as lesões coalesceram, resultando em lesões irregulares de aproximadamente 40 mm de diâmetro.

A inoculação artificial de plantas de milho em condições de sala climatizada com *Phyllosticta* sp. produziu lesões distintas (Figura 4A) da descrição clássica da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* feita por Carson (1991) e, ao mesmo tempo, semelhantes às aquelas descritas acima para *Phaeosphaeria maydis* “Anhembi”, em tamanho, com os mesmos tempos de desenvolvimento das lesões, dos picnídios e picnidiosporos. *Phoma sorghina* e *Sporormiella* sp. foram inoculados somente em condições de casa-de-vegetação com cobertura plástica e produziram lesões em ambos os híbridos padrão, resistente e suscetível. Com *P. sorghina* surgiram grande número de lesões cerca de 15 dias após a inoculação em ambos os híbridos padrões. Estas lesões foram de pequeno tamanho, aproximadamente 2 mm de diâmetro e de coloração palha com bordo marrom-escuro (Figura 4B). Para *Sporormiella* sp. poucas lesões apareceram nos sete primeiros dias, com coloração branca e bordos marrom-escuro, com diâmetro médio de 7 mm (Figura 4C). As lesões formadas por este fungo desenvolveram lentamente de tecido clorótico para

necrótico, necessitando em média de 21 dias após a inoculação. Para estes dois últimos fungos, as lesões surgiram em menor quantidade e com diferença de sete dias mais tarde no híbrido resistente.

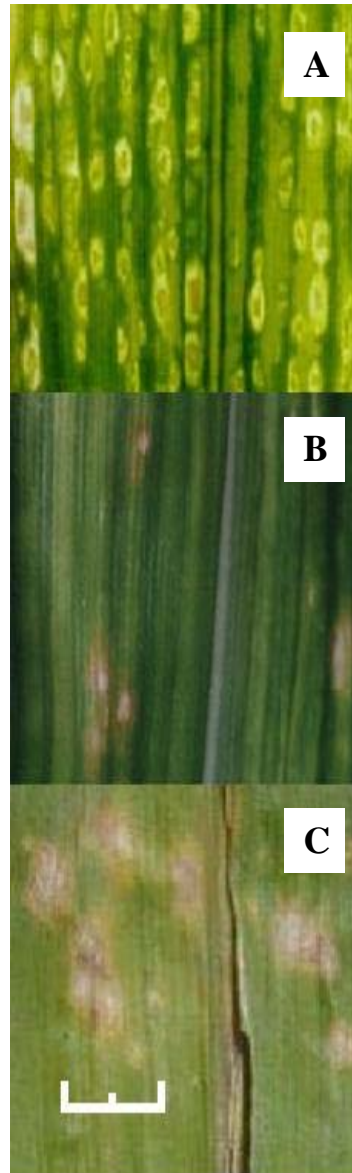


FIGURA 4: Lesões foliares em genótipo suscetível de milho (AS32) resultante de inoculação artificial *Phyllosticta* sp. (A), *Phoma sorghina* (B) e *Sporormiella* sp. (C), em condições de casa-de-vegetação. FA-UFRGS. 2003.

As inoculações artificiais nos testes de patogenicidade produziram lesões similares, porém, menores do que aquelas coletadas no campo e também não reproduziram lesões na descrição exata de outros autores (Carson, 1991; Fantin, 1994; Paccola-Mairrelles et al., 2001). Todos os fungos que demonstraram patogenicidade pertencem à ordem *Pleosporales*, que inclui gêneros de patógenos importantes de plantas e de patógenos fracos (Alexopoulos, 1996). Entre os fungos identificados neste estudo, *Phyllosticta* sp. e *Phoma sorghina* são reconhecidos na literatura como patógenos causadores de manchas de folhas (Punithalingan, 1983; Farr et al., 1989). *Phoma sorghina* é considerado como um patógeno fraco de *Poaceas*, tais como sorgo, arroz, cana-de-açúcar, milheto e forrageiras do gênero *Brachiaria*, *Clhoris*, *Panicum* e *Setaria* (Punithalingan, 1983). As lesões foliares no sorgo são redondas, com bordo marrom-escuro bem definido, e medem 1 cm de diâmetro, o que se assemelha à descrição clássica das lesões foliares de *Phaeosphaeria*. *Phoma sorghina* tem ampla distribuição geográfica, incluindo áreas tropicais e subtropicais do Brasil (Punithalingan, 1983) e sua patogenicidade em milho foi recentemente descrita (Amaral et al., 2004). Entre as várias espécies de *Phoma* spp., *P. tropica* já foi considerado como colonizador secundário da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* do milho (Cervelatti, 2001); *Phoma* sp. (seção *Plenodomus*) é reconhecido como patógeno de outras culturas, não incluindo o milho (Farr et al., 1989) e *P. terrestris* é um clássico exemplo de patógeno primário de raízes em associação com *Pythium* e *Fusarium* spp. (White, 2000). A patogenicidade de *Sporormiella* sp. em milho não tem sido documentada. Membros deste gênero são comumente considerados saprófitas em plantas (Alexopoulos et al., 1996) e lesões produzidas sobre plantas de milho podem ser artefatos de inoculação, da mesma forma que ocorreu com *Leptosphaerulina australis* em milho (Farr et al., 1989).

Para estimar a composição média de fungos patogênicos na Mancha Branca do Milho em diferentes ambientes de cultivo de milho no Brasil, foram utilizadas amostras de lesões foliares correspondentes aos ambientes de GO/safra (n=55), GO/safrinha (n=34), RS/safra (n=56) e RS/safrinha (n=31). Os resultados indicaram que o fungo mais freqüente e predominante nos quatro ambientes, considerando todas as lesões analisadas, foi *Phoma sorghina*, com uma freqüência média de 52,50% (Tabela 3). Similarmente, *Phoma* sp. (*Plenodomus*) também esteve presente nos quatro ambientes, porém, com apenas 5% de freqüência média. *Sporormiella* sp. foi detectado apenas nos ambientes de Goiás (safra e safrinha) em maior freqüência no ambiente de safra (11%) do que no de safrinha (3%). Um resultado inesperado foi à baixa freqüência de isolamento do fungo *Phyllosticta* sp, considerado na literatura como agente etiológico da moléstia. Esse fungo foi encontrado em menos de 4,03% do total de lesões estudadas e apenas no Rio Grande do Sul.

TABELA 3: Freqüência média da ocorrência de fungos patogênicos na lesão foliar da Mancha Branca do Milho em diferentes ambientes do Brasil. FA-UFRGS. 2004.

Ambiente	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Phoma</i> sp. (<i>Plenodomus</i>)	<i>Phoma</i> <i>sorghina</i>	<i>Sporormiella</i> sp.	Estatística*
RS/safra	12,14	4,39	65,30	0	a
RS/safrinha	1,00	0,65	56,13	0	ab
GO/safrinha	0	2,31	46,42	3,13	b
GO/safra	0	9,72	41,13	11,15	c
Médias	4,03	5,00	52,50	4,10	

*Ambientes seguidos por mesma letra não diferem significativamente por teste de aleatorização a 5% de probabilidade.

A detecção de vários tipos de fungos envolvidos na manifestação da Mancha Branca do Milho permitiu evidenciar diferenças significativas entre os ambientes de desenvolvimento da cultura do milho testados (Tabela 3). A época de safrinha apresentou similaridade para os tipos de fungos nas lesões, não importando o local de coleta das folhas infectadas. Por outro lado, a safra apresentou diferenças entre RS e GO. A baixa freqüência de isolamento de *Phyllosticta* sp. nas áreas amostradas no RS e sua inexistência em GO

podem indicar que, para alguns ambientes este fungo não é um patógeno importante. A importância deste fungo na manifestação da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* no Brasil já havia sido contestada por outros autores (Paccola-Meirelles et al., 2001; Cervelatti et al., 2002). A variabilidade de ocorrência de diferentes patógenos causando sintomas similares aos da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* entre safra e safrinha de um mesmo local, sugere que a presença de um ou outro patógeno depende das condições do ambiente, podendo variar entre áreas e estações de cultivo no Brasil. Como consequência, programas de melhoramento não devem basear sua seleção apenas por infestação natural. Também podem ser considerados de extrema importância trabalhos futuros que venham a investigar a distribuição e interações dos diferentes agentes causais, para o desenvolvimento de ferramentas de diagnose eficientes para a Mancha Branca do Milho.

4.2. Estudos com infestação natural

O experimento de campo foi conduzido sob condições de ambiente favoráveis à incidência da Mancha Branca do Milho; contudo, desfavoráveis ao pleno desenvolvimento da moléstia, devido à ocorrência de um período de estiagem que iniciou junto com o florescimento das plantas de milho. Houve incidência da moléstia em toda a área experimental, no entanto, a severidade não atingiu nível elevado, ficando numa amplitude de 1% e 55% da área foliar da planta com lesões. Esta amplitude de severidade se aproxima dos valores já obtidos em outros estudos (4-67%) (Pegoraro et al., 2001).

4.2.1. Diferenciação da resistência em linhagens e híbridos padrão

Na comparação de linhagens e híbridos padrão, todas as avaliações fenotípicas AACPM, SFINAL e SFOLHA revelaram diferenças entre resistência e suscetibilidade à Mancha Branca do Milho. Para AACPM e SFINAL os genótipos suscetíveis LA67 e AS32 diferiram significativamente dos resistentes LA06, LA27 e AS3466 pelo teste de Tukey

($P < 0,05$) (Figura 5). Por conseguinte, o valor limítrofe entre suscetibilidade e resistência para seleção ($AACPM = 85$ e $SFINAL = 10,5$) foi estabelecido como ponto de truncamento ($P < 0,01$) para seleção da resistência nas análises que seguem.

