PODRIDÃO DE RAÍZES DE MILHO CAUSADA POR
ISOLADOS DO COMPLEXO *Dythium graminicolum* -
Dythium arrhenomanes SENSU WATANABE, 1974

NILTON LUIZ DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. ERIC BALMER

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fev. 1985

A

memória de minha mãe, IGNÊS MARQUES
DE SOUZA, no 33º aniversário de seu
falecimento;

A

meu pai, FRANCISCO TEODORO DE
SOUZA, agricultor que ama a
terra, sabe lavrá-la e dela
colhe bons frutos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos

- Ao Professor Dr. Eric Balmer, pela orientação e amizade.
- Ao Professor Dr. Adauto Ivo Milanez, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela valiosa orientação na identificação dos isolados de *Pythium*.
- Aos Professores Dr. Carlos Roberto Padovani e MS Luiz de Souza do Departamento de Bioestatística do IBBMA-UNESP, Botucatu, pela eficiente colaboração no desenvolvimento das análises dos resultados.
- AO Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - USP, na pessoa do Professor Dr. João Rubens Zinsly, pelo fornecimento das sementes usadas nos experimentos.
- Ao Professor MS José Renato de Godoy do Departamento de Defesa Fitossanitária - FCA-UNESP, pela colaboração na versão do resumo para o inglês.
- À Professora MS Marli Teixeira de Almeida Minhoni do Departamento de Defesa Fitossanitária - FCA-UNESP, pelas sugestões na revisão dos originais.
- Aos Colegas do Departamento de Defesa Fitossanitária - FCA - UNESP, Botucatu, em especial aos Professores Dr. Chukichi Kurozawa e Dr. Augusto Ferreira da Eira, pelas sugestões e estímulo.
- Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação e de forma especial à Eng.^a Agr.^a Dr.^a Rosa Maria Valdebenito Sanhueza, pelo estímulo e amizade.

Aos Funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária FCA-UNESP e do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP pela colaboração nos trabalhos de escritório, laboratório e casa-de-vegetação.

todas as pessoas que, de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ocorrência, sintomatologia e importância da doença	3
2.2. Caracterização taxonômica do patógeno	4
2.3. Isolamento e preservação do patógeno	7
2.4. Fatores bióticos e abióticos na predisposição ao patógeno	9
2.5. Metodologia utilizada na pesquisa com patóge- nos do Gênero <i>Pythium</i>	11
2.5.1. Inóculo e inoculação	11
2.5.2. Substrato para manutenção das plantas e condições ambiente	12
2.5.3. Desinfecção de sementes	14
2.5.4. Avaliação da doença	18
2.6. Resistência do hospedeiro ao patógeno	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Estudos taxonômicos do patógeno	20
3.2. Desinfecção de sementes de milho	21
3.2.1. Determinação da presença do patógeno nas sementes	21
3.2.2. Redução da infestação de <i>Fusarium moni-</i> <i>líforme</i> nas sementes mediante tratamen- to químico	22
3.3. Cultivares de milho e isolados do patógeno - utilizados	25

	Página
3.4. Isolamento e preservação do patógeno	26
3.5. Metodologia geral empregada nos testes de patogenicidade	28
3.5.1. Generalidades	28
3.5.2. Substrato utilizado para o desenvolvimento do patógeno e obtenção do inóculo	28
3.5.3. Inoculação	29
3.5.4. Tratamento das sementes	30
3.6. Parâmetros utilizados na avaliação dos efeitos de <i>Pythium</i> no desenvolvimento das plantas	30
3.7. Delineamento experimental e tratamento estatístico	35
3.8. Cálculo dos dados da porcentagem de redução .	35
3.9. Efeito do potencial de inóculo no substrato, demonstrado no desenvolvimento das plantas ..	36
3.10 Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, nos danos causados pelo patógeno.	37
3.11 Efeito da variabilidade de isolados do patógeno	38
3.12 Reação de cultivares de milho a isolados de <i>Pythium</i>	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Caracterização taxonômica do patógeno	40
4.2. Desinfecção de sementes de milho	45
4.3. Efeito do potencial de inóculo no substrato, demonstrado no desenvolvimento das plantas ..	46
4.3.1. Parâmetros utilizados para avaliação do efeito do potencial de inóculo	47
4.3.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados	54

4.3.3. Efeito do potencial de inóculo na porcentagem de redução observada para diferentes parâmetros	58
4.4. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, nos danos causados pelo patógeno.	60
4.4.1. Parâmetros utilizados para avaliação - do efeito da época de coleta das plantas	60
4.4.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados	68
4.4.3. Efeito da época de coleta das plantas na porcentagem de redução, observada através de diferentes parâmetros	71
4.5. Efeito da variabilidade de isolados do patógeno no desenvolvimento das plantas	73
4.5.1. Parâmetros utilizados na avaliação da variabilidade do patógeno	73
4.5.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados	79
4.5.3. Efeito da variabilidade de isolados do patógeno na porcentagem de redução ...	84
4.6. Reação de cultivares de milho a isolados de <i>Pythium</i>	86
4.6.1. Parâmetros utilizados para a avaliação da reação de cultivares de milho a isolados de <i>Pythium</i>	86
4.6.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados	92
4.6.3. Efeito da reação de cultivares de milho a isolados de <i>Pythium</i> na porcentagem de redução	97

	Página
5. DISCUSSÃO	100
5.1. Caracterização taxonômica do patógeno	100
5.2. Desinfecção de sementes de milho	102
5.3. Metodologia geral empregada nos testes de patogenicidade	104
5.4. Efeito do potencial de inóculo no substrato, demonstrado no desenvolvimento das plantas ..	109
5.5. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, nos danos causados pelo patógeno.	110
5.6. Efeito da variabilidade de isolados do patógeno no desenvolvimento das plantas	111
5.7. Reação de cultivares de milho a isolados de <i>Pythium</i>	112
6. CONCLUSÕES	114
LITERATURA CITADA	116
APÊNDICE	127

PODRIDÃO DE RAÍZES DE MILHO CAUSADA POR ISOLADOS DO COMPLEXO
Pythium graminicolum - *Pythium arrhenomanes*
sensu WATANABE, 1974

Nilton Luiz de Souza

Orientador: Prof. Dr. Eric Balmer

RESUMO

Foi estudado, em condições de casa-de-vegetação, o efeito da infestação de solo com isolados de *Pythium* na emergência e ocorrência de podridão em raízes de plântulas de milho.

Os dez isolados estudados, obtidos em lesões de raízes de plantas de milho, foram classificados taxonomicamente como pertencentes ao complexo *Pythium graminicolum* - *Pythium arrhenomanes* sensu WATANABE, 1974.

As sementes utilizadas nos experimentos foram previamente submetidas a um tratamento durante 4 horas, em suspensão aquosa de benomyl, à concentração de 500mg/l, visando-se reduzir a infestação por *Fusarium moniliforme*, não tendo-se verificado o desenvolvimento do patógeno quando as sementes foram plaqueadas em meio de batata-cenoura-agar.

O inóculo do complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes*, constituído pelo desenvolvimento do fungo em substrato de areia-quirera de milho durante 15 dias, a 25°C no escuro, misturado com areia autoclavada na proporção de 1/100 (v/v), propiciou o estudo de podridão de raízes em plântulas de milho sob condições de casa-de-vegetação.

Os diferentes níveis de potencial de inóculo influenciaram diferentemente no desenvolvimento das plantas.

O estudo sobre a época de coleta das plantas,

após a inoculação, para a avaliação da doença nas raízes, revelou que a taxa de desenvolvimento das plantas inoculadas - foi menor que aquela apresentada pelas plantas das respectivas testemunhas.

Foram detectadas diferenças significativas na patogenicidade entre os isolados do complexo quando inoculados nos cultivares milho Doce de Cuba e HMD-7974.

Quando oito cultivares de milho foram testados, constatou-se que o Pirapoca mostrou a maior suscetibilidade, e os cultivares Composto B e Composto Amplo mostraram maior resistência aos isolados D e 4P do patógeno.

Dentre os métodos estudados para avaliar podridão de raízes de milho causada por isolados do complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes*, o parâmetro do peso fresco da parte aérea revelou-se como sendo o mais adaptado para o estudo da reação dos cultivares ao patógeno para experimentos desenvolvidos com plântulas em condições de casa-de-vegetação.

CORN ROOT ROT CAUSED BY ISOLATES OF THE COMPLEX *Pythium graminicolum* - *Pythium arrhenomanes* sensu WATANABE, 1974

Nilton Luiz de Souza

Adviser: Prof. Dr. Eric Balmer

SUMMARY

The effect of soil infestation with *Pythium* on the emergence and occurrence of root rot on corn seedlings - was studied under greenhouse conditions.

The *Pythium* isolates utilized characterized as belonging to the complex *Pythium graminicolum* - *Pythium arrhenomanes* sensu WATANABE, 1974.

Seeds utilized in the experiments were previously soaked during 4 hours in a water suspension of benomyl - (500 mg/l) to reduce infestation by *Fusarium moniliforme*. This fungus was not detected after treatment, by plating seeds on potato-carrot-agar.

To obtain the inoculum the fungus was grown in the dark, during 15 days, at 25°C, on a coarse corn meal sand mixture. At inoculation time, the culture grown on the coarse corn meal sand mixture was mixed with autoclaved sand at the proportions of 1:100 (v/v).

Different inoculum concentrations influenced differently the rate of plant development, and at several evaluation dates, after inoculation, it was demonstrated that - the rate of plant development was slower in the inoculated - plants than in the check plants.

Significant differences in pathogenicity of the isolates were detected on populations of Cuba sweet corn

and HMD-7974.

After the inoculation of the seedlings of eight corn cultivars with the isolates D and 4P, of the fungus complex, cultivar Pirapoca proved to be the most susceptible and Composto B and Composto Amplo the most resistant ones.

Among several methods utilized to evaluate corn root rot, the fresh weight of the aerial part was the most valuable one to study the reaction of cultivars to the *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes* complex under greenhouse conditions.

1. INTRODUÇÃO

Face à importância da cultura do milho e às perdas causadas pela ocorrência de doenças nessa cultura, dedica-se especial atenção ao seu controle, principalmente no tocante à obtenção de variedades resistentes.

Dentre as doenças que provocam danos à cultura do milho, sobressaem aquelas causadas por fungos que podem atacar diferentes órgãos da planta nos mais variados estágios do ciclo (SHURTLEFF, 1980). No sistema radicular, as doenças são devidas aos patógenos do solo, principalmente fungos, sendo que, dentre estes, destacam-se diferentes espécies do gênero *Pythium* que provocam, entre outros, danos primários de podridão de sementes, morte de plântulas em pré e pós-emergência e podridão de raízes (HOOKER, 1953a). Neste particular, fungos do complexo *Pythium graminicolum* são frequentemente associados à lesões de raízes em plantas de milho cultivadas em solos com baixa capacidade de drenagem.

No Brasil existem poucas informações relacionadas com podridões de raízes de milho causadas por espécies do gênero *Pythium*. CARVALHO (1962) testou em milho, em condições de laboratório, isolados classificados como *Pythium arrhenomanes* obtidos de lesões de raízes de cana-de-açúcar. O que parece ser o primeiro relato da ocorrência de *Pythium graminicolum* no Brasil foi feito em 1962, sendo isolado de raízes apo-

drecidas de feijoeiro, em Mombuca, São Paulo (CARVALHO, 1965).

As doenças de raízes em milho no Brasil têm sido relegadas a um segundo plano quando comparadas com o volume de trabalhos dedicados às doenças que ocorrem na parte aérea. Isso se deve às dificuldades na avaliação dos danos causados pelos patógenos do solo e à complexidade do ambiente no qual se desenvolvem as relações patógeno-hospedeiro.

Sendo o uso de variedades resistentes um dos métodos de maior eficiência em outros países, no controle de doenças radiculares em milho, desperta interesse no que se refere a determinação de fontes de resistência do hospedeiro a fungos do gênero *Pythium* em nossas condições.

Considerando a escassez de informações sobre a doença e considerando que isolados de *Pythium* foram obtidos - de raízes de milho em solos encharcados das regiões de Piracicaba e Botucatu, no Estado de São Paulo pretende-se, com o presente trabalho, atingir os seguintes objetivos:

- caracterizar os isolados de *Pythium* envolvidos em podridões de raízes em milho;
- estudar relação patógeno-hospedeiro para experimentos realizados em condições de casa-de-vegetação;
- estudar a variabilidade de isolados de *Pythium*;
- estudar as reações de cultivares de milho ao patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Visando limitar a abrangência do assunto em função dos objetivos propostos, e considerando os inúmeros relatos sobre o gênero *Pythium*, a presente revisão bibliográfica tratará o tema de acordo com os subtítulos que se desenvolvem a seguir:

2.1. Ocorrência, sintomatologia e importância da doença

Os mais importantes microrganismos causadores de podridão de sementes, murcha e morte de plântula e podridão de raízes em milho são referidos por SHURTLEFF (1980) como sendo espécies do gênero *Pythium* incluindo *P. irregulare* Buiss., *P. debaryanum* Hesse, *P. graminicola* Subram., *P. splendens* Braun, *P. vexans* dBy., *P. rostratum* Butl., *P. paroecandrum* Drechs. e *P. ultimum* Trown.

Com referência específica ao *P. graminicola*, FREZZI (1956) e BRUHEL (1976) citam que este fungo ocorre em vários países de todos os continentes, parasitando dezenas de hospedeiros, principalmente as gramíneas. Ainda, segundo HO e MELHUS (1938), HAMPTON (1955), KOIKE (1971) e PLAATS-NITERINK (1981), as espécies mais estudadas são as dos gêneros *Zea*, *Avena*, *Triticum*, *Sorghum*, *Saccharum* e *Oryza*.

P. graminicola foi originalmente descrito em

1928 por Subramaniam, causando podridão de raízes em plantas de trigo na Índia (PLAATS-NITERINK, 1981). Mesmo antes da descrição do fungo, JOHANN *et al.* (1926) citaram a ocorrência de espécies não identificadas do gênero *Pythium* associadas à podridão de raízes de milho dentado em culturas comerciais. Fazendo inoculações em condições de campo, os autores detectaram médias de 30% de redução no "stand" e de até 65% no rendimento de grãos.

Vários pesquisadores empenharam-se em estudar os sintomas e os danos causados por *P. graminicola* em milho e em diversas outras culturas. De maneira geral, o fungo pode causar: "damping-off" de pré-emergência (HOOKER, 1953a; HOOKER, 1956a e PRATT e JANKE, 1980); "damping-off" de pós-emergência (ANDREWS, 1943; HOOKER, 1953b e PRATT e JANKE, 1980); podridão da coroa (ERWIN e CAMERON, 1957); numerosas lesões marrom amareladas em raízes primárias e secundárias (RAO *et al.*, 1978); podridão de raízes (OSWALD, 1950; HOOKER, 1953a; HOOKER, 1953b; HOOKER, 1956a; ERWIN e CAMERON, 1957 e SHURTLIFF, 1980); rompimento de raízes (BUCCHOLTZ, 1942); encharcamento de raízes (ERWIN e CAMERON, 1957); podridão de colmo (PRATT e JANKE, 1980); murcha de plantas (ERWIN e CAMERON, 1957) e morte de plantas (ERWIN e CAMERON, 1957).

No Brasil, CARVALHO (1965) fez o primeiro relato da ocorrência de *P. graminicola* em raízes apodrecidas de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. No trabalho, o autor cita a ocorrência de 12 espécies de *Pythium* de interesse para a oleicultura. A abordagem da referida publicação visou a determinação taxonômica das espécies isoladas.

2.2. Caracterização taxonômica do patógeno

Os pesquisadores que se propuseram a estudar a sistemática do gênero *Pythium* basearam-se, fundamentalmente, nos seguintes aspectos morfo-fisiológicos do fungo: dimensão e formato de esporângios; dimensão e presença ou ausência de

ornamentações nos oogônios; dimensão dos oosporos e sua relação com a dimensão do oogônio; número, origem, formato e inserção dos anterídios, crescimento linear do micélio a várias temperaturas, normalmente em meio de farinha de milho-agar (FMA), além de características do hábito de crescimento das colônias (roseta, crisântemo, radial, liso) desenvolvidas em determinados meios de cultura (MIDDLETON, 1943; BIESBROCK e HENDRIX, 1967; VAARTAJA, 1967; WATANABE, 1974 e PLAATS-NITERINK, 1981).

MIDDLETON (1943) publicou uma extensa monografia sobre o gênero *Pythium*, na qual ressaltava a importância dos caracteres morfológicos na diferenciação das espécies. Apesar do autor, em muitos casos, ter trabalhado com apenas um isolado, impossibilitando-o de detectar muitas variações entre e dentro das espécies, seu trabalho é considerado uma das principais referências para o gênero. Segundo HENDRIX e CAMPBELL (1974), o trabalho de FREZZI (1956), na Argentina, quando o autor estudou a taxonomia de 17 espécies do gênero *Pythium*, seguiu basicamente os conceitos de MIDDLETON (1943).

A padronização e o cuidado no procedimento de estudos comparativos foram discutidos por VAARTAJA (1967), quando trabalhou com 19 isolados *P. irregulare* e por BIESBROCK e HENDRIX (1967) estudando a taxonomia de 25 isolados do mesmo fungo. Em ambos os casos foi demonstrado que diferenças nos caracteres morfológicos de oogônios, oosporos, anterídios e esporângios podem ocorrer em função de diferenças nos regimes de temperatura, luminosidade e de características dos substratos para crescimento. Observações análogas foram feitas por HENDRIX e CAMPBELL (1974) que encontraram variações estatisticamente significativas em diversos caracteres taxonômicos, em função do período de preservação em condições de laboratório para cinco espécies de *Pythium* estudadas.

Segundo MILANEZ (1984), a elevada plasticidade dos caracteres morfológicos, normalmente utilizados para taxonomia do gênero *Pythium*, tem acarretado sérias dificuldades à

identificação das espécies.

A exemplo das chaves dicotômicas elaboradas por MIDDLETON (1943) e WATERHOUSE (1967), recentemente outros pesquisadores como ROBERTSON (1980) e PLAATS-NITERINK (1981), têm seguido a mesma linha, ou seja, classificando separadamente cada uma das espécies do gênero. Por outro lado, HENDRIX e CAMPBELL (1974), HENDRIX e PAPA (1974), WATANABE (1974) e MILANEZ (1984) sugerem o estabelecimento de determinados agrupamentos de espécies dentro de complexos que possuam características taxonômicas semelhantes, mantendo individualizadas, entretanto, aquelas espécies que se apresentam morfológicamente inconfundíveis.

A distinção entre *P. graminicolum* e *P. arrhenomanes* é bastante difícil; DRECHSLER (1936) teceu comparações visando dirimir dúvidas sobre a taxonomia entre estas espécies. O autor citou aspectos morfológicos, com relação ao apărato anteridial, a fim de diferenciar as duas espécies. Justamente para facilitar a classificação é que HENDRIX e PAPA (1974) sugeriram, entre outras, a formação do complexo *P. graminicola*, denominação sob a qual estariam outras 14 espécies do gênero, além do próprio *P. graminicola*. Paralelamente, WATANABE (1974) trabalhou com isolados de várias espécies de *Pythium* obtidos de lesões de raízes de cana-de-açúcar e que, segundo este pesquisador, *P. graminicolum* e *P. arrhenomanes* possuem mais ou menos idênticos aspectos morfológicos. Pelo fato de alguns isolados apresentarem características comuns em relação às citadas por DRECHSLER (1936), para diferenciar as duas espécies, os isolados foram, por aquele, identificados como complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes*.

Segundo MIDDLETON (1943), Subramaniam quando descreveu o fungo em 1928, decidiu tornar o indeclinável nome "graminicola" (utilizado por Ho, Meredith e Melhus a partir de 1941) em um adjetivo "graminicum", combinando, assim, com o sufixo do nome do gênero. Além de DRECHSLER (1936) e de MIDDLETON (1943), mais recentemente, WATANABE (1974) também ado-

tou a nomenclatura utilizada por Subramaniam.

2.3. Isolamento e preservação do patógeno

Muitas técnicas tem sido desenvolvidas visando o isolamento de *Pythium* tanto do solo como a partir de raízes necrosadas de plantas. RAO *et al.* (1978) ressaltam que os procedimentos rotineiros de isolamento tal como a esterilização das superfícies dos fragmentos das raízes e plaqueamento em meio sólido de batata-dextrose-agar (BDA), não são convenientes para isolar *P. graminicola* e que este fungo não é facilmente obtido a partir de lesões velhas ou de amostras de solo.