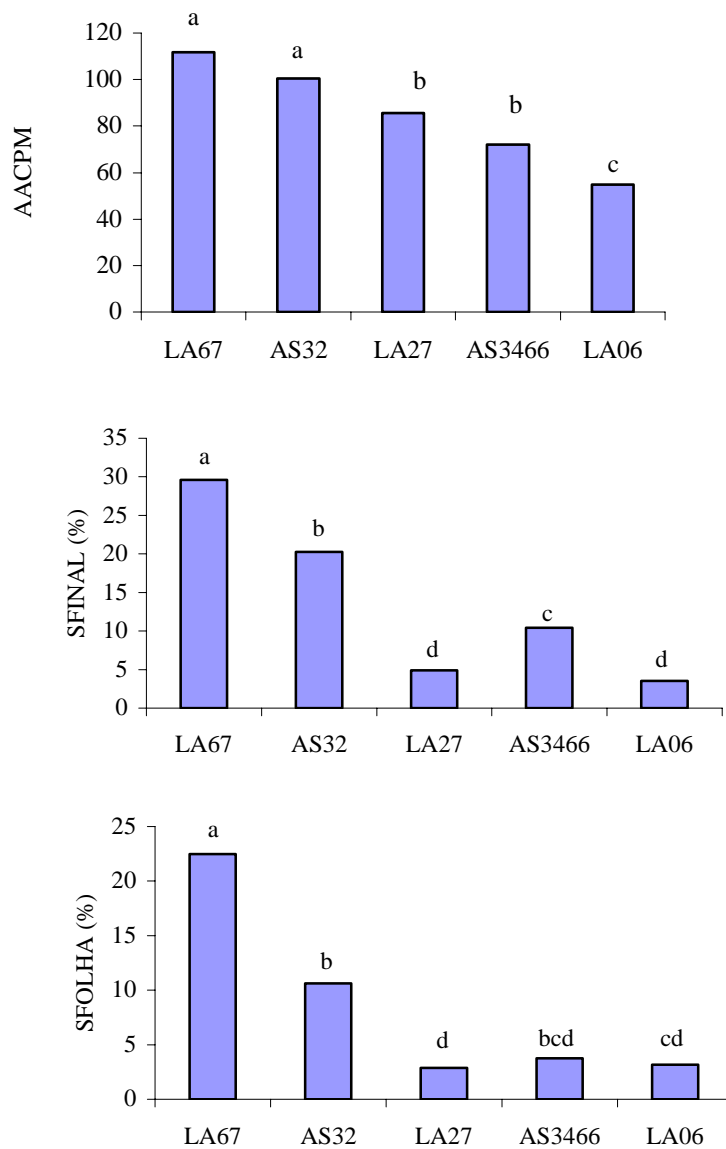


FIGURA 5: Severidade à Mancha Branca do Milho pela área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final da planta (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) para linhagens (LA) e híbridos (AS) padrão de milho. Vila Maria-RS. 2004. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para SFOLHA houve uma única separação entre as linhagens suscetível (LA67) e resistente (LA27) com o ponto de truncagem similar a SFINAL (SFOLHA=10,6). Esta última avaliação fenotípica demonstrou o menor poder de detecção entre graus de resistência e de suscetibilidade e sofreu grande influência do ambiente. Algumas plantas com severidade acima de 50% nas folhas mais velhas e anteriores a da avaliação SFOLHA, não desenvolveram esta mesma proporção de lesões na folha da primeira espiga por causa da estiagem. Considerando que a moléstia Mancha Branca do Milho iniciou a partir da oitava folha e progrediu para o ápice, a ocorrência de condição desfavorável a novas infecções pode determinar desuniformidade de lesões pelas folhas, não sendo recomendável avaliações que considerem apenas uma folha.

Ao considerar simultaneamente as três avaliações fenotípicas, AACPM, SFINAL e SFOLHA, podem ser indicados os genótipos como altamente resistente (LA06), moderadamente resistente (LA27 e AS3466), suscetível (AS32) e altamente suscetível (LA67) (Figura 5). Esta classificação nos padrões, de resistência e suscetibilidade, está em consonância com a estabelecida previamente em um ambiente diferente por Pegoraro et al. (2001) e Pegoraro et al. (2002). A mesma ordem de resistência para locais diferentes, dentro de estado do RS, pode representar estabilidade destes genótipos ou ausência de variabilidade na população do patógeno agente causal da moléstia.

4.2.2. Variabilidade para resistência nas populações segregantes

A presença de variabilidade genética nas populações estudadas foi constatada mediante as diferenças significativas entre gerações, dentro de cada cruzamento, para as variáveis na análise da variância (Tabela 4). Esse resultado sugere que os pais possuem genes e alelos diferentes para a resistência à Mancha Branca do Milho, o que é condição

essencial para realização de estudos genéticos. A única exceção foi da variável SFOLHA no cruzamento LA06xLA27 envolvendo ambos os genitores resistentes.

A análise de variância com AACPM não detectou efeito de repetição para os cruzamentos LA67xLA06 e LA67xLA27, permitindo unir os indivíduos F₂ das duas repetições para as estimativas de médias de gerações e estimativas do coeficiente de herdabilidade. Por outro lado, para as demais avaliações fenotípicas SFINAL e SFOLHA, houve efeito significativo de repetição no cruzamento LA67xLA06. O efeito de repetição por influência do ambiente afetou de forma diferenciada as avaliações fenotípicas. Aquelas avaliações pontuais, SFINAL e SFOLHA, sofreram a maior influência da desuniformidade da irrigação por aspersão, realizada no final do ciclo das plantas de milho, onde a segunda repetição recebeu menor quantidade de água nas folhas do que a primeira, que apresentou maior severidade da moléstia. Em contraste, a AACPM, resultante de cinco avaliações fenotípicas, teve o efeito negativo da desuniformidade de irrigação diluído ao longo do ciclo das plantas de milho.

Nos três cruzamentos distintos, as avaliações de severidade por AACPM, SFINAL e SFOLHA apresentaram valores de coeficiente de variação na amplitude de 8% a 59% (Tabela 4). Considerando que a avaliação de moléstias por meio de notas normalmente é trabalhosa e sujeita a erros (Bergamin-Filho, 1995), os valores do coeficiente obtidos sugerem uma boa precisão experimental. A melhor precisão experimental foi obtida para a severidade avaliada pela AACPM, com coeficientes de variação considerados baixos, de 8% a 10%. De maneira geral, a variável AACPM tem sido considerada como estável e com menor influência da época de avaliação e das flutuações de ambiente para patossistemas com milho (Parlevliet, 1979).

TABELA 4: Resumo da análise de variância e coeficiente de variação (CV) para área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) à Mancha Branca do Milho em três cruzamentos. Vila Maria-RS. 2004.

Causas da Variação	GL	Quadrado médio		
		LA06xLA27	LA67xLA06	LA67xLA27
AACPM				
Repetição	1	25,44 **	0,29	0,88
Geração	3	41,78 **	133,96 **	19,90 **
CV(%)		8,94	7,61	9,81
SFINAL				
Repetição	1	18,30 **	4,15	16,60 **
Geração	3	12,11 **	214,73 **	122,00 **
CV(%)		33,00	30,60	23,60
SFOLHA				
Repetição	1	1,95	4,15	16,60 **
Geração	3	1,62	189,00 **	128,19 **
CV(%)		59,00	49,00	41,00

** Significativo a 1% de probabilidade por teste F.

As avaliações de severidades apresentaram coeficientes de correlação significativos ($P < 0,01$), variando de 0,39 (AACPM-SFOLHA), 0,54 (SFINAL-SFOLHA) até 0,80 (AACPM-SFINAL). Como todas as avaliações medem a quantidade de tecido foliar com moléstia, era esperada a existência de associação entre elas. Esta informação é útil num programa de melhoramento para resistência, quando não é viável realizar várias avaliações durante o ciclo da planta para obter a AACPM, sendo vantajoso substituir por uma única avaliação de SFINAL. Da mesma forma, na AACPM, correlações entre as cinco avaliações de severidade, feitas por escala diagramática, fornece a informação de qual o momento em que a realização de uma única avaliação pontual seria tão informativa quanto a AACPM. Considerando que os valores das correlações são altos e crescentes, de 0,73 a 0,96, da primeira até a quinta avaliação de severidade, é possível sugerir que aos 35 dias após o florescimento seja o período mais apropriado para a realização de uma única avaliação da resistência à Mancha Branca do Milho. A avaliação de severidade através de AACPM é considerada a forma mais adequada para representar uma epidemia, contudo, para obtê-la é

necessário dispor da informação de pelo menos três avaliações durante o ciclo da planta, o que na prática, nem sempre é possível (Bergamin-Filho, 1995). Neste estudo foram consideradas as três avaliações fenotípicas de severidade sempre que conveniente; desde estudos genéticos de médias de gerações sob infestação natural até estudos com marcadores moleculares para resistência à Mancha Branca do milho.

4.2.3. Variância fenotípica, genética e herdabilidade

Foi constatada a existência de determinação genética para os caracteres AACPM, SFINAL e SFOLHA. A variância genética representou de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$ da variância fenotípica total, permitindo assegurar que as diferenças fenotípicas observadas podem ser, de fato, atribuídos ao efeito genético mais à interação com o ambiente (Tabela 5). Na estimativa de herdabilidade sentido amplo, os valores mais elevados (acima de 49%) indicam viabilidade de seleção fenotípica para resistência à Mancha Branca do milho em gerações segregantes. Por outro lado, aqueles coeficientes de herdabilidade, com valores muito reduzidos ou superiores a unidade não servem como referência para seleção da resistência e podem ser justificados, em grande parte, pela estimativa realizada com união das repetições, em detrimento do efeito significativo entre as mesmas.

É importante considerar que neste estudo, a condução do experimento em apenas um ambiente não possibilitou a avaliação da interação genótipo X ambiente e, também não permitiu separar a variância aditiva daquela não aditiva, pela inexistência dos retrocruzamentos. Desta forma, o valor de herdabilidade superior a unidade pode ser justificado pela ocorrência de desvios da interação genótipo X ambiente, por interações não alélicas ou erros de amostragem (Cruz & Regazzi, 1994). A variância do ambiente pode ter sido inflacionada pela desuniformidade de distribuição do inóculo sob infestação natural da moléstia ou pelo número amostral insuficiente da F_2 , tendo em vista que a

TABELA 5: Variâncias fenotípica, genética, de ambiente e herdabilidade (h^2_a) para severidade à Mancha Branca do Milho estimada pela área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) em três cruzamentos. Vila Maria-RS. 2003-2004.