Um dos métodos bastante eficientes para isolamento de *Pythium* livre de bactérias foi descrito por BROWN (1924). O processo consiste em dividir equitativamente, com um corte reto, o meio de agar-água contido numa placa-de-petri. Em uma delas coloca-se o micélio do fungo contaminado e, a seguir, inverte-se a outra metade sobre a primeira. Em poucos dias as hifas do fungo atravessam a camada de agar e podem então ser coletadas na parte superior com auxílio de uma agulha flambada. Tal método, com modificações foi empregado por MACHACEK (1934) e por SLEETH (1945) sendo que, este último, recomendou o uso do referido processo na obtenção de culturas de *Pythium* livres de contaminantes diretamente a partir de raízes, dispensando a esterilização superficial dos tecidos.

CARVALHO (1965) utilizou, com modificações, o método descrito por DRECHSLER (1929), para isolamento de 12 espécies do gênero *Pythium*. A técnica implica em se colocar as raízes em placas-de-petri contendo água destilada juntamente com sementes de cânhamo autoclavadas como iscas. Após o crescimento do fungo na semente, procede-se à transferência para meio de cultura de maltose-peptona-agar, para purificação.

A inclusão de fungicidas e antibióticos na composição dos meios de cultura contribuem para tornar o substrato

to mais seletivo para o microrganismo que se deseja isolar. - HAMPTON e BUCHHOLTZ (1959) isolaram *P. graminicola* de raízes de plantas de milho oriundas de cultura comercial, sendo as raízes lavadas e fragmentos destas plaqueados em meio de agar-água contendo a substância cumarina, que tem o efeito de estimular a esporulação de *P. graminicola* ao mesmo tempo em que limita o aparecimento de contaminantes. Mais recentemente, muitos antibióticos estão sendo empregados com sucesso visando o isolamento de *Pythium* tanto de solo como de raízes. KAGEYAMA e UI (1980) utilizaram a Agrimicina em substituição à vancomicina, e PRATT e JANKE (1980) incluíram a primaricina - em meio de cultura de farinha de milho-agar, objetivando o isolamento de *P. graminicola*.

Com relação à manutenção dos isolados de *Pythium*, os processos empregados visam, principalmente, que o fungo mantenha suas características morfológicas e de patogenicidade, além da minimização do custo. DRECHSLER (1949) testou a longevidade de isolados de 17 espécies do gênero *Pythium* e constatou que culturas desenvolvidas em meio de FMA, por um período de até sete anos, mantinham oosporos viáveis - após a adição de água destilada.

A desidratação sobre sílica gel ou emprego de óleo mineral foi utilizado com sucesso por Elliot em 1955, citado por ROBERTSON (1980). FIGUEIREDO (1967), utilizando o método de Castelani, preservou, por um período entre 14 e 18 meses, em vidros com água destilada estéril, diversos fungos fitopatogênicos, entre eles o *Pythium arrhenomanes*. O autor ressaltou a manutenção das características de patogenicidade dos isolados.

Por outro lado, PRATT e JANKE (1980) efetuaram a manutenção de culturas de *P. graminicola* em tubos com meio de FMA inclinado sendo que a cada 6 meses faziam transferências para novos tubos. HENDRIX e CAMPBELL (1974), entretanto, verificaram a alteração de caracteres morfológicos em diversos isolados de 5 espécies de *Pythium* quando mantidos a 21°C

por 30 meses em meio de FMA.

2.4. Fatores bióticos e abióticos na predisposição ao patógeno

Na cultura do milho e com relação ao gênero *Pythium*, as condições de temperatura e umidade, em situações de campo, são os fatores mais abordados face a sua influência altamente significativa, quer predispondo a planta ao ataque do patógeno, quer diminuindo o efeito de microrganismos antagônicos.

A ocorrência de baixas temperaturas (entre 10 e 16°C), aliada à alta umidade do solo, condicionam maior incidência de doenças causadas por *Pythium* (DICKSON, 1923); JOHANN *et al.*, 1926; HOOKER, 1953a; VAN DER ZUET, 1958 e BRUEHL, 1983).

Tratando-se especificamente de *P. graminicola* na cultura de milho, HAMPTON (1957), HAMPTON e BUCHHOLTZ (1959) e RAO *et al.* (1978) observaram uma correlação positiva entre a ocorrência de *P. graminicola* e alta incidência de chuvas e uma correlação negativa com a elevação da temperatura. HAMPTON e BUCHHOLTZ (1959) chegaram à concluir que *P. graminicola* não foi detectado nas amostras em condições de temperaturas elevadas associadas à baixa precipitação pluviométrica. RAO *et al.* (1978) associaram à baixa capacidade de drenagem dos solos aos elevados níveis de incidência de podridão de raízes em milho, ocasionadas por *P. graminicola*.

O mesmo comportamento atribuído a *P. graminicola*, em milho, com relação à temperatura e umidade, mostrou-se válido quando este fungo foi estudado na cultura de cevada, conforme OSWALD (1950) e SUMMERS e BUCHHOLTZ (1958).

Com referência à influência do tipo de solo, pH e fertilidade na incidência de *P. graminicola*, HO e MELHUS (1938) determinaram que o fungo teve seu desenvolvimento menos favorecido em solos alcalinos do que em solos ácidos. Cer

tas espécies de *Pythium* tem sua incidência associada ao tipo de solo, entretanto, segundo HOPPE e MIDDLETON (1950), esta associação é extremamente influenciada pela sequência de hospedeiros que ocupam a área. Por outro lado, HOOKER (1953a) - ressalta que essa diferença de patogenicidade em diferentes solos depende da presença e da quantidade do patógeno na área. Segundo este mesmo autor, existe um pequeno efeito da fertilidade do solo com relação à incidência de *P. graminicola* em plântulas de milho; por outro lado, em plantas adultas existe maior frequência de danos às raízes em solos com baixa fertilidade, concluindo, então, que a alta fertilidade tem a função de compensar os danos causados pelo fungo.

A distribuição vertical da população de *P. graminicola* no solo foi estudada por KNAPHUS e BUCHHOLTZ (1958). Esses pesquisadores demonstraram que o fungo ocorre, principalmente, nos primeiros 8 a 15cm de profundidade, sendo raramente detectado à profundidade entre 70 e 80cm.

A sobrevivência de *P. graminicola* no solo, segundo BRUEHL (1976), ocorre fundamentalmente no estágio sexuado, visto tratar-se de um fungo homotático.

A penetração e colonização das raízes de plantas de milho por fungos do gênero *Pythium* é reportada por JOHANN *et al.* (1926) como uma infecção que se inicia frequentemente pelas pontas das raízes e proximidades, produzindo uma podridão mole, envolvendo inicialmente o córtex e, em seguida, os elementos vasculares. Tal descrição foi ratificada, para o caso de *P. graminicola* em raízes de milho, por HO e MELHUS (1938) e HAMPTON e BUCHHOLTZ (1959), observando ainda que a colonização ocorre inter e intracelularmente, formando grande quantidade de estruturas sexuadas nos tecidos do parênquima e nos feixes vasculares de raízes jovens infectadas. Mais recentemente, McKEEN (1977) ressaltou o fato de que a parede celular do hospedeiro não se constituía numa barreira importante contra a penetração de *P. graminicola*. O referido trabalho, realizado com auxílio de microscopia eletrônica, permitiu con

cluir que a penetração se dá por processos químicos e mecânicos, sendo que, duas horas após a inoculação, já tem início a penetração.

Referências sobre a baixa capacidade saprofítica competitiva de *P. graminicola* foram feitas por RAO *et al.* (1978), argumentando que este fungo ocasiona lesões nos tecidos das raízes que são, posteriormente, invadidas por outros fungos que podem deslocar o *Pythium* dificultando, inclusive, o seu isolamento.

Com relação à predisposição de raízes ao ataque de *Pythium* spp, HALPIN e HANSON (1958) ressaltam que "seedlings", crescendo em ambiente favorável, rapidamente tornam-se resistentes ao fungo, o mesmo acontecendo com raízes.

Existe uma conformidade de opiniões entre HOOKER (1953a), KNAPHUS e BUCHHOLTZ (1958) e STAUDINGER e BUCHHOLTZ (1965) no que se refere ao cultivo continuado de milho em uma área e sua correlação direta com o aumento do potencial de inóculo. Conclusão semelhante obtiveram STAUDINGER e BUCHHOLTZ (1965) com referência à cultura de sorgo, acrescentando, porém, que a cultura de soja, desenvolvida sucessivamente em uma área, produz efeito inverso, ou seja, determina uma contínua queda no potencial de inóculo de *P. graminicola*.

2.5. Metodologia utilizada na pesquisa com patógenos do gênero *Pythium*

A fim de comparar os estudos propostos e certificar-se da exequibilidade dos mesmos, são reportadas, a seguir, as pesquisas desenvolvidas em condições semelhantes e diretamente relacionadas com o presente trabalho.

2.5.1. Inóculo e inoculação

Vários substratos têm sido utilizados para o desenvolvimento de *Pythium* spp, visando a inoculação em vasos

nos estudos em condições de casa-de-vegetação com diversas culturas, entre elas o milho.

A incorporação do meio de BDA contendo cultura pura de *P. graminicola* ao substrato dos vasos foi empregado - por diversos pesquisadores (HOPPE, 1949; HOOKER, 1953a); HOOKER, 1956a; HOOKER, 1956b; ERWIN e CAMERON, 1957 e RAO *et al.*, 1978) em estudos de patogeniçidade em plântulas de milho. Com a mesma finalidade, o meio de cultura constituído de milheto autoclavado é citado por RAO *et al.* (1978). Para a inoculação de *Pythium* spp em soja, SCHMITTHENNER e HILTY (1962) empregaram o meio sólido de V-8, sendo que o meio de farinha de milho mais areia autoclavada foi utilizado por BIESBROK e HENDRIX (1970) para inocular *P. vexans* e *P. irregulare* em pêssego e também por PRATT e JANKE (1980) em inoculações de *P. graminicola* em sorgo.

Na semeadura, a localização do inóculo em relação à posição das sementes de gramíneas é de extrema importância (BUCHHOLTZ, 1942 e FORBES *et al.*, 1981), principalmente - em se tratando de *P. graminicola*, que afeta o hospedeiro exatamente nas fases de germinação e de plântula, além de causar podridão de raízes em plantas jovens (BUCHHOLTZ, 1942; ERWIN e CAMERON, 1957; SCHMITTHENNER e HILTY 1962; RAO *et al.*, 1978; PRATT e JANKE, 1980 e FORBES *et al.*, 1981).