	σ^2_P	σ^2_G	σ^2_E	h^2_a
AACPM				
LA06xLA27	0,82	0,39	0,43	0,48
LA67xLA06	0,89	0,44	0,45	0,49
LA67xLA27	1,16	0,38	0,78	0,33
SFINAL				
LA06xLA27	0,43	0,98	0,35	2,28
LA67xLA06	0,96	0,66	0,30	0,69
LA67xLA27	1,21	0,28	0,93	0,23
SFOLHA				
LA06xLA27	1,06	0,16	0,90	0,15
LA67xLA06	1,11	-0,04	1,15	0,03
LA67xLA27	1,62	0,84	0,78	0,52

proximidade e a quantidade das avaliações fenotípicas da AACPM podem ser considerados adequados. Por todas estas considerações, os valores estimados de herdabilidade neste estudo não devem ser interpretados como definitivos, mas como indicativos de herdabilidade favorável para os melhoristas. Sobretudo, existem publicações com coeficientes de herdabilidade para resistência à Mancha Branca do milho ainda mais elevados, variando de 61% a 88% (Lopes, 2003; Pegoraro et al., 2002; Silva, 2002; Carson, 2001; Das et al., 1989b). No caso específico dos cruzamentos deste estudo, em um trabalho independente em ambiente diferente, Pegoraro et al. (2002) obtiveram estimativas de herdabilidade mais elevadas ao usar uma maior amostragem da F_2 . Todas estas diferenças encontradas nas estimativas da herdabilidade devem ser interpretadas como específicas para os genótipos e ambientes estudados e não como um atributo fixo do caráter fenotípico avaliado (Allard, 1971).

4.2.4. Análise de média de gerações

Na análise de médias de gerações para três cruzamentos distintos avaliados por AACPM, SFINAL E SFOLHA, houve consonância de maior variância na geração F₂ e de menor variância nas gerações fixas (Tabela 6). Exceção foi observada para aqueles cruzamentos onde a linhagem mais suscetível LA67 esteve presente, causando uma grande amplitude para a suscetibilidade. Essa maior amplitude para a linhagem LA67 pode ser explicada pelos desvios do ambiente e interação genótipo X ambiente. Convém ressaltar que a falta de controle da fonte de inóculo, em infestação natural, também pode determinar uma desuniformidade de infecções, ocasionando maior severidade naquelas partes do campo experimental com maior concentração de inóculo e onde as condições do ambiente foram mais favoráveis ao patógeno.

TABELA 6: Número de indivíduos, médias e variâncias para área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) para a Mancha Branca do Milho, em gerações de três cruzamentos. Vila Maria-RS. 2003-2004.

Gerações	n	AACPM		SFINAL		SFOLHA	
		Média	Variância	Média	Variância	Média	Variância
LA06 x LA27							
P ₁	14	54,91	0,24	3,53	0,34	1,78	3,17
P ₂	20	85,75	0,66	4,88	0,29	1,69	2,86
F ₁	2	82,26	0,39	7,29	0,43	1,00	1,00
F ₂	162	81,18	0,82	6,92	0,89	1,82	3,31
LA67 x LA06							
P ₁	26	111,72	0,45	29,70	0,36	4,74	22,47
P ₂	14	54,91	0,24	3,53	0,34	1,78	3,17
F ₁	13	57,76	0,66	5,95	0,20	2,21	4,88
F ₂	169	72,25	0,43	6,30	0,96	1,83	3,35
LA67 x LA27							
P ₁	26	111,72	0,45	29,70	0,36	4,74	22,47
P ₂	20	85,75	0,66	4,88	0,29	1,69	2,86
F ₁	22	100,80	1,23	20,07	2,14	2,97	8,82
F ₂	182	102,62	1,06	18,23	1,11	2,57	6,60

Na análise das gerações para o cruzamento entre linhagens resistentes (LA06xLA27) as médias da F_1 e F_2 foram próximas ao valor do genitor de menor resistência (LA27), o que sugere ocorrência de dominância completa para o genitor menos resistente. Da mesma forma que nesse cruzamento, a presença de variância na geração F_2 sugere a existência de pelo menos dois genes de resistência diferentes nos genitores. Nos cruzamentos entre linhagens contrastantes foi detectada dominância completa para a resistência (LA67xLA06), com a média da F_1 similar ao genitor resistente (LA06), e dominância parcial para a suscetibilidade (LA67xLA27), com a média da F_1 mais próxima ao genitor suscetível (LA67). O fato de este resultado ser similar aquele obtido por trabalho independente, que estudou os mesmos cruzamentos em ambientes distintos, (Pegoraro, 2002) incrementa a confiabilidade, diante da condição que estudos de médias de gerações devem ser conduzidos em mais de um ambiente para excluir efeitos da interação genótipo X ambiente (Allard, 1971).

A estimativa dos efeitos gênicos pelo modelo de três parâmetros (Mather & Jinks, 1982) foi adequada para todos os cruzamentos e avaliações fenotípicas de severidade (Tabela 7). Isto significa que, o modelo aditivo-dominante explica as bases genéticas da resistência à Mancha Branca do Milho e, por conseguinte, os efeitos de epistasia são negligenciáveis. Esta prevalência de aditividade no controle genético da resistência à Mancha Branca do Milho representa facilidade na identificação de genótipos superiores, com maior concentração de alelos favoráveis. Neste sentido, diversos trabalhos já constataram a predominância de efeitos aditivos para resistência à Mancha Branca do Milho (Paterniani, 1988; Lima et al., 1998; Carson, 2001; Silva, 2002; Lopes, 2003).

TABELA 7: Valores estimados para os parâmetros média [m], aditividade [a] e dominância [d] e significância do teste de escala para severidade à Mancha Branca do Milho estimada pela área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade da folha (SFOLHA) em três cruzamentos. Vila Maria-RS. 2003-2004.

Cruzamento	[m]	[a]	[d]	χ^2 ¹
AACPM				
LA06xLA27	8,37	0,76	-0,94	0,10 ^{NS}
LA67xLA06	9,02	1,59	-1,31	0,07 ^{NS}
LA67xLA27	9,93	0,18	0,65	0,02 ^{NS}
SFINAL				
LA06xLA27	2,06	0,69	-0,16	0,06 ^{NS}
LA67xLA06	3,62	-1,23	1,78	0,28 ^{NS}
LA67xLA27	3,84	0,72	1,62	0,01 ^{NS}
SFOLHA				
LA06xLA27	-	-	-	-
LA67xLA06	3,00	-0,83	1,57	0,57 ^{NS}
LA67xLA27	3,16	-0,31	1,50	0,14 ^{NS}

1 NS = Não significativo a 1% de probabilidade por teste de Qui-quadrado.

Na AACPM os efeitos de dominância foram superiores aos de aditividade, para os cruzamentos LA06xLA27, LA67xLA06 e LA67xLA27, com sinais negativos e positivo para a dominância, respectivamente. Considerando que resistência à Mancha Branca do Milho é inversamente proporcional aos valores de AACPM, os valores negativos obtidos para o parâmetro [d] indicam dominância no sentido da menor severidade, ou seja, da maior resistência (LA06xLA27, LA67xLA06) e, os valores positivos indicam dominância no sentido da maior severidade, ou seja, da suscetibilidade (LA67xLA27). Para as demais avaliações fenotípicas, SFINAL e SFOLHA, a dominância também teve participação preponderante na determinação da suscetibilidade.

4.2.5. Análise de distribuição de frequências da AACPM

Em concordância com as análises de médias de gerações, a distribuição de frequências na Tabela 8 demonstrou dominância para resistência (LA67xLA06) e dominância incompleta para a suscetibilidade (LA67xLA27) na observação das gerações F₁ em relação aos genitores correspondentes. Neste estudo, as estimativas de ação gênica

A hipótese de herança monogênica para a resistência a Mancha Branca do Milho, com segregação 3:1 foi testada nos cruzamentos contrastantes para resistência, LA67xLA06 e LA67xLA27. Para tanto, foi pressuposto um modelo aditivo-dominante, conforme a análise de média de gerações, e foram estimadas as proporções de plantas resistentes e suscetíveis, na segregação F_2 , pelo ponto de truncagem pré-estabelecido com as plantas padrões (AACPM=85). Para LA67xLA06 foi aceita a hipótese de um gene (3 resistentes:1 suscetível), contudo, não existem apenas duas classes fenotípicas, resistente e suscetível, provavelmente por influencia de genes de menor efeito, além da interação com o ambiente (Tabela 8). Para LA67xLA27 a hipótese foi rejeitada ($P=0,005$), porque estariam envolvidos mais de um gene de resistência, com pequeno efeito no fenótipo, os quais determinam numa distribuição contínua das classes de resistência e suscetibilidade. Diante disso, pode-se verificar que a resistência à Mancha Branca do Milho tanto pode ser predominantemente de herança simples, quanto pode ser de natureza mais complexa, pelo envolvimento de genes de resistência parcial e inclusive sem interações inter-alélicas. Para Vale et al. (2001) a resistência parcial não é visível quando há a presença concomitante de genes com grande efeito na resistência. Diante dessa consideração é que se deve examinar as publicações de herança à resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*, onde já foram identificados: de três a quatro genes de grande efeito na resistência (Carson, 2001); até três genes (Silva, 2002; Lopes, 2003) e pelo menos dois genes independentes (Pegoraro et al., 2002).

No mínimo dois aspectos devem ser considerados com o uso intensivo de uma resistência genética à moléstia exercida por poucos genes de grande efeito no fenótipo: um é a necessidade de avaliar a possibilidade do patógeno desenvolver a médio ou longo prazo, adaptação a esta resistência e o outro é a sua estabilidade em relação a diferentes

populações do patógeno (Casela, 2004). E nesse contexto, a decisão por seleção de resistência parcial para Mancha Branca do Milho, mais duradoura e estável, implicaria em adotar uma estratégia de melhoramento diferenciada. Num primeiro momento, seria favorecido o acréscimo de vários genes de resistência parcial para, posteriormente inserção de um ou poucos genes de efeito maior (Parlevliet & Ommeren, 1988).

4.3. Estudos com inoculação artificial

Para a inoculação artificial de *Phyllosticta* sp. e de *Phoma sorghina* utilizou-se apenas o cruzamento LA67xLA27 nas gerações F₁, F₂, suas respectivas linhagens genitoras e os híbridos padrão. Na inoculação artificial buscou-se maior controle das causas de variação, inerentes ao ambiente e quantidade de inóculo inicial, do que supostamente ocorreria em infestação natural no campo, a fim de proporcionar uma prova monocíclica da moléstia Mancha Branca do Milho. Para melhor estudar os componentes da resistência parcial em plantas, uma prova monocíclica da moléstia deve ser criada, mediante inoculação artificial do patógeno, num genótipo com resistência parcial (Niks & Lindhout, 2004). No presente trabalho, foram avaliados além da presença de lesões, os componentes da resistência (tamanho de lesão e período de latência, de clorose e necrose da lesão). O caráter severidade não foi avaliado porque este estaria muito suscetível à uniformidade de distribuição do inóculo da inoculação artificial. De maneira geral, as condições de inoculação artificial parecem ter favorecido a ocorrência da moléstia, tendo em vista a reação de suscetibilidade manifestada por genótipos que tinham sido resistentes no campo (Tabela 9).

TABELA 9: Frequências de plantas nas classes fenotípicas de avaliação da Mancha Branca do Milho quanto à presença, tempo de latência para clorose e necrose e diâmetro das lesões, por geração, no cruzamento LA67xLA27, linhagens e híbridos padrão, sob inoculação artificial de *Phyllosticta* sp. e de *Phoma sorghina*. UFRGS. 2004.

Patógeno	Genótipo	Lesões												
		Plantas (n)		Clorose (dias)				Necrose (dias)				Diâmetro (mm)		
		Não	Sim	25	35	45	60	20	25	35	45	1	4	7
<i>Phyllosticta</i> sp.	LA67	2	6	1	2	1	2	1	2	3	0	0	1	2
	LA27	0	6	0	3	1	2	0	3	1	2	1	3	2
	F ₁	15	11	0	8	3	0	0	8	3	0	1	3	4
	F ₂	41	97	26	34	30	7	26	43	28	0	9	25	42
	AS3466	0	4	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1
	AS32	1	3	1	2	0	0	1	2	0	0	0	3	0
<i>Phoma sorghina</i>	LA67	0	10	na				0	10	0	0	0	10	0
	LA27	7	3	na				0	3	0	0	0	3	0
	F ₁	9	20	na				0	20	0	0	0	20	0
	F ₂	62	88	na				0	88	0	0	0	88	0
	AS3466	4	0	na				0	0	0	0	0	0	0
	AS32	0	6	na				0	6	0	0	0	6	0

Não avaliado (na)

Na inoculação artificial com *Phyllosticta* sp., as linhagens e híbridos padrão apresentaram presença de lesões foliares, independentemente da classificação prévia no campo de resistência ou suscetibilidade. O mesmo tipo de lesão, cor palha com bordos pardos, descrito nos testes de patogenicidade com *Phyllosticta* sp. e *Phaeosphaeria maydis* foi obtido neste experimento (Figura 6-1A). A resistência do tipo imunidade e a falta de discriminação entre linhagens e híbridos padrão não eram esperadas neste experimento com inoculação artificial, já que as mesmas não tinham sido observadas sob infestação natural da moléstia.

Segundo Bergamin-Filho & Amorin (1996) as condições criadas para a inoculação artificial podem favorecer a infecção e ocasionar mais moléstia do que em uma situação natural de lavoura. Para avaliação das causas do favorecimento da ocorrência da moléstia, pode-se considerar que a condição nutricional das plantas mantida em vasos, favorecendo a

formação de tecidos tenros, mais o tempo e condições da câmara-úmida, devem ter favorecido a infecção pelo patógeno. Por outro lado, a ocorrência de plantas sem lesão nas gerações F₁ e F₂, observadas na análise de distribuição de frequência, só pode ser justificada pela inoculação ineficiente, em decorrência de aspersão desuniforme do inóculo.

Na avaliação do tempo de latência da formação de lesões, com inoculação artificial de *Phyllosticta* sp., foi observada uma amplitude de tempo para desenvolvimento de clorose, 20 a 45 dias, e para necrose, 25 a 60 dias (Figura 6-1B). Para clorose, houve distinção entre as linhagens, as suscetíveis necessitaram de 20-35 dias e as resistentes um período maior de 25-45 dias; sendo que, nas gerações F₁ e F₂ houve tendência ao menor tempo para clorose, quando em até 25 dias a maioria já estava visivelmente clorótica. Para atingir a necrose, não houve distinção entre as linhagens resistentes e suscetíveis; sendo que nas gerações F₁ e F₂ também houve tendência para um tempo reduzido de 35 dias para a necrose. Em desacordo, os híbridos padrão não apresentaram diferenças evidentes quanto ao tempo de latência das lesões. O pequeno tamanho de amostra utilizado, de 3 a 4 plantas, pode ser apontado como restritivo à diferenciação da resistência com a suscetibilidade, tendo em vista que, sempre houve diferença de uma semana a mais para o aparecimento das lesões no híbrido padrão resistente (AS3466) comparado ao suscetível (AS32) nos testes de patogenicidade para o fungo *Phyllosticta* sp.; da mesma forma que AS32 e AS3466 deferiram significativamente pela SFINAL e AACPM no experimento de campo, com infestação natural, onde supostamente o fungo *Phyllosticta* sp. também está presente.

O tempo de latência na formação de lesões foliares, que serviu para a diferenciação de linhagens quanto à resistência à Mancha Branca do Milho, tem sido considerado componente de resistência parcial muito importante nas moléstias policíclicas porque está

relacionado à habilidade do fungo em reproduzir-se e causar reinfecções em um único ciclo da planta (Bergamin-Filho & Amorin, 1996). A importância do menor tempo de latência pode ser relacionada à habilidade do fungo em crescer vegetativamente e produzir toxinas no interior dos tecidos do hospedeiro suscetível, para que mais rapidamente sejam formadas suas estruturas reprodutivas. Estas estruturas reprodutivas permitem ao fungo enfrentar condições adversas de sobrevivência, acumular-se sobre a palha remanescente até que as condições fiquem favoráveis para a infecção de cultivos de milho subsequentes, o que caracterizaria a importância do tempo de latência no estudo do patossistema da Mancha Branca do Milho.

Quando avaliado o diâmetro de lesões obtidas na inoculação artificial com *Phyllosticta* sp. foram constatadas diferenças entre genótipos de lesões grandes, superiores a 7mm (Figura 6-1C) e pequenas, inferiores a 2 mm (Figura 6-1D). Foi detectada preponderância do maior tamanho de lesão na linhagem suscetível LA67, assim como na maioria das plantas F₁ e F₂ onde, de maneira geral, houve tendência à suscetibilidade. Em contraponto, os híbridos padrão foram contraditórios para o caráter tamanho de lesão. Na comparação entre experimentos, as lesões produzidas nos híbridos padrão foram similares quanto ao tipo e superiores no tamanho àquelas dos testes de patogenicidade; da mesma forma que foram do mesmo tipo daquelas produzidas sob infestação natural, sem comparação do tamanho da lesão porque o caráter não foi aferido no campo.

Quando a intenção é comparar respostas à moléstia em situações diferentes, como entre infestação natural e inoculação artificial, deve-se também analisar se o patógeno inoculado é o único ou o principal agente causal da moléstia que se desenvolve no campo. Desta forma, as incoerências obtidas na reação de resistência de genótipos inoculados

artificialmente com o patógeno podem ser justificadas pela pequena participação de *Phyllosticta* sp. na formação das lesões foliares do campo.

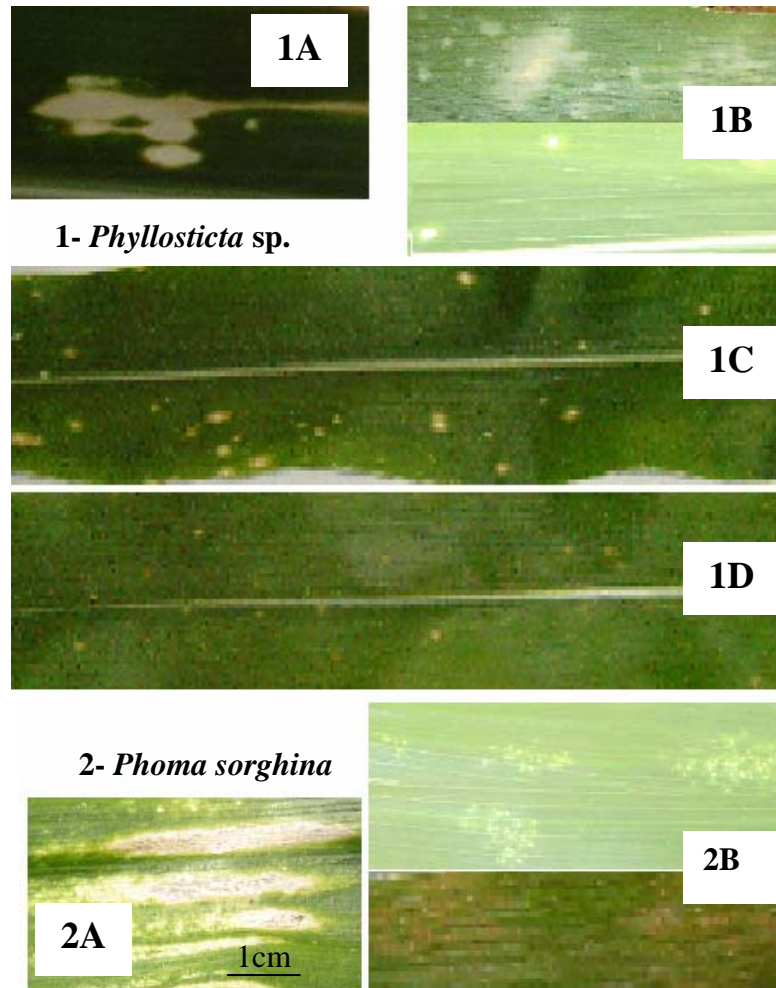


FIGURA 6: Lesões foliares produzidas em prova monocíclica por inoculação artificial dos fungos *Phyllosticta* sp. e *Phoma sorghina* em plantas de milho. FA-UFRGS. 2004. Lesões provocadas por *Phyllosticta* sp. (1A) e *Phoma sorghina* (2A), desenvolvimento de lesões de clorose até necrose (1B e 2B) e diferença entre genótipos com lesões grandes (1C) e pequenas (1D).