A porcentagem de plantas emergentes, normalmente empregada na triagem da resistência, segundo FORBES *et al.* (1981), é determinada mais pelo tempo de exposição e pela localização do inóculo (de 1 a 4cm), em relação ao hospedeiro, que propriamente pela resistência de seus tecidos à infecção.

ERWIN e CAMERON (1957) e PRATT e JANKE (1980), trabalhando, respectivamente, com milho e sorgo, mencionaram que existe uma relação entre o aumento do potencial de inóculo e a ocorrência de doença.

2.5.2. Substrato para manutenção das plantas e condições ambiente

A utilização de solo ou areia em vasos para manutenção de plantas, tem-se constituído no substrato mais frequentemente empregado visando estudos da patogenicidade de espécies do gênero *Pythium* em gramíneas. O emprego de solo autoclavado para ensaios com *P. graminicola* é reportado por BUCHHOLTZ (1942); ERWIN e CAMERON (1957) e RAO *et al.* (1978), sendo que outros substratos também foram utilizados, tais como: areia ou areia mais torta autoclavadas (HOOKER, 1953b), areia autoclavada (HALPIN e HANSON, 1958) e solo autoclavado e não autoclavado (PRATT e JANKE, 1980). Segundo HOOKER (1953b), a inoculação de *Pythium* spp em areia autoclavada propiciou maior incidência da doença em ensaios com milho que quando inoculado em solo autoclavado.

A influência dos fatores temperatura e umidade têm sido motivo de muitos trabalhos, uma vez que atuam diretamente, em condições de campo, na predisposição do hospedeiro, na população do patógeno e na ação de muitas espécies do gênero *Pythium*.

A influência de baixas temperaturas como determinante de um efeito mais drástico em milho, foi investigado por HOPPE (1949), inoculando *Pythium* sp e por HOOKER (1953a), utilizando *P. graminicola*. KENDRICK (1953) ressalta, após seus estudos com espécies do gênero *Pythium* em milho, que cada uma delas possui um comportamento fitopatogênico com relação a uma dada temperatura. Com o objetivo de avaliar a patogenicidade de *P. graminicola* sobre 25 linhagens de milho, HOOKER (1956b) manteve a temperatura ambiente em torno de 24°C. Essa temperatura foi também adotada por PRATT e JANKE (1980) quando inocularam *P. graminicola* em sorgo, visando estudar a ocorrência de "damping-off". O estabelecimento de uma correlação entre as temperaturas do ambiente e do interior do solo nos vasos foi determinada por RANDS e DOPP (1934) quando trabalharam com *P. arrhenomanes* em cana-de-açúcar.

A manutenção da umidade do solo nos vasos em torno de 60% da capacidade de campo foi um critério utilizado

por HOOKER (1953b e 1956a) quando trabalhou com *P. graminicola* em milho. Entretanto, PRATT e JANKE (1980), trabalhando com mesmo fungo, proviam periodicamente a saturação do solo à capacidade de campo.

2.5.3. Desinfecção de sementes

O uso de sementes uniformes e provenientes de mesma fonte é fundamental, principalmente quando se objetiva o estudo de podridão de sementes e morte de plântulas (HANSING, 1978).

Dentre os fungos patogênicos veiculados pelas sementes de milho, *Fusarium moniliiforme* Sheldon é reportado - como sendo o mais comumente isolado (MANNS e ADAMS, 1923; MELCHERS, 1956; IBRAHIM e FARAG, 1965; HOSNEY *et al.* e MOHAMED *et al.*, 1967; WARMKE e SCHENK, 1971; BEDENDO, 1978; KING e SCOTT, 1981 e KULIK e SCHOEN, 1982).

O empenho dos pesquisadores na tentativa de determinar a real importância de *F. moniliiforme*, veiculado pelas sementes de milho, tem sido uma constante. MANNS e ADAMS (1923), estudando os fungos associados com as sementes dessa cultura, destacaram *F. moniliiforme* que foi considerado como inibidor da germinação. Por outro lado, MELCHERS e JOHNSTON (1924) analisaram sementes de dois cultivares comerciais de milho durante três anos sucessivos, visando determinar a incidência de *F. moniliiforme*, sendo as médias observadas para sementes infectadas sempre superiores a 90%. Estes autores também relataram que a presença do fungo não implicava na diminuição da porcentagem de germinação.

A constatação de que *F. moniliiforme* induzia podridão de raízes em plantas de milho foi feita por FOLEY (1962), que colocou as sementes em solução nutritiva para o desenvolvimento das plântulas. O referido pesquisador conseguiu, no transcorrer do ensaio, isolar o patógeno a partir do

epicôtilo de plantas jovens. Posteriormente, MOHAMED *et al.* - (1968) e FUTRELL e KILGORE (1969) atribuíram a redução no - "stand" e no crescimento de raízes em plântulas de milho à ação de toxinas produzidas por *F. moniliforme*.

Com referência à contaminação das sementes de milho por *F. moniliforme*, SALAMA e MISHIRICKY (1973) demonstraram, através de cortes longitudinais, que o micélio do fungo localiza-se em diversas partes das sementes. Ressaltaram - também que durante a germinação o micélio provavelmente se estende pela planta até alcançar a espiga e os grãos recém-for-
mados.

No Brasil, TANAKA e BALMER (1980) realizaram um levantamento da microflora do solo associada ao tombamento de plântulas de milho. Concluíram que, em condições de temperatura subótimas para a germinação das sementes, a ocorrência de danos causados pelo patógeno tornou-se mais severa e que *F. moniliforme* foi o principal fungo envolvido. EL-MELEIG *et al.* (1981) sugerem que o fungo ocorre, primariamente, nas aberturas naturais e ferimentos do tegumento.

Ensaaios para determinar a importância relativa de *F. moniliforme* em híbridos de milho doce, veiculado pela semente na infecção de plântulas, foram conduzidos por ANDEREGG e GUTHRIE (1981), que encontraram uma correlação positiva, altamente significativa entre a porcentagem de sementes - contaminadas com o fungo e a porcentagem de plantas infectadas em condições de casa-de-vegetação.

Por outro lado, KING e SCOTT (1981), analisando a presença de *F. moniliforme* em sementes comerciais, linhagens e outras oriundas de diversos cruzamentos entre fontes resistentes e suscetíveis, demonstraram que ocorreram diferenças significativas entre as porcentagens de sementes infectadas dos diversos genótipos e concluíram que essas diferenças estiveram sob controle genético.

Mais recentemente, KULIK e SCHOEN (1982) determinaram a germinação, vigor e emergência de sementes de milho

doce infectadas por *F. moniliforme* em condições de campo. Os autores consideraram que conclusões sobre os efeitos do fungo devem ser válidas somente para um lote particular de sementes, não devendo ser feitas generalizações. Fizeram ainda referência às estirpes virulentas e avirulentas de *F. moniliforme*, bem como discutiram a ocorrência de patogenicidade cíclica do fungo.

A erradicação de *F. moniliforme* da semente de milho tem sido bastante estudada por diversos pesquisadores. Nos primeiros estudos, realizados com esse objetivo por MANNS e ADAMS (1923), foi observado que o insucesso da desinfecção das sementes devia-se ao fato de que o patógeno era veiculado internamente.

De outra forma, embora não mencionando fatos sobre a eliminação de fungos, REEDY e HOLBERT (1924) detectaram um aumento no "stand" quando trataram sementes de milho com o produto "chlorophol", na proporção de 1:400, por 3 horas. Os autores mencionaram que entre os fungos visados no tratamento estava o *Fusarium*.

SALAMA e MISHIRIKY (1973) tentaram erradicar *F. moniliforme* de sementes de milho utilizando o tratamento térmico, desinfecção superficial com $HgCl_2$ ou ainda a combinação de ambos, concluindo que o tratamento térmico é necessário antes de qualquer estudo sobre a murcha de plantas de milho.

Com referência ao NaOCl e sua utilização para tratamento de sementes de milho, ANDEREGG e GUTHRIE (1981) - realizaram diversos tipos de aplicações com este produto, porém, não foi possível erradicar o fungo. A mistura de 1:1 - NaOCl 1% e Etanol 95%, às temperaturas de 65 ou 75°C, respectivamente, por um tempo de 45 ou 30 segundos, foi empregada - por EL-MELEIG *et al.* (1981), os quais afirmaram que, dessa - forma o *F. moniliforme* pode ser totalmente erradicado de sementes de milho.

Os fungicidas sistêmicos, segundo HANSING -

(1967), foram empregados em tratamento de sementes a partir de 1965, visando minimizar o efeito de patógenos disseminados pelas sementes.

Em tentativas de erradicar *F. moniliiforme* de sementes de aspargos, DAMICONE *et al.* (1981) empregaram o fungicida sistêmico benomyl, veiculado em água ou acetona, em diversas concentrações e tempos de imersão, utilizando também o tratamento com hipoclorito de sódio. Concluíram os autores que a concentração de 25.000µg/l de benomyl, veiculado por acetona, erradica o fungo das sementes quando estas ficaram imersas na suspensão durante 24 horas. Segundo os autores, os tratamentos com hipoclorito não surtiram efeito positivo.

DANIELS (1983) tratou sementes de milho durante 4 horas em água destilada a 18-22°C, em seguida, essas sementes foram submetidas, também em água destilada, à temperatura de 60°C por 5 minutos. Desta forma, foi conseguida a total erradicação de *F. moniliiforme* das sementes de milho. No mesmo trabalho, o autor ainda conclui que o fungicida benomyl possui efeito fungistático para o *F. moniliiforme*, na semente de milho, argumentando que, em muitas vezes após o tratamento com o referido fungicida, o fungo pode ser isolado das plântulas.

Diversos substratos e condições foram utilizadas para determinar a possível presença de *F. moniliiforme* em sementes de milho. KING e SCOTT (1981) utilizaram placas-de-petri com meio de Czapek-agar (Difco), com 13 sementes por placa, incubando-as a 28°C durante 4 dias. Esses autores consideraram como semente infectada somente aquela onde a colônia do fungo se desenvolveu em contiguidade com a mesma.