A inoculação com *Phoma sorghina* produziu lesões sobre os genótipos de milho (Figura 6-2A) e permitiu detectar diferenças entre os genótipos resistentes e suscetíveis, com maior eficiência do que foi observado para *Phyllosticta* sp., contudo não foram verificadas diferenças entre os componentes de resistência parcial, tamanho e período de latência (Figura 6-2B) das lesões (Tabela 9). A presença de lesões foi observada em maior

freqüência na linhagem e no híbrido suscetíveis do que nos resistentes e, as gerações F₁ e F₂ apresentaram segregação com preponderância para a suscetibilidade. Na avaliação de tempo de latência, as lesões surgiram e evoluíram rapidamente de clorose para necrose, não sendo possível distinguir com avaliações semanais e, em até 30 dias, todas lesões tornaram-se necróticas. Em relação ao tamanho de lesão (2-4mm) não houve diferença entre os genótipos estudados. Estes resultados de ocorrência e tamanho de lesão estão em total acordo com aqueles obtidos no teste de patogenicidade com *P. sorghina*. Em desacordo, o tempo de latência de lesões não permitiu diferenciação dos híbridos padrão, tal qual foi possível nos experimentos de teste de patogenicidade para este fungo. O teste de patogenicidade e a inoculação artificial, foram realizados na estufa plástica em condições similares, contudo, a temperatura pode ser apontada como diferença marcante entre os experimentos, com médias de 19°C e de 28°C, respectivamente. Ao reconhecer que o estresse por temperaturas pode aumentar a suscetibilidade das plantas (Bedendo, 1995) é provável que as temperaturas extremas, acima de 30° C, ocorridas durante o experimento de inoculação artificial, tenham influência na falta de discriminação de resistência e suscetibilidade entre os híbridos padrão.

Em suma, estudos com os componentes da resistência revelaram que o período de latência pode ou não ser importante para diferenciar resistência de suscetibilidade, tanto à *Phyllosticta* sp. como à *Phoma sorghina*. O tamanho de lesão pode ser importante na diferenciação entre genótipos resistentes e suscetíveis, mediante inoculação artificial com *Phyllosticta* sp. e não é importante para diferenciar resistência a *Phoma sorghina*. O ambiente teve papel importante na influencia da ocorrência de moléstia, e a presença de genes de grande efeito, como na determinação da susceptibilidade, podem justificar a

resposta predominantemente qualitativa, que prejudicou as avaliações quantitativas dos componentes de resistência parcial.

Ao fazer um paralelo dos resultados de inoculação artificial dos fungos com as avaliações de ocorrência da moléstia por infestação natural foi verificado que o fungo *Phoma sorghina*, considerado predominante na Mancha Branca do Milho, produziu uma lesão muito menor que no campo, contudo, permitiu diferenciar com consistência a resistência da suscetibilidade, assim como verificado no campo. Em contrapartida, o fungo *Phyllosticta* sp., encontrado em baixa frequência na Mancha Branca do Milho, somente em alguns locais, e que produziu uma lesão similar em tipo e tamanho, demonstrou sofrer grande influência das condições do ambiente. Havendo possibilidade de diferenciar ou não a resistência de suscetibilidade, entre os genótipos padrão, e conforme o ambiente de inoculação artificial. Nas provas monocíclicas com *Phoma sorghina* foi possível diferenciar qualitativamente as cultivares padrão quanto à resistência e suscetibilidade, havendo grande similaridade com a resposta da prova realizada no campo, sob infestação natural da moléstia. Por outro lado, com inoculação de *Phyllosticta* sp. foi possível diferenciar resistência de suscetibilidade somente quantitativamente através dos componentes da resistência (tamanho e período de latência das lesões). Diante de todas estas constatações, cabe a rejeição da hipótese de que apenas um patógeno, isoladamente, explicaria a etiologia da Mancha Branca do Milho, sendo possível à existência de um complexo de patógenos, incluindo *Phoma sorghina* e *Phyllosticta* sp.

Quanto ao método de isolamento de fungos, por resgate de estruturas reprodutivas, deve ainda ser considerado que este não é uma medida direta da presença do patógeno nos tecidos da planta, nem infalível na verificação da ocorrência do patógeno em diversos ambientes. Estas limitações do método podem até justificar a baixa frequência de

P.maydis, encontrado apenas em alguns dos ambientes estudados. Como a análise do método não está em questão, todas estas considerações permanecem em aberto, assim como, não podem ser rejeitadas as hipóteses que incluem outros agentes patogênicos, tais como bactérias (Paccola-Meirelles et al., 2001) e fungos biotróficos (Oliveira et al., 2004) para explicar a etiologia desta moléstia. Diante dos fatos, a denominação “Mancha Branca do Milho” seria um nome mais apropriado e marcaria a diferença com a moléstia relatada em outros países. Nos Estados Unidos da América, o fungo *Phaeosphaeria maydis* é o único responsável pela etiologia da moléstia, sendo a teleomorfa encontrada, abundantemente nas lesões ao final do ciclo das plantas. No presente estudo a teleomorfa nunca foi encontrada, considerando todas as coletas de folhas com a moléstia, no final do ciclo das plantas de milho, em quatro ambientes distintos localizados no Sul e centro-oeste do Brasil, mais acompanhamento da epidemia no campo experimental em Vila Maria-RS, além das inoculações artificiais em vários ambientes, com acompanhamento das lesões até o final do ciclo das plantas.

No Brasil, onde nenhum levantamento completo da moléstia foi realizado, representando a diversidade de ambientes de cultivo do milho, não é possível generalizar nem afirmar que se trata de uma única moléstia, com lesões de coloração variável desde branca até palha, ou que se tratam de moléstias distintas, com sintomas similares, chamadas erroneamente pelo mesmo nome: “Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*”.

4.4. Análise molecular da resistência à Mancha Branca do Milho

Devido ao conhecimento de que microssatélites apresentam alto grau de polimorfismo em milho (Chin et al., 1996) era esperado encontrar polimorfismo para o caráter resistência à Mancha Branca do Milho. Contudo, do total de 45 marcadores microssatélites analisados com as linhagens genitoras LA67 e LA27, apenas 16 revelaram

polimorfismo (Tabela 10). Esta proporção de 35,5% de polimorfismo é baixa e pode ser explicada pela utilização de gel de agarose (3%), que não permite detectar diferenças pequenas, inferior a 5pb, entre os segmentos amplificados (Senior, 1997).

Dentre os marcadores polimórficos, foi verificada sua segregação para três tipos de fenotipagem, AACPM, SFINAL e SFOLHA. Na figura 7 pode ser observada a segregação da F₂ em um gel com o marcador Bnlg439 em comparação com seus genitores. Com a AACPM foi possível identificar seis *QTLs* associados ao caráter resistência à Mancha Branca do Milho. Com SFINAL apenas três dos *QTLs* anteriores foram também detectados. Com SFOLHA nenhum *QTL* foi detectado, demonstrando a ineficiência desta avaliação fenotípica para este propósito (Tabela 11).

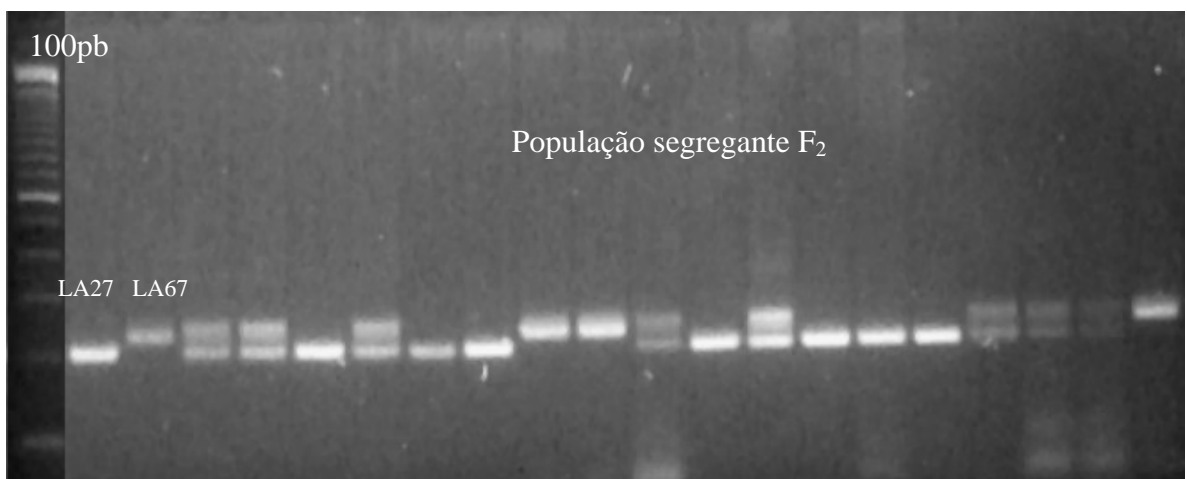


FIGURA 7: Genotipagem de indivíduos da população segregante F₂: LA67xLA27, com o marcador microssatélite Bnlg439 em gel de agarose 3%. FA-UFRGS. 2004. LA27 (resistente) e LA67(suscetível).

TABELA 10: Marcadores microssatélites (*Primers*), *locus* ligado, seqüência repetitiva (Rep), local no mapa e polimorfismo na análise molecular da população F₂:LA67xLA27 visando a identificação de *QTLs* para resistência à Mancha Branca do Milho em milho. FA-UFRGS. 2004.