No trabalho com sementes de aspargos, DAMICONE *et al.* (1981) recomendam uma persistente lavagem das sementes após o tratamento com benomyl, visando assim remover os resíduos do pesticida antes da incubação. Esses autores plaquearam as sementes em meio de cultura de batata-cenoura-agar (BCA) a um pH=4,0, sendo esse pH conseguido pela adição de

ácido láctico, objetivando minimizar o aparecimento de colônias bacterianas. As placas foram mantidas em estufa a 24^aC, até a germinação das sementes e desenvolvimento das colônias de *F. moniliforme*. Já DANIELS (1983), após os tratamentos realizados, acondicionou as sementes em tubos de ensaio contendo vermiculita autoclavada, incubando-os a 24^oC sob luz fluorescente durante 2 a 3 semanas, quando, então, foram avaliados - os tratamentos através do plaqueamento de tecidos de plântulas em meio de cultura.

2.5.4. Avaliação da doença

Os critérios utilizados na avaliação de danos ocasionados pela ação de *P. graminícola* em raízes de gramíneas são os mais diversos.

A operacionalidade e confiabilidade são determinantes na adoção de um método de avaliação de danos, podendo ser mencionados os seguintes parâmetros utilizados nas leituras: medida da altura da planta; peso fresco e peso seco da parte aérea; comprimento das folhas e das raízes; peso fresco e seco das raízes; índice de doença; porcentagem visual de redução das raízes; porcentagem de emergência aos 7 dias da semeadura e número de plantas mortas aos 21 dias (HASKETT e MURPHY, 1953; HOOKER, 1953a, 1953b, 1956a e 1956b; ERWIN e CAMERON, 1957; PRATT e JANKE, 1980 e FORBES *et al.*, 1981). A determinação do peso fresco de raízes foi considerada, por HASKETT e MURPHY (1953), como a mais satisfatória para avaliar os danos de *P. graminícola* em plantas de cevada. Por outro lado, PRATT e JANKE (1980) basearam-se em uma estimativa visual, comparando as raízes de plantas inoculadas com as das testemunhas em trabalho com *P. graminícola* em plantas de sorgo. Os autores observaram que este método é mais confiável e incide em menor erro que a medida de peso seco, visto que este último sofre influência de partículas de solo e de matéria orgânica que permanecem aderidas às raízes.

2.6. Resistência do hospedeiro ao patógeno

A procura de respostas de cultivares de milho a *P. graminicola* na tentativa de se encontrar fontes de resistência, tem motivado muitos trabalhos.

Diferentes níveis, desde altamente resistentes até altamente suscetíveis, têm sido detectados em diferentes tipos de milho, quando avaliados frente a *P. graminicola* em condições de casa-de-vegetação (HO e KOEPPER, 1942; HOOKER, 1956a e 1956b e ERWIN e CAMERON, 1957). Quanto à amplitude da resistência, HOOKER (1956a) ressalta que plântulas de milho resistentes ao gênero *Pythium* parecem ter uma resistência não específica, portanto, efetiva contra genótipos de diversas espécies do fungo. Ampliando essa observação, HOKKER (1956b) correlacionou resistência a vários fungos intergenéricos causadores de doenças em milho, entre eles o *P. graminicola*. O autor detectou uma correlação altamente significativa entre os efeitos de podridão de colmo, podridão de raízes e morte de plântulas ocasionados por diferentes gêneros de fungos.

A resistência de milho a *Pythium*, com relação à morte de plântulas, envolve, segundo BRUEHL (1983), características de tecidos maternos (pericarpo) e embrião, além do balanço metabólico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos, tanto em laboratório como em casa-de-vegetação, foram desenvolvidos utilizando as facilidades proporcionadas pelo Departamento de Defesa Fitossanitária - Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - "Campus" de Botucatu.

3.1. Estudos taxonômicos do patógeno

Os isolados purificados foram conservados em ampolas contendo água destilada estéril e mantidas à temperatura de 20°C.

Para observação das características culturais de formação da colônia foram utilizadas placas-de-petri contendo meio de FMA-Difco que, após a repicagem, foram incubadas no escuro a 25°C. Este mesmo meio foi usado para determinar a taxa de crescimento das colônias em temperaturas de 5 a 45°C com intervalos de 5°C. As tomadas do crescimento foram realizadas a 24 e a 48 horas após a repicagem.

A obtenção de estruturas sexuadas e assexuadas para tomada de medidas, contagens e outras observações foi feita utilizando o meio de cultura suco V-8-agar (MILLER, 1955).

Após o fungo desenvolver-se durante 48 horas

no escuro, em incubadora, a 25°C, foram retirados da região - das extremidades das hifas, com auxílio de um vazador flambado, blocos de agar com 1cm de diâmetro e transferidos para - placas autoclavadas contendo cerca de 10ml de água destilada estéril. A fim de estimular a formação das estruturas reprodu^{ti}vas, foram colocados, logo após a repicagem, 4 metades de sementes de sorgo sacarino autoclavadas que, em função de dados obtidos em testes preliminares, substituem perfeitamente as de cânhamo, rotineiramente usadas como iscas para *Pythium* spp.

As medidas para identificação foram feitas a partir de fragmentos das colônias formadas ao redor das iscas e que foram transferidos para lâminas e montadas em água. Nesse período, as colônias desenvolveram-se a temperatura ambiente, que variou de 16 a 28°C.

A classificação dos isolados de *Pythium*, realizada com a orientação do Doutor Adauto Ivo Milanez do Instituto de Botânica-S.P., baseou-se nos trabalhos de MIDDLETON (1943), WATERHOUSE (1967), HENDRIX e PAPA (1974), WATANABE (1974), ROBERTSON (1980) e PLAATS-NITERINK (1981).

3.2. Desinfecção de sementes de milho

Na condução dos testes visando erradicar o fungo *Fusarium moniliforme* das sementes de milho, foram utilizadas sementes da cultivar HMD-7974 isentas de qualquer tratamento com defensivos, obtidas junto ao Posto de Sementes de Campinas da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

3.2.1. Determinação da presença do patógeno nas sementes

Os testes para a determinação da presença do patógeno nas sementes foram executados em placas-de-petri

utilizando-se o meio de cultura de batata-cenoura-agar (BCA) acidificado com ácido lático até pH=4,0, conforme DAMICONE *et al.* (1981), com a seguinte composição:

Batata	20g
Cenoura	20g
Agar	16g
Água	1000ml

As sementes, após os tratamentos, foram plaqueadas em número de 7 por placa e incubadas no escuro a 25°C. Uma primeira observação foi feita 48 horas após o plaqueamento, quando foi constatado um incipiente desenvolvimento micelial ao redor das sementes. A avaliação final para a tomada dos dados foi feita 72 horas após o plaqueamento, constando nela da contagem do número de sementes germinadas e de sementes infectadas. Ficou estabelecido, ainda, que semente infectada seria aquela na qual se encontrasse o fungo *F. moniliforme* (Figura 1H).

Para a análise dos resultados, foi aplicado o método de GOODMAN (1964) para contrastes entre proporções multinomiais (binomiais), já que as variáveis foram classificadas em ausência ou presença (sementes infectadas ou não infectadas e germinadas ou não germinadas).

3.2.2. Redução da infestação de *Fusarium moniliforme* nas sementes mediante tratamento químico

Os testes realizados visando a redução da infestação de *F. moniliforme* nas sementes de milho consistiram das seguintes etapas: a) comparação entre os efeitos de NaCl e benomyl; b) efeito de diferentes concentrações para benomyl veiculado em água com diferentes tempos de tratamento das sementes; c) efeito da menor concentração de benomyl capaz de controlar o patógeno.

a) comparação entre efeitos de NaOCl e benomyl

Neste teste foram comparados os efeitos de diferentes tempos de exposição das sementes em NaOCl a 5,2%, e benomyl, em diferentes concentrações, veiculado em água destilada e acetona 99,5%, conforme apresentado a seguir:

<u>Tratamento</u>	<u>Concentração</u>	<u>Tempo</u>
NaOCl	5,2%	2 e 10 minutos
Benomyl em acetona	25.000mg/l	12 e 24 horas
" " "	7.500mg/l	"
" " "	1.000mg/l	"
Benomyl em água	25.000mg/l	"
" " "	7.500mg/l	"
" " "	1.000mg/l	"
Acetona	99,5%	24 horas
Imersão em água	-	"
Testemunha (sem imersão em água)	-	-

Cada tratamento neste teste constou de 5 repetições, cada uma delas constituída de sete sementes.

b) efeito de diferentes tempos de tratamento das sementes, em diferentes concentrações de benomyl veiculado em água

As diferentes concentrações de benomyl e os tempos de tratamentos utilizados foram os seguintes:

<u>Concentrações</u>	<u>Tempo</u>
1.000mg/l	1 hora
500mg/l	1, 12 e 24 horas
100mg/l	" " " "
10mg/l	" " " "
0 (Test.)	- - " "

Cada tratamento neste teste constou de 15 repetições, cada uma delas constituída de sete sementes.

c) efeito da menor concentração de benomyl capaz de controlar o patógeno em diferentes tempos de tratamento

Neste experimento comparou-se o efeito de benomyl na concentração de 500mg/l, quando as sementes foram submetidas a 2, 3, 4, 8 e 12 horas de tratamento, juntamente com as testemunhas tratadas somente com água. Cada tratamento neste teste constou de 15 repetições, cada uma delas constituída de sete sementes.

Os tratamentos das sementes com os diferentes produtos foram feitos em condições ambiente, usando frascos Erlenmeyer's que eram agitados periodicamente até o momento da lavagem das sementes.

Um procedimento adotado em todos os testes visando eliminar os resíduos do defensivo das sementes imediatamente após o tratamento, consistiu em 6 a 8 lavagens sucessivas por agitação em água destilada estéril. A forma usada para a certificação de que as sementes estavam livres de resíduos de benomyl após a lavagem foi a seguinte: cepas purificadas de *F. moniliforme* foram repicadas assepticamente sobre as sementes tratadas e lavadas; sendo as mesmas, em seguida, acondicionadas em placas-de-petri com papel filtro úmido e incubadas a 25°C. Nestas condições, após quatro dias, o fungo desenvolveu vigoroso micélio que colonizou toda a semente, comprovando assim a eficiência na remoção dos resíduos de benomyl. Por outro lado, as sementes que não foram submetidas à lavagem após o tratamento não foram colonizadas pelo fungo, como consequência da permanência dos resíduos do fungicida.

3.3. Cultivares de milho e isolados do patógeno utilizados

As sementes dos cultivares utilizados, sua procedência e o protocolo empregado em todas as fases do presente trabalho aparecem como apresentado a seguir:

<u>Cultivar</u>	<u>Procedência</u>	<u>Protocolo</u>
Milho Doce de Cuba	Instituto de Genética-ESALQ	DC
Composto A	Idem	CA
Composto B	Idem	CB
Composto amplo	Idem	AP
Piranão VD-2	Idem	VD
Piranão VF-1	Idem	VF
Pirapoca	Idem	PP
HMD-7974	Posto de sementes-Campinas Secretaria de Agricultura e Abastecimento	HM

As cepas de *Pythium* estudadas foram isoladas a partir de raízes de plantas adultas de milho que apresentavam sintomas necróticos associados, em alguns casos, a destruição do sistema radicular.

Seis isolados (1G, 1P, 2P, 3G, 4P e 5G) foram obtidos de plantas do cultivar (Piranão VF-1) e coletadas junto ao campo experimental do Instituto de Genética - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - USP, Piracicaba-SP. Os outros 4 isolados (A, B, D e F) foram obtidos de plantas do cultivar (HM) oriundas do campo experimental do Departamento de Engenharia - Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP, Botucatu-SP.

As plantas doentes coletadas em Piracicaba e Botucatu tinham em comum o fato de estarem se desenvolvendo em condições de solo extremamente úmido. Em Botucatu, isto se deu em função das altas taxas pluviométricas na época, enquanto que em Piracicaba as plantas foram obtidas em condições topográficas de baixada, quando o solo se encontrava encharcado.

Em ambas as localidades, as plantas foram coletadas durante o ciclo agrícola de 1981/1982.

3.4. Isolamento e preservação do patógeno

Os sistemas radiculares apresentando necroses em todos os tipos de raízes foram lavados em água corrente para a remoção da terra aderente aos mesmos.

A seguir, de diferentes partes das raízes, foram destacadas secções de aproximadamente 2cm de comprimento, que apresentavam tecidos necrosados e sadios.

Os fragmentos foram lavados em água estéril, sendo eles, a seguir, colocados em placas-de-petri contendo cerca de 10ml de água destilada estéril. Em cada placa foram colocados dois fragmentos de raízes e duas sementes de sorgo sacarino esterilizadas, cortadas ao meio e colocadas próximas aos fragmentos visando, assim, funcionarem como iscas para *Pythium*. As placas foram mantidas em condições ambiente e, após o desenvolvimento de *Pythium*, porções do micélio desenvolvido a partir das sementes foram colhidas com uma agulha, lavadas em água estéril, transferidas assepticamente para o meio de agar-água (AA) e incubadas no escuro a 25°C. Após 48 horas, foram coletadas pontas de hifas nos bordos da colônia, que foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de malto-se-peptona-agar (MPA) incubados a 25°C por 48 horas, quando foi feita uma inspeção visando detectar possíveis contaminações. Os tubos contendo então culturas puras foram mantidos - em câmara fria a 18°C.

Outro método usado neste trabalho para o isolamento de *Pythium* a partir de raízes necrosadas de milho, consistiu no plaqueamento de fragmentos de tecido de aproximadamente 0,5cm de comprimento, previamente esterilizados superficialmente durante um minuto em NaOCl a 2%. Os fragmentos, em número de quatro, foram colocados então sobre o substrato AA, de forma a ficarem equidistantes tanto entre si como em rela-

ção ao centro e ao bordo da placa-de-petri. A seguir, assepticamente, colocou-se sobre os fragmentos o substrato AA proveniente de uma segunda placa-de-petri, de forma a situar os fragmentos entre duas camadas de agar justapostas. Estas placas foram então mantidas em estufa a 25°C por 24 horas. Após este período e em condições assépticas, foram coletadas, com auxílio de uma agulha, pontas de hifas que emergiam na superfície da camada superior do substrato AA. Estes fragmentos de hifas foram transferidos para tubos de ensaio contendo MPA e mantidos em estufa a 25°C para posterior verificação da presença ou não de contaminantes. Tal método, com modificações, é descrito por SLEETH (1945).

A preservação dos isolados foi feita em água estéril e em meio de cultura sólido.

Para a preservação em água utilizou-se frascos de penicilina (FIGUEIREDO, 1967). A transferência dos isolados para frascos contendo água estéril, visando a preservação foi feita a partir de uma cultura pura desenvolvida durante 48 horas, em incubadora a 25°C e em meio de FMA-Difco. Com uma agulha foi retirado assepticamente um bloco de agar de 0,5cm² da região das extremidades das hifas, que foi transferido para o interior de cada frasco. A seguir, as tampas foram lacradas utilizando-se uma cinta de metal que as fixava ao corpo do frasco com auxílio de um aparelho apropriado. Para cada isolado foram feitas 6 repetições que foram mantidas em câmara climatizada a 18°C. Sempre que necessário, foram utilizadas as cepas originais removendo-se o lacre e, assepticamente, transferindo-se o bloco para meio de FMA-Difco.

Outra forma de preservação utilizada foi a de repicagens sucessivas a cada seis meses aproximadamente, usando-se tubos de cultura contendo meio de FMA-Difco que, após 48 horas de desenvolvimento do fungo em estufa a 25°C, foram mantidos em câmara climatizada a 18°C (DRECHSLER, 1949).

3.5. Metodologia geral empregada nos testes de patogenicidade

3.5.1. Generalidades

Em todos os ensaios de patogenicidade foram empregados vasos de cerâmica com 12cm de diâmetro superior e com capacidade para 1000ml. Tais recipientes possuíam um orifício localizado lateralmente, na parte inferior do mesmo para drenagem do excesso de água (Figura 1-I).

O substrato utilizado para o cultivo das plantas foi areia lavada e autoclavada (ELLIOTT, 1942).

Após a instalação dos ensaios, os vasos foram regados quando necessário, de forma a manter o substrato sempre em condições de alta umidade (McCARTER e LITTREL, 1968).

Todos os experimentos foram conduzidos em condições de casa-de-vegetação dotada de circuladores-umidificadores de ar e de aquecedores acionados por termostato.

A temperatura do ambiente foi registrada, durante o transcorrer de todos os experimentos, através do uso de um termôgrafo, como também a temperatura do substrato nos vasos mediante o emprego de um termôgrafo de solo.

As plantas foram adubadas com sulfato de amônia, superfosfato simples e cloreto de potássio na formulação 04-14-08, na proporção de 0,7g por vaso, semanalmente.

A identificação dos vasos foi realizada com o emprego de marcadores nos quais foram feitas as anotações necessárias.

3.5.2. Substrato utilizado para o desenvolvimento do patógeno e obtenção do inóculo

Duzentos gramas de areia lavada e secada ao ar e 5g de quirera de milho foram misturados, sendo acondiciona-

das em frascos de vidro com capacidade de 400ml, juntamente - com 40ml de água destilada. Após a percolação da água, o subtrato foi revolvido com uma espátula a fim de evitar a compactação, sendo os frascos vedados com uma rolha de borracha transpassada por um tubo de vidro com algodão na extremidade. Os frascos foram então, submetidos a duas autoclavagens durante uma hora, em dias sucessivos, à pressão de uma atmosfera, sendo, a seguir, acondicionados em ambiente de laboratório. Tal metodologia, com modificações, é mencionada por VALDEBENI TO (1982).

Os isolados de *Pythium*, empregados nos experimentos, foram repicados a partir de micélio mantido em água estéril, para placas-de-petri contendo meio de FMA-Difco, as quais foram incubadas no escuro a 25°C, durante 48 horas.

Após este período, usando-se um vazador de 1cm de diâmetro e uma espátula estéreis, transferiu-se dois blocos de agar, retirados da região da extremidade das hifas para o interior dos frascos contendo o substrato para a produção do inóculo descrito anteriormente.

A seguir, os frascos foram incubados no escuro, à temperatura de 25°C, por um período de 16 dias, sendo a cada três dias, agitados manualmente a fim de revolver o substrato e homogeneizar a sua colonização. Frascos contendo somente o substrato, sem o fungo, foram mantidos nas mesmas condições visando a sua utilização nos tratamentos de controle.

3.5.3. Inoculação

A fim de se proceder uma melhor homogeneização do inóculo produzido, o substrato contido nos frascos foi retirado com auxílio de uma espátula, efetuando-se a desintegração dos aglomerados manualmente, sobre uma folha de jornal.

Para se processar a mistura do substrato contendo o inóculo com a areia autoclavada, a fim de se obter as concentrações específicas de inóculo utilizados em cada expe-

rimento, foram usados sacos plásticos medindo 30x40cm, os quais foram vigorosamente agitados durante dois minutos.

A quantidade correspondente a 600ml da mistura de inóculo e areia assim padronizada, foi então transferida - para cada vaso autoclavado, colocando-se na parte interna, sobre o orifício de drenagem, uma tela de plástico, visando impedir o escoamento do conteúdo. Outro procedimento adotado , logo após a colocação do substrato no vaso, foi o de proceder a uma rega, evitando assim o dessecação do mesmo em prejuízo do patógeno nele contido.

Aos recipientes contendo a mistura de inóculo mais areia foi acrescentada, imediatamente, uma camada de 3cm de areia autoclavada, nivelando-se a superfície com auxílio - de uma espátula. A seguir, as sementes foram dispostas simetricamente, após isso, outra camada de cerca de 2cm de areia completaram o volume do vaso, regando-se este novamente.

Os tratamentos testemunhas receberam o mesmo procedimento que os inoculados com a diferença de que o substrato para inoculação não continha o fungo.

3.5.4. Tratamento das sementes

As sementes empregadas foram escolhidas e tratadas com o fungicida benomyl, na concentração de 500mg/litro de água, durante 4 horas, visando a erradicação de *Fusarium moniliforme* (Ítem 3.2.2.), pois a presença deste patógeno nas sementes poderia influir nos resultados das avaliações para reações ao *Pythium*.

3.6. Parâmetros utilizados na avaliação dos efeitos de *Pythium* no desenvolvimento das plantas

Por ocasião da coleta das plantas, para a remoção da areia do sistema radicular, usou-se uma peneira de 10 "mesh" colocada sobre um tanque; lavando-se cuidadosamente -

com um jato de água as raízes colocadas sobre a peneira. As plantas, com a areia já removida do sistema radicular, foram acondicionadas em sacos plásticos, protocolados e levadas para o laboratório para a realização das diferentes avaliações.