<i>Primers</i>	<i>Locus</i> ligado	Rep	Local ¹	Polimorfismo ²
Umc1727	<i>Prc3</i> - proteasome component3	(CGT)4	1.01	P
Bnlg439		ni	1.04	P
Phi011	<i>Glb1</i> - globulin1	(AGC)	1.09	P
Umc1064	<i>Fdx3</i> - ferredoxina	(CT)8	1.11	P
Umc1331		(GGT)10	1.11	M
Umc1622	<i>Crr1</i> - regulador resposta a citocinina	(AAG)5	2.00	M
Umc1026		(CT)9	2.04	M
Umc1696		(GA)8	2.10	P
Phi029	<i>tpi4</i> - triseofosfato isomerase 4	AG/AGCG***	3.04	M
Phi073	<i>Gst4</i> - glutathione-s-transferase4	(AGC)	3.05	P
Phi046	<i>npi</i> - 257 ^a	ACGC	3.08	M
Umc1010	<i>plt2</i> - proteína fosfolípido transferase- homóloga 2	(GA)10	3.09	M
Umc1594		(TA)10	3.10	M
Phi021	<i>Adh2</i> - álcool desidrogenase 2	AG	4.03	M
Nc004		AG	4.03	M
Umc1550	<i>Pdi1</i> - protein disulfide isomerase1	(CT)6	4.03	P
Phi074	<i>zp22.1</i> - zeina 22.1	CAA	4.04	M
Nc005	<i>gpcl</i> - gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase1	CT	4.05	M
Phi079	<i>gpcl</i> - gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase1	AGATG	4.05	M
Phi026	<i>gpcl</i> - gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase1	CT	4.05	M
Umc1466	<i>Pdh1</i> - piruvato desidrogenase1	(CTTC)4	4.08	M
Umc1197	<i>Cat3</i> - catalase3	AT	4.11	P
Phi006	<i>Cat3</i> - catalase3	CCT	4.11	P
Phi008	<i>rab 15</i> - resposta ao ácido abscísico	GGC	5.03	M
Umc1056	<i>Pxl3</i> - peroxidase	(AGCA)4	5.03	M
Umc1564	<i>Rps15</i> - proteína ribossomal 15	(CAG)5	5.03	M
Umc1225		(AG)6	5.08	P
Umc1023	<i>Fdx2</i> - ferredoxina	(AT)11	6.00	M
Umc1018	<i>Gpc2</i> - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase2	(CT)7	6.01	P
Phi081	<i>Pdk1</i> - piruvato ortoquinase diquinase 1	GAT-TAC	6.05	M
Nc012		CT	6.05	M
Umc1341	<i>Roa2</i> - origem e replicação ativador 2	(CTGT)4	6.06	M
Umc1545	<i>Hsp3</i> - proteína tolerância choque de calor 3	(AAGA)4	7.00	M
Umc1433		(AG)6	7.02	P
Umc1034		(GA)12	8.03	M
Umc1202	<i>Rip1</i> - inativador da proteína 1 do ribossomo	(GGC)7	8.04	M
Umc1741	<i>Rps28</i> - proteína ribossomal s28	(TC)7	8.04	P
Umc1636		(ACTGC)4	9.02	P
Phi016		GGT	9.04	M
Umc1094	<i>Sod9</i> - superóxido dismutase 9	ni	9.05	P
Phi065	<i>Pep1</i> - fosfoenolpiruvato	CACTT	9.03	M
Umc1733	<i>hb1</i> - haemoglobina	(CATC)4	9.06	M
Umc1576	<i>gdcp1</i> - glicina descarboxilase	(TG)6	10.02	P
Umc1648		(TC)8	10.04	M
Phi071	<i>Hsp90</i> - proteína choque de calor 90 kda	GGA	10.04	M

¹ (Cromossomo. Bin) = localização no mapa genético do milho para os marcadores moleculares. O Bin está designado no lado direito, parte decimal, e o cromossomo à esquerda, parte inteira. ² (Polimorfismo) = polimórfico (P) e monomórfico (M) em gel de agarose 3%. Não informado (ni).

TABELA 11: *Loci* de microssatélites relacionados a *QTLs* para área abaixo da curva de progresso da moléstia (AACPM), severidade final (SFINAL) e severidade na folha (SFOLHA) da Mancha Branca do Milho, efeitos gênicos, probabilidades e coeficientes de determinação. FA-UFRGS. 2004.

Microssatélites	Variável	Efeito gênico		Valor P	R ² parcial
		Aditividade	Dominância		
Umc1433	AACPM	-18,09	14,7	<0,0001	0,25
	SFINAL	-5,49	2,63	0,0014	0,14
Phi011	AACPM	-10,42	-39,38	0,0013	0,16
	SFINAL	-3,36	-4,06	0,035	0,09
Umc1018	AACPM	-10,34	-0,7	0,007	0,11
Umc1064	AACPM	-8,75	12,72	0,0128	0,11
Bnlg439	AACPM	-4,92	-12,89	0,0234	0,08
Umc1225	AACPM	-7,87	11,94	0,02	0,09
	SFINAL	-2,49	4,96	0,0323	0,09
Valor fenotípico total					
	AACPM				0,80
	SFINAL				0,32
Valor genotípico					
R ² múltiplo	AACPM				0,58
	SFINAL				0,24

* Medida no mapa do milho para localização do marcador molecular nos cromossomos. Bin está designado no lado direito, parte decimal, e o cromossomo à esquerda, parte inteira.

R² parcial= proporção da variação fenotípica explicada pelo *QTL*.

R² regressão múltipla= proporção da variação genotípica explicada por todos *QTLs*.

Neste estudo foi possível detectar *QTLs* associados à resistência à Mancha Branca do Milho coincidindo com regiões já mapeadas para resistência à Mancha de *Phaeosphaeria*, em outros estudos com populações diversas e ambientes diferentes no Brasil e EUA. O *QTL* de maior efeito foi localizado pelo marcador Umc1433 no braço curto do cromossomo 7, local considerado por Carson (1996) como importante na determinação da resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*. O *QTL* explicou 25% da variação fenotípica total para o caráter AACPM. Um outro *QTL* foi confirmado pelo marcador Bnlg439, de pequeno efeito, explicando apenas 8% da variação fenotípica, tal como previamente indicado por Lopes (2003). Marcadores moleculares com este comportamento podem ser de grande utilidade quando o objetivo é a construção de mapa genético em consenso no

Brasil para a resistência à moléstia Mancha Branca do Milho. Mapas consenso elaborados a partir de diferentes populações segregantes de uma cultura em ambientes diversos são importantes para seleção assistida por marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Outros *QTLs* de pequeno efeito, de 9 a 16% da variação fenotípica para AACPM, foram localizados, na sua maioria, em regiões consagradas pela presença de genes de resistência às moléstias. No cromossomo 1 e distantes do Bnl439, estão os marcadores Phi011 e Umc1064. Em uma região cromossômica próxima (Bin 1.04) está localizado um agrupamento de genes de resistência, onde já foram identificados genes para *Cercospora* (Lehmensiek et al., 2001) Giberela (Pe et al., 1993), Carvão (Zaitlin et al., 1993), viroses (Kyetere et al., 1995) e inclusive *Phaeosphaeria maydis* (Lopes, 2003). O cromossomo 5, no Bin 5.08, onde está localizado Umc1225, já foi apontado como local importante para resistência à Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* (Lopes, 2003). Além disso, nesse cromossomo, do Bin 5.01 até 5.07, já foram indicados importantes *loci* para resistência a moléstias do milho, sendo elas *Setosphaeria turcica* (Zaitlin et al., 1992), *Erwinia* (Ming et al., 1995), Cercosporiose (Bubek et al., 1993; Lehmensiek et al., 2001), *Giberella Zeae* (Pe et al., 1993). Junto ao centrômero do cromossomo 6, Bin 6.01, coincidindo com a localização do marcador Umc1018, existe outro agrupamento de genes para resistência a moléstias do milho causadas por vírus (*High plains*), fungos (*Cochliobolus heterostrophus*) e bactéria (*Erwinia stewarti*) (McMullen & Sincox, 1995). Ainda no agrupamento 6.01 e, especificamente, para a Mancha Foliar de *Phaeosphaeria*, o trabalho de Lopes (2003) apontou outros dois marcadores para identificar *QTL*, o que confirma a importância desse local no genoma do milho. Junto ao centrômero do cromossomo 7, Bin 7.02, está localizado o marcador Umc1433. Este local está distante em no máximo 20 cM da região indicada por Carson (1996) como importante para a resistência à Mancha Foliar de

Phaeosphaeria. Além disso, nestas proximidades e até o Bin 7.03, já foram encontrados *loci* para resistência a *Erwinia stewartii* (Ming et al., 1995b) e *Setosphaeria turcica* (Zaitlin et al., 1992). Todos juntos os *QTLs* significativos explicaram 58% da variação fenotípica total observada para o caráter resistência à Mancha Branca do Milho, pela AACPM. Como os marcadores moleculares de DNA não sofrem influência do ambiente, o R^2 do modelo da regressão múltipla pode explicar qual é a participação da variação genética em relação à variação fenotípica total observada.

Quanto aos efeitos gênicos dos *QTL*, foram detectados aditividade e, principalmente, dominância e sobredominância. Os *QTL* próximos aos marcadores Umc1433 e Umc1018 exibiram ação gênica preponderante de aditividade, apesar de também apresentarem uma importante participação de dominância. Para os demais, Phi011, Umc1064, Bnlg439 e Umc1225, foi constatada ação gênica de sobredominância, onde efeitos de dominância superam os de aditividade.

Os seis *QTLs* indicados por este estudo foram analisados em um único ambiente, o que, teoricamente, impossibilita excluir os efeitos da interação genótipo X ambiente e não impede a declaração de falsos *QTLs*. Contudo, a confiança na detecção destes *QTLs* pode ser incrementada pela similaridade obtida na comparação com outros trabalhos realizados independentemente, com cruzamentos e locais diferentes. Dentre os seis *QTLs* detectados, no mínimo quatro deles podem ser considerados verdadeiros e importantes na determinação da resistência à Mancha Branca do Milho. Três marcadores, Bnlg439, Umc1225 e Umc1018, estão localizados exatamente no *Bin* onde Lopes (2003) também detectou *QTL* para a Mancha Foliar de Phaeosphaeria; assim como o marcador Umc1433, que localizou o *QTL* de maior efeito neste estudo, teve localização coincidente com a região considerada importante na determinação da Mancha Foliar de Phaeosphaeria por

Carson (1996). Desta forma, a saturação com marcadores moleculares nas regiões cromossômicas próximas aos quatro *QTLs* deste trabalho, indicam boas perspectivas de resultados para trabalhos futuros que desejam melhorar a estimativa de efeito dos *QTLs*, aumentar a eficiência na seleção assistida e obter maiores chances de clonagem do *QTL* para resistência a Mancha Branca do Milho.