Em condições de casa-de-vegetação, foram avaliadas a porcentagem de emergência e a altura da parte aérea das plantas.

Porcentagem de emergência

A determinação foi baseada na contagem de plântulas que emergiram até 7 dias após a instalação do ensaio.

Altura da parte aérea

A medida foi tomada por ocasião da coleta das plantas, sendo para tanto, considerada a distância existente do nível do solo à lígula da última folha.

Em condições de laboratório, foram avaliados a severidade dos sintomas nas raízes e parte aérea, os pesos - fresco e seco do sistema radicular e da parte aérea, volume - do sistema radicular e o peso de sólidos voláteis do sistema radicular e da parte aérea.

Severidade dos sintomas

Na avaliação da severidade dos sintomas observados em raízes e na parte aérea, foi levado em consideração a escala de notas apresentada a seguir:

Zero (0) - sistema radicular bem desenvolvido com grande quantidade de raízes secundárias; ocorrência esparsa de lesões necróticas em raízes primárias e secundárias e bom desenvolvimento da parte aérea (Figuras 1-A e F₀);

- Um (1) - sistema radicular apresentando uma redução considerável no número de raízes secundárias; lesões necróticas extensas ocorrendo em número mais frequente nas raízes primárias; regiões menos densas do sistema radicular apresentando a ocorrência de necroses de raízes finas; e desenvolvimento da parte aérea apresentando uma redução em relação às plantas sem sintomas visíveis no sistema radicular (Figuras 1-B e F_1);
- Dois (2) - desenvolvimento do sistema radicular seriamente afetado, apresentando reduzido número de raízes secundárias; ocorrência de lesões necróticas extensas nas raízes primárias e destruição acentuada de raízes secundárias; redução da parte aérea mais acentuada que aquela verificada para plantas com nota (1) (Figuras 1-C e F_2);
- Três (3) - desenvolvimento do sistema radicular seriamente afetado, com poucas raízes primárias e com número escasso de raízes secundárias; ocorrência de necrose em raízes adventícias, em fases iniciais do desenvolvimento; e parte aérea reduzida quando comparada com plantas que receberam nota 2 (Figuras 1-D e F_3); e
- Quatro (4) - destruição completa do sistema radicular e parte aérea morta ou, quando não, irrecuperável (Figuras 1-E e F_4).

Peso fresco do sistema radicular e da parte aérea

A determinação do peso fresco do sistema radicular e da parte aérea foi feito logo após a chegada do material no laboratório e após o escoamento do excesso de água das raízes.

Figura 1. Avaliação dos danos causados por *Pythium* em raízes de milho através de escala de notas: (A), nota zero, ausência de sintomas; (B), (C), (D) e (E) respectivamente, notas 1, 2, 3 e 4; (F) a mesma escala evidenciando os efeitos na parte aérea; (G) detalhes dos sintomas iniciais da doença; (H) detecção de *F. moniliforme* em sementes de milho e (I) vasos utilizados nos experimentos (detalhe da drenagem lateral).

Volume das raízes

Na determinação do volume das raízes foi usado um aparelho medidor de volume dotado de um sensor eletrônico de nível (EIRA e SOUZA, 1984). Esta avaliação foi realizada - imediatamente após a avaliação do peso fresco.

Peso seco do sistema radicular e da parte aérea

O peso seco da raiz e da parte aérea foi obtido mediante secagem realizada em estufa, à temperatura de $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante. Foram utilizadas latinhas previamente taradas, sendo que, após a sua retirada da estufa, elas foram imediatamente tampadas e introduzidas em dessecadores contendo sílica gel até a estabilização da temperatura, quando então foram pesadas (SILVA, 1977).

Peso de sólidos voláteis do sistema radicular e da parte aérea

Para a volatilização dos sólidos constituintes do sistema radicular e da parte aérea, foi utilizada uma mufla à temperatura de 600°C , durante 30 minutos, até a obtenção de cinzas brancas, a fim de se obter a incineração da matéria orgânica. Os cadinhos de porcelana contendo as cinzas foram transferidos, imediatamente, após a retirada da mufla, para dessecadores contendo sílica gel, até a estabilização da temperatura, quando então foram pesados. O peso dos sólidos voláteis foi determinado da seguinte maneira: $\text{Peso seco} - \text{sólidos totais fixos (cinzas)} = \text{Peso dos sólidos voláteis}$ (SILVA, 1977). O uso deste parâmetro teve como objetivo eliminar o efeito das partículas de areia que normalmente permanecem aderidas às raízes.

3.7. Delineamento experimental e tratamento estatístico

Utilizou-se o esquema fatorial em blocos casualizados, de acordo com PIMENTEL GOMES (1966), variando o número de repetições de 3 a 4.

Para a variável emergência, a análise foi realizada com os dados originais (apêndice) transformados em $\sqrt{x}$, considerando-se como unidade experimental o número de plântulas emergidas após sete dias da semeadura. As demais análises foram realizadas com os dados originais.

Excetuando-se a altura da parte aérea, onde a unidade experimental consistiu da média da medida de duas plantas, nos demais casos as unidades experimentais consistiram das medidas das duas plantas.

As análises foram divididas em dois grupos: para o efeito do potencial de inóculo e efeito da época de coleta das plantas foi utilizado o esquema fatorial 2x2x4 com 4 repetições, enquanto que para o estudo da variabilidade e de reações de cultivares foram utilizados, respectivamente, os delineamentos 2x11 com 4 repetições, e 8x3 com 3 repetições. Todas as análises foram efetuadas ao nível de 1% de significância e quando o resultado da estatística F da análise de variância foi significativo, foi complementada com o teste de Tukey. No primeiro grupo a análise de variância foi complementada com a análise de regressão.

3.8. Cálculo dos dados da porcentagem de redução

Excetuando-se a variável severidade dos sintomas para todas as outras variáveis, foi empregada a fórmula referida por ERWIN e CAMERON (1957) para a determinação da porcentagem de redução dos tratamentos inoculados em relação à testemunha. Tal fórmula é dada pela seguinte relação:

$\frac{T - I}{T} \times 100 = \text{Porcentagem de redução; onde T e I referem-se à}$

somatória dos valores observados de pesos, medidas ou contagens das parcelas Testemunhas e Inoculadas, respectivamente.

Para a variável índice de doença, os cálculos foram feitos em relação ao complemento dos valores das notas observados. Foi denominado Complemento o resultado entre o máximo valor possível menos o valor observado. Para esta situação a fórmula é, então, dada pela seguinte relação:

$$\frac{C_T - C_I}{C_T} \times 100 = \text{Porcentagem de redução; onde } C_T \text{ e } C_I \text{ referem-se à diferença entre o máximo valor possível das notas menos a somatória dos valores observados das parcelas Testemunhas e Inoculadas, respectivamente.}$$

3.9. Efeito do potencial de inóculo no substrato, demonstrado no desenvolvimento das plantas

O presente experimento foi conduzido no período de 29/4 a 24/5 de 1982, tendo sido feito o registro das temperaturas diárias do ambiente da casa-de-vegetação e do solo através do uso de termógrafos.

Neste experimento foram comparados os efeitos de quatro níveis de inóculo, compreendendo eles, respectivamente, as diluições de uma parte do inóculo obtido em cultura pura em frascos com 2,5, 10, 40 e 160 partes da areia autoclavada. As partes correspondentes ao inóculo produzido em frasco e a areia autoclavada foram homogeneizadas, sendo então utilizados 600ml por frasco conforme a metodologia descrita no item 3.5.3.

Os hospedeiros empregados foram o milho Doce de Cuba (DC) e o milho híbrido HMD-7974 (HM), ao passo que o patógeno escolhido foi o isolado 1G, em função de resultados de testes preliminares.

Foram semeadas 8 sementes por vaso, sendo que, após a avaliação da emergência das plântulas, 7 dias após a instalação do experimento foi feito um desbaste de forma a

conservar somente as duas maiores plantas de cada vaso.

Os parâmetros avaliados neste experimento foram os seguintes: porcentagem de emergência; altura da parte aérea; severidade dos sintomas; volume das raízes; peso fresco das raízes; peso seco das raízes; peso fresco da parte aérea e peso seco da parte aérea.

3.10. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, nos danos causados pelo patógeno

A condução deste experimento deu-se no período de 13/01 a 10/02/1983, sendo comparadas 4 épocas de coleta , após a inoculação, para efeito de avaliação da ação de *Pythium* sobre as plantas.

Os hospedeiros utilizados neste ensaio foram o milho Doce de Cuba (DC) e o milho híbrido HMD-7974 (HM), utilizando-se o isolado 1G.

O potencial de inóculo empregado foi o homogeneizado resultante da mistura de uma parte do inóculo produzido em frascos com 100 partes da areia autoclavada. Esta concentração de inóculo foi utilizada em função de resultados obtidos do experimento anterior.

Após 7 dias da inoculação, foi feito o desbaste das plantas conservando-se as duas maiores em cada vaso.

As coletas das plantas para avaliação dos diferentes parâmetros foram feitas aos 10, 17, 24 e 31 dias após a inoculação.

Os parâmetros avaliados neste ensaio foram: severidade dos sintomas; peso fresco das raízes; peso fresco da parte aérea; peso seco das raízes; peso seco da parte aérea ; peso dos sólidos voláteis das raízes e peso dos sólidos voláteis da parte aérea.

3.11. Efeito da variabilidade de isolados do patógeno

Este experimento teve como objetivo procurar - determinar possíveis diferenças na patogenicidade entre os isolados obtidos.

A condução do experimento, em condições de casa-de-vegetação, deu-se no período de 24/9 a 18/10 de 1983.

Neste experimento foram comparados os seguintes isolados: A; B; D; F; 1G; 1P; 2P; 3G; 4P e 5G, sendo que o potencial de inóculo utilizado seguiu o critério descrito - no item anterior.

Os hospedeiros utilizados foram o milho híbrido HMD-7974 (HM) e o milho Doce de Cuba (DC).

Após 7 dias da inoculação, foi feito desbaste das plantas, de forma a conservar as duas maiores em cada vaso.

Os parâmetros avaliados neste ensaio foram: altura da parte aérea; severidade dos sintomas; volume das raízes, peso fresco das raízes; peso fresco da parte aérea; peso seco das raízes e peso seco da parte aérea.

3.12. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium*

Objetivou, este ensaio, verificar a possível presença de comportamentos diferenciais quanto à resistência do hospedeiro.