Tendo em vista o pequeno número de marcadores microsatélites usados neste trabalho, não foi possível atingir a saturação adequada para uma boa cobertura genômica, restando apenas a alternativa de estimativa de ligação com o microsatélite por ponto, ou marca simples. Com este tipo de análise estatística, não é possível distinguir no cromossomo 1, com os marcadores Bnl439, Phi011 e Umc1064, se existe proximidade de um ou mais *QTLs* de pequeno efeito, ou se existe uma distância relativamente maior de um ou mais *QTLs* de grande efeito na resistência à Mancha Branca do Milho. Diante destes conhecimentos, os *QTLs* detectados neste estudo não devem ser interpretados como definitivos e poderão ser confirmados, seguindo alguma das estratégias sugeridas por Barbosa-Neto et al. (2000), como utilizar os marcadores mais informativos deste estudo em outras populações segregantes, preferencialmente com um genitor em comum; ou fenotipar a mesma população em ambientes distintos.

5. CONCLUSÕES

Diante da nova caracterização etiológica, com a composição de fungos variando conforme o ambiente, a denominação “Mancha Branca do Milho” é considerada mais apropriada para a moléstia conhecida por Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* no Brasil.

Estudos de herança da resistência à Mancha Branca do Milho indicam facilidade para seleção de genótipos resistentes pela herdabilidade média e contribuição do modelo aditivo dominante. Contudo, dependendo da constituição genética da população e do tipo de estratégias de melhoramento utilizado é possível selecionar tanto uma resistência total e específica à raça, quanto uma resistência parcial e não-específica à raça, sendo esta estável e, portanto, mais efetiva entre locais onde a etiologia da moléstia apresenta variações.

A análise de ligação gênica entre marcadores moleculares e genes de resistência à Mancha Branca do Milho, permitiu identificar QTLs que explicam uma boa fração da variância genética, indicando a possibilidade de uso na seleção assistida, o que facilitaria a seleção da resistência parcial sem especificidade à raça e contribuiria para obtenção de genótipos com resistência estável, para os diversos ambientes de cultivo de milho no Brasil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCERES. **Guia Agrocere de Sanidade**. São Paulo: Sementes Agrocere, 1996. 72p.
- AJMONE-MARSAN, P. et al. Identification of *QTLs* for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using AFLP map, different testers, and cofactor analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Belfast, v.102, p.230-231, 2001.
- ALEXOPOULUS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996. 869p.
- ALLARD, R.W. **Princípios do Melhoramento Genético das Plantas**. Rio de Janeiro: Usaid & Edgard Blücher, 1971. 380p.
- AMARAL, A.L. et al. *Phoma sorghina* a new pathogen associated with Phaeosphaeria Leaf Spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, Surrey, v.53, n. 2, p.259, 2004.
- AMARAL, A.L. et al. Pathogenic fungi causing symptoms similar to Phaeosphaeria Leaf Spot of maize in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v.89, p.44-49, 2005.
- AMORIN, L.; SALGADO, L.C. Diagnose. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L.S. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.224-233.
- AMORIN, L. Ciclos Primário e Secundário. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995a. v.1, p.234-243.
- AMORIN, L. Avaliação de Doenças. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995b. v.1, p.647-670.
- ARNY, D.C.; NELSON, R.R. *Phyllosticta maydis* species nova, the Incitant of Yellow Leaf Blight of Maize. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, p.1170-1172, 1971.

- BALMER, E.; PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e Produção de Milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.595-634.
- BARBOSA NETO, J.F. et al. Chromosomal regions associated with barley yellow dwarf virus resistance in oat. **Euphytica**, Wageningen, v.114, p.67-76, 2000.
- BARNETT, H.I.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St. Paul: APS Press, 1998. 218p.
- BEDENDO, I.P. Ambiente e Doença. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.331-341.
- BERGAMIN FILHO, A. Curvas de Progresso da Doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.602-625.
- BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIN, L. **Doenças de Plantas Tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289p.
- BOMFETI, C.A. et al. Microscopia de lesões da doença descrita no Brasil como Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, suplemento, p. 235, 2004. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 37., 2004, Gramado, RS.
- BRUNELLI, K.R.; SILVA, H.P.; CAMARGO, L.E.A. Mapeamento de genes de resistência a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n. 2, p.134-140, 2002.
- CAMARGO, L.E.A. Análise Genética da Resistência e da Patogenicidade. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.470-491.
- CARSON, M.L. *Phaeosphaeria* Leaf Spot of Maize in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n. 9, p.968, 1991.
- CARSON, M.L. Vulnerability of U.S. maize germ plasm to *Phaeosphaeria* Leaf Spot. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, p.462-464, 1999.
- CARSON, M.L. Inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, n. 7, p.798-800, 2001.
- CARSON, M.L.; CHARLES, S. **Quantitative trait loci conditioning resistance to phaeosphaeria leaf spot caused by *Phaeosphaeria maydis***. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2005.
- CARSON, M.L.; STUBER, C.W.; SENIOR, M.L. Identification of Quantitative Trait Loci (*QTLs*) for Resistance to two Foliar Diseases in a Mapping Population of Recombinant Inbred (RI). **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n. 11, p.59, 1996.

- CASELA, C.R. Manejo de doenças do milho causadas por fungos necrotróficos. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25., 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: ABMS, 2004. 1 CD-ROM.
- CERVELATTI, E.P. et al. Diferenciação Molecular de Fungos Isolados a partir de Picnídios e Pseudotécios Presentes nas Lesões da Mancha Foliar de *Phaeosphaeria* em Milho (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: ABMS, 2000. 1 CD-ROM.
- CERVELATTI, E.P. et al. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of *phaeosphaeria* leaf spot in maize. **Revista Brasileira Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n.3, p.30-37, 2002.
- CHIN, E.C.L.; SENIOR, M.L.; SMITH, J.C.S. Maize simple repetitive DNA sequence: Abundance and allele variation. **Genoma**, Ottawa, v.39, p.866-873, 1996.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390p.
- DAS, S.N.; PRODHAN, H.S.; KAISER, S.A.K.M. Further studies on the inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Indian Journal of Mycological Research**, New Dehli, v.27, n. 2, p.127-130, 1989a.
- DAS, S.N.; SINHAMAHAPATRA, S.P.; BASAK, S.L. Inheritance of resistance to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize. **Annual Agricultural Research**, Nadia, v.10, n. 2, p.182-184, 1989b.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. Florida: CRC Lewis, 1995. 448p.
- DOERGE, R.W. Mapping and Analysis of Quantitative Trait Loci in Experimental Populations. **Nature Reviews / Genetics**, London, v.3, p.43-52, 2002.
- DRAPER, J.M.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. 2.ed. New York: John Wiley, 1981. 709p.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and types of genes action. **Genetics**, Bethesda, v.116, p.113-125, 1987.
- FANTIN, G.M. Mancha de *Phaeosphaeria*, moléstia do milho que vem aumentando a sua importância. **Biológico**, São Paulo, v.56, p.39, 1994.
- FANTIN, G.M.; BALMER, E. Método de inoculação e evolução dos sintomas da mancha foliar de *Phaeosphaeria maydis* em milho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.23, p.64-65, 1997.
- FANTIN, G.M.; COUTINHO, A.S.V.A.; COLETTI, M.P.B. Métodos de inoculação de *Phaeosphaeria maydis* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, suplemento, p.371, 2001. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 34., 2001, São Pedro, SP.

FANTIN, G.M.; RESENDE, I.C. Teste preliminar de inoculação de *Phaeosphaeria maydis* em plantas de milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, suplemento, p.282, 1999. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 32., 1999, Curitiba, PR.

FARR, D.F. et al. **Fungi on plants and plant products in the United States**. St Paul: APS, 1989. 1252p.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1997. 80p. (Circular técnica, 26)

FERNANDES, F.T.; SANS, L.M.A.; PINTO, N.F.J.A. Influência de fatores climáticos na ocorrência de *Phyllosticta* sp. em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, suplemento, p.309, 1995. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 28., 1995, Ilhéus, BA.

FERREIRA, M.E; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995. 220p.

FLETT, B.C. **Pathogen epidemiology and development of integrated control management for white spot on maize**. Disponível em: <<http://www.arc.agric.za/institutes/gci/main/projects/abstracts/cropprotecion03...>> Acesso em: 27 jan. 2005.

FOX, R.T.V. **Principles of diagnostic techniques in plant pathology**. Wallingford: CAB International, 1993. 213p.

GODOY, C.V.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A. Efeito da mancha de *Phaeosphaeria maydis* na eficiência fotossintética de plantas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, suplemento, p.246, 1998. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 31., 1998, Fortaleza, CE.

HALLAUER, A.R.; MIRANDA FILHO, J.B. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2. ed. Ames: Iowa State University Press, 1988. 468p.

HANLIN, R.T. **Illustrated Genera of Ascomycetes**. St. Paul: APS Press, 1992. 263p.

JANN, E.V.; SANCHEZ, W.; FELIPPE, J.M. Eficácia do fungicida Opera[®] no controle de doenças foliares, aplicado em diferentes estádios de desenvolvimento, na cultura milho pipoca (*Zea mays* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, suplemento, p.284, 2004a. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 37., 2004, Gramado, RS.

JANN, E.V.; DUARTE, R.J.F.; IKEDA, M.; FELIPPE, J.M. Eficácia do Fungicida Pyrachlostrobin + Epoxiconazole no controle de *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, suplemento, p.285, 2004b. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 37., 2004, Gramado, RS.