A condução do experimento deu-se no período de 09/12 a 04/01 de 1984.

Foram comparados os comportamentos dos seguintes cultivares: milho Doce de Cuba (DC); Composto A (CA); Composto B (CB); Composto Amplo (AP); Piranão VD-2 (VD); Piranão VF-1 (VF); HMD-7974 (HM) e Pirapoca (PP). O potencial de inóculo utilizado seguiu o critério descrito no item 3.10.3.; os isolados D e 4P foram escolhidos em função dos resultados do

experimento anterior. Após 7 dias da inoculação foi feito desbaste das plantas, de forma a manter as duas maiores em cada vaso.

Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de emergência; altura da parte aérea; severidade dos sintomas ; volume das raízes; peso fresco das raízes; peso fresco da parte aérea; peso seco das raízes e peso seco da parte aérea.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização taxonômica do patógeno

As Tabelas 1 e 2 mostram, respectivamente, a taxa de crescimento dos isolados em diversas temperaturas e os diâmetros de oogônios adultos. Quanto à taxa diária de crescimento, foi verificado, para a maioria dos isolados, que o crescimento mais rápido deu-se na faixa compreendida entre 30°C e 35°C. As temperaturas 10°C e 40°C para este teste corresponderam, respectivamente, aos limites inferior e superior para o crescimento dos isolados. Quanto ao diâmetro dos oogônios adultos, foi verificado que os isolados diferiram entre si, considerando-se as médias e os respectivos desvios padrões. Observou-se também, que os isolados apresentaram as seguintes características: crescimento micelial radial denso, sendo radial com halo no isolado A e radial nos isolados 1P e F; presença de esporângios normais e catenulados; oosporos abortivos (em grande quantidade nos isolados 1P e 1G); anterídios monóclinos e díclinos (mais de um anterídio por oogônio no isolado 2P); poucos oogônios férteis nos isolados A, B, D e F (férteis, com frequência no isolado 5G); oogônios pouco frequentes no isolado 4P.

No geral, todos os isolados exibiram escasso micélio aéreo; esporângios lobulados; número de anterídios va

Tabela 1. Taxa diária de crescimento (cm), dos isolados de *Pythium*, a diferentes temperaturas.

Temperaturas °C	I S O L A D O									
	A	B	D	F	LG	LP	2P	3G	4P	5G
10	0,15**	0,05	0,05	0,05	0,10	0,15	0,05	0,05	0,05	0,00
15	1,30	1,35	0,90	1,00	0,85	1,10	0,55	0,95	1,00	1,35
20	1,35	1,15	1,10	1,35	1,35	1,30	1,20	1,10	1,25	1,25
25	1,40	1,45	1,30	1,40	1,45	1,50	1,30	1,25	1,40	1,45
30	1,80	1,90	1,65	1,45	1,70	1,65	1,95	1,35	1,45	1,80
35	2,05	1,45	2,40	1,90	1,95	1,75	2,05	2,05	2,00	1,80
40	1,65	0,95	1,70	0,85	1,35	1,50	0,80	2,15	0,90	0,85

(*) Nas temperaturas de 5 e 45°C não houve crescimento.

(**) Média de quatro repetições, constando cada repetição de uma colônia por placa.

Tabela 2. Diâmetro (μm) de oogônios adultos dos isolados de *Pythium* em água.

Medidas (*)	I S O L A D O S									
	A	B	D	F	IG	1P	2P	3G	4P	5G
$\bar{x} \pm s$	26,4 $\pm$ 1,6	25,5 $\pm$ 1,3	25,6 $\pm$ 1,9	25,1 $\pm$ 1,3	26,8 $\pm$ 1,6	24,8 $\pm$ 1,6	25,3 $\pm$ 2,2	26,2 $\pm$ 1,9	25,6 $\pm$ 2,0	25,3 $\pm$ 1,2
A.V.	23,2-29,8	22,2-27,3	22,7-29,6	22,4-28,0	21,7-30,9	21,4-29,1	20,9-29,9	22,4-29,3	21,9-29,6	23,2-27,8

(*) Foram medidos 50 oogônios por isolado, onde $\bar{x} \pm s$ = média aritmética mais ou menos o desvio padrão e A.V. = amplitude de variação

Tabela 3. Porcentagens de germinação e infecção para os diversos tipos de tratamentos em sementes de milho, visando a redução da infestação de *Fusarium moniliforme*.

Tratamento	Tempo de Tratamento	Germinação (%)	Infecção (%)
NaOCl 5,2%	2 minutos	96 de*	76 de
	10 minutos	90 de	60 cd
benomyl 25.000mg/l	12 horas	56 abc	0 a
Em acetona	24 horas	28 a	0 a
benomyl 7.500mg/l	12 horas	32 ab	4 ab
Em acetona	24 horas	36 abc	0 a
benomyl 1.000mg/l	12 horas	40 abc	28 bc
Em acetona	24 horas	40 abc	12 ab
benomyl 25.000mg/l	12 horas	72 bcd	0 a
Em H ₂ O destilada	24 horas	64 abcd	0 a
benomyl 7.500mg/l	12 horas	88 cde	4 ab
Em H ₂ O destilada	24 horas	92 de	0 a
benomyl 1.000mg/l	12 horas	100 e	0 a
Em H ₂ O destilada	24 horas	96 de	4 ab
Acetona	24 horas	40 abc	60 cd
Imersão em água	24 horas	100 e	100 e
Testemunha	0	96 de	100 e

* Porcentagens seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 4. Porcentagens de germinação e infecção para os efeitos de tratamentos, em sementes de milho, com benomyl em solução aquosa, visando a redução da infestação de *Fusarium moniliforme*.

Tratamentos		Germinação (%)	Infecção (%)
mg/l	horas		
1.000	1	94 a*	18 bc
	24	94 a	0 a
500	12	100 a	0 a
	1	99 a	30 cd
100	24	98 a	1 a
	12	98 a	14 bc
	1	98 a	53 ef
10	24	99 a	5 ab
	12	96 a	49 de
	1	97 a	73 fg
Test.	0	93 a	99 h

* Porcentagens seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si.

riando de 1 a 6 (normalmente 1 ou 2) e oosporos viáveis, normalmente pleróticos.

4.2. Desinfecção de sementes de milho

O efeito de diferentes tratamentos em sementes de milho nos índices de germinação e infecção é apresentado - nas Tabelas 3, 4 e 5.

Na Tabela 3, os resultados observados referem-se à comparação entre os efeitos de NaOCl e benomyl em diferentes concentrações. As maiores porcentagens de germinação foram encontradas nos grupos representando os tratamentos: - NaOCl, benomyl veiculado por água a 1000mg/l, imersão em água e testemunha (sem imersão em água) que não diferiram entre si, sendo que a maior porcentagem de germinação foi detectada no tratamento com benomyl a 1000mg/l, veiculado por água, índice idêntico ao tratamento com água somente. Os grupos representando as menores porcentagens de germinação referem-se aos tratamentos: benomyl veiculado por acetona e acetona somente, que não diferiram entre si.

Dentre os grupos que apresentaram maiores porcentagens de germinação, os tratamentos com imersão em água e testemunha (sem imersão em água) foram os que apresentaram maior porcentagem de infecção. O tratamento de sementes com hipoclorito de sódio mostrou alta porcentagem de infecção e o tratamento com benomyl veiculado em água a 1000mg/l apresentou a menor porcentagem de infecção.

A Tabela 4 apresenta os resultados para diferentes concentrações de benomyl em solução aquosa, em diferentes tempos de tratamento. A avaliação referente às porcentagens de germinação não revelou diferença estatística significativa. As maiores porcentagens de infecção foram detectadas nos tratamentos testemunha e naqueles representados pelo menor tempo de exposição. Os tratamentos mais eficientes foram os - referentes à concentração de benomyl a 500mg/l por um período

de 12 e 24 horas, que não mostraram diferença estatística significativa com o tratamento a 100mg/l durante 24 horas, O tratamento que apresentou a mais baixa porcentagem de infecção, no menor tempo, foi o representado pela concentração de benomyl a 500mg/l durante 12 horas.

Na Tabela 5, são apresentados os resultados que mostram o efeito de diferentes tempos de tratamento com benomyl na concentração de 500mg/l. As porcentagens de germinação não variaram estatisticamente. Os tratamentos que duraram 4, 8 e 12 horas foram estatisticamente iguais e não apresentaram sementes infectadas pelo patógeno.

Tabela 5. Porcentagens de germinação e infecção para tempos de tratamento com benomyl em solução aquosa (500mg/l), em sementes de milho, visando a redução da infestação de *Fusarium moniliforme*.

Tempo de Tratamento	Germinação (%)	Infecção (%)
12	98 a*	0 a
8	96 a	0 a
4	97 a	0 a
3	97 a	8 b
2	100 a	33 c
0 (Test.)	96 a	97 d

* Porcentagens seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si.

4.3. Efeito do potencial de inóculo no substrato, demonstrado no desenvolvimento das plantas

Os dados referentes à temperatura do ambiente da casa-de-vegetação e do solo dos vasos, durante o transcor-

correr do experimento, constam da Figura 6 (Apêndice).

4.3.1. Parâmetros utilizados para avaliação do efeito do potencial de inóculo

O efeito de diferentes níveis de inóculo do isolado 1G de *Pythium*, para dois cultivares de milho, é apresentado na Tabela 6 sob a forma de severidade dos sintomas. Nas Tabelas de 7 a 18, o referido experimento foi analisado - através das análises de variância e de regressão feitas, separadamente, para os seguintes parâmetros: emergência; altura da parte aérea; volume das raízes; peso fresco das raízes; peso fresco da parte aérea e peso seco da parte aérea.

Severidade dos sintomas

Uma vez que a avaliação para a severidade dos sintomas, através da escala de notas, não revelou variabilidade entre as parcelas para alguns tratamentos, não foi feita a análise estatística, sendo apresentadas apenas as médias dos dados originais (Tabela 6).

Este parâmetro é comparado com os demais na Figura 2, na forma de porcentagem de redução.

Foi possível detectar uma tendência na redução na severidade dos sintomas para níveis de inóculo mais baixos, principalmente para o cultivar Doce de Cuba quando comparado com o HMD-7974.

Ao contrário do que seria esperado para os tratamentos testemunha, foram detectados, também, sintomas de podridão de raízes em plantas não inoculadas.

Emergência

O número de plântulas emergidas não mostrou diferenças