KIM, S.K.; BREWBAKER, J.L. Inheritance of general resistance in maize to *Puccinia sorghi* Schw. **Crop Science**, Madison, v.17, p.456-461, 1977.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 3 ed. v.2: Moléstias de Plantas Cultivadas. São Paulo: Ceres, 1997. p. 546-551.

- KYETERE, D. et al. Monogenic resistance to maize streak virus maps to the short arm of chromosome 1. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v.69, p.136-137, 1995.
- LEHMENSIEK, A. et al. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. **Theoretical and Applied Genetic**, Belfast, v.103, p.797-803, 2001.
- LIMA, M. et al. Cruzamentos Dialélicos Parciais entre Linhagens de Milho com Ênfase na Produtividade e Doenças Foliaves. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife. **Anais...** Recife: ABMS, 1998. p.38.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hipervariável microssatélite revelada por *in vitro* amplificação de um dinucleotídeo repetido dentro do gene da actina muscular cardíaca. **American Journal of Human Genetics**, New York, v.44, p.398-401, 1989.
- LOPES, M.T.G. **Mapeamento de Genes de Resistência à Mancha de *Phaeosphaeria* em Milho**. Piracicaba: Universidade de São Paulo. 2003. 117f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, 2003.
- LUZ, W.C. **Indicações técnicas para a cultura do milho no RS**. Porto Alegre: FEPAGRO: EMBRAPA/TRIGO: EMATER/RS: FECOAGRO/RS, 2001. 11p. (Boletim Técnico, 7) Moléstias do milho e seu manejo integrado.
- LYNCH, M. WALSH, B. **Genetics and Analysis of Quantitative Traits**. Sunderland: Sinauer, 1998. 980p.
- MAIZEGDB. Maize Genetics and Genomics Database. Contém informações do genoma do milho, marcadores moleculares e publicações Disponível em: <<http://www.maizegdb.org/ssr.php>>. Acesso no período: 01 ago. 2004 a 01 dez. 2004.
- MARRIEL, I.E. et al. Análise quantitativa e metabólica da população bacteriana em lesões de mancha foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, suplemento, p.203, 2004. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 37., 2004, Gramado, RS.
- MATHER, K.; JINKS, J.L. **Biometrical Genetics** 3 ed. London: Chapman & Hall, 1982. 396p.
- McMULLEN, M.D.; SIMCOX, K.D. Clustering of disease resistance loci in the maize genome. **Maize Genetics and Cooperation Newsletter**, Columbia, v.69, p.52-53, 1995a.
- McMULLEN, M.D.; SIMCOX, K.D. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.811-815, 1995b.
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 187p.
- MING, R.; McMULLEN, M.D.; BREWBAKER, J.L.; PRATT, R.C.; MOON, H.G.; MUSKET, T.; HOLLEY, R. RFLP mapping of genes conferring resistance to *Erwinia stewartii*. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v.69, p.60, 1995.

MURRAY, M.; THOMPSON, W.F. Rapid Isolation of High-molecular-weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.

NIKS, R.E.; LINDHOUT, W.H. **Curso sobre Mejoramento para Resistencia a Enfermedades y Plagas**. 3 ed. Wageningen: Wageningen University, 2004. 216p.

OLIVEIRA, E. et al. A mancha por *Phaeosphaeria* em milho no Brasil: Evidências de um novo agente etiológico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29 suplemento, p.175, 2004a. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 37., 2004, Gramado, RS.

OLIVEIRA, E. et al. A mancha por *Phaeosphaeria* em milho no Brasil: Evidências de um novo agente etiológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MILHO E SORGO, 25., 2004, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: ABMS, 2004b. 1CD-ROM.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. et al. Detection of bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.149, p.275-279, 2001.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. et al. Confirmação da etiologia da doença descrita no Brasil como sendo a mancha foliar de *Phaeosphaeria* em milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MILHO E SORGO, 25., 2004, Cuiabá, 2004. **Anais...** Cuiabá, ABMS, 2004. 1CD-ROM.

PAIVA, F.A. Manejo de Doenças causadas por fungos biotróficos em sistemas de plantio direto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MILHO E SORGO, 25., 2004. Cuiabá, **Anais...** Cuiabá: ABMS, 2004. 1CD-ROM.

PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.203-222, 1979.

PARLEVLIET, J.E. Present Concepts in Breeding for Disease Resistance Private. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, suplemento, p.7-15, 1997. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 30., 1997, Poços de Caldas, MG.

PARLEVLIET, J.E.; VAN OMMEREN, A. Accumulation of partial resistance in barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. **Euphytica**, Wageningen, v.37, p.261-274, 1988.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z. et al. Cruzamentos dialélicos entre linagens de milho com diferentes níveis de resistência a moléstias foliares. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22. Recife, 1998. **Anais...** Recife, ABMS, 1998. p.98.

PE, M.E. et al. Mapping quantitative trait loci (*QTL*) for resistance to *Giberella zeae* infection in maize. **Molecular and General Genetics**, New York, v.214, p.11-16, 1993.

PEDROSA, M.G. **Mapeamento Genético para Resistência à Cercosporiose, Mancha de Feosféria e Ferrugem Comum na Cultura do Milho**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. 2002. 102f. (Mestrado em Fitopatologia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Instituto de Ciências Agrárias, UFU, Uberlândia, 2002.

PEGORARO, D.G. et al. Efeito da época de semeadura na mancha foliar de *Phaeosphaeria* em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n. 8, p.1037-1042, 2001.

- PEGORARO, D.G. et al. Herança da resistência à mancha foliar de feosféria em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n. 3, p.329-336, 2002.
- PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. v.2, p.538-555.
- PILLAR, V.D. **Multiv**: Software para análise multivariada, auto-reamostragem bootstrap e testes de aleatorização, versão 2.11. Porto Alegre: Departamento de Ecologia da UFRGS, 2000. 1 CD-ROM.
- PUNITHALINGAM, E. *Phoma sorghina*. In: IMI-DESCRIPTIONS OF PATHOGENIC FUNGI AND BACTERIA. **Descriptions sheets of Bactéria and Fungi**. Egham: CABI – BIOSCIENCE, 1999. 1CD-ROM
- PUNITHALINGAM, E. *Mycosphaerella zea-maydis*. In: IMI-DESCRIPTIONS OF PATHOGENIC FUNGI AND BACTERIA. **Descriptions sheets of Bactéria and Fungi**. Egham: CABI – BIOSCIENCE, 1999. 1CD-ROM
- QAYOUM, A.; LINE, R.F. High-temperature, adult-plant resistance to stripe rust of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, p.1121-1125, 1985.
- RANE, M.S.; PAYAK, M.M.; RENFRO, B.L. A Phaeosphaeria leaf spot of maize. **Indian Phytopathology Society Bulletin**, New Dehli. v.3, p.8-10, 1966.
- REIS, E.M.; CASA, R.T. **Manual de Identificação e Controle de Doenças de Milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 77p.
- RITCHIE, S.W.; BENSON, G.O.; LUPKES, S. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University Cooperative Extension Service, 1992. 30p. (Special report, 48)
- ROBINSON, R.A. **Return to Resistance**: Breeding crops to reduce pesticide dependence. Davis: Agaccess, 1996. 480p.
- RUSSEL, G.E. **Plant Breeding for Pest and Disease Resistance**. London: Butterworths, 1981. 485p.
- SAWAZAKI, E. et al. Reação de cultivares de milho à Mancha de *Phaeosphaeria* no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, p.585-589, 1997.
- SENIOR, L. Polymorphism rate and utility of ssr using agarose gel. In: GENETICS CONFERENCE, 39., 1997, Clearwater. **Abstracts...** Disponível em: <<http://www.maizegdb.org/cgi-bin/displayrefrecord.cgi?id=133961>>. Acesso em 13 ago. 2004.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p.1051-1056, 1977.
- SHOEMAKER, R.A.; BABCOCK, C.E. *Phaeosphaeria*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, n. 5, p.1500-1599, 1989.

- SILVA, H.P. **Genética da resistência a *Phaeosphaeria maydis* em milho**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2002. 105f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- SILVA, S.D.A. **Estudos genéticos em milho sobre o caráter tolerância ao encharcamento do solo**. 2003. 80f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2003.
- SILVA, H.P.; MORO, J.R. Diallel analysis of maize resistance to *Phaeosphaeria maydis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.1, p.36-42, 2004.
- SILVA, D.B. et al. **Recursos Genéticos: Caracterização e Regeneração de Genótipos de Milho Indígena**. Disponível em: <<http://www.giacometti.org.br/htm>>. Acesso em 27 jan. 2005.
- SOUZA, J.C.; DUARTE, J.M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.26, p.325-331, 2002.
- SOUZA, P.P. et al. Efeito de híbridos e fungicidas na evolução de doenças foliares em Irai de Minas - MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, suplemento, p.112, 2004. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 37., 2004, Gramado, RS.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Reviews of Genetic**, Palo Alto, v.27, p.205-233, 1993.
- TANSKLEY, S.D. et al. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biothechnology Advances**, New York, v.7, p.257-264, 1989.
- THODAY, J.M. Location of Polygenes. **Nature**, London, v.191, p.368-370, 1961.
- ULLSTRUP, A.J. Corn Diseases. In: SPRAGE, G.F. **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1977. p.391-500.
- VALE, F.X.R.; PARLEVLIET, J.E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n. 3, p.577-589. 2001.
- VAN DER PLANK, J.E. **Disease Resistance in Plants**. New York: Academic Press, 1968. 206p.
- VUYLSTEKE, M. et al. AFLP: two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L: analysis of distribution of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Belfast, v.99, p.921-935, 1999.
- WEBSTER, J. **Introduction to Fungi**. London: Cambridge University Press, 1980. 669p.
- WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. 3. ed. St. Paul: APS Press, 2000. 78p.
- ZAITLIN, D.; DEMARS, S.; GUPTA, M. Linkage of a second gene for NCLB resistance to molecular markers in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v.66, p.69-70, 1992.
- ZAITLIN, D.; DEMARS, S.; GUPTA, M. Linkage of *rhm*, a recessive gene for resistance to southern corn leaf blight, to RFLP marker loci in maize (*Zea mays*) seedings. **Genome**, Ottawa, v.36, p.555-564, 1993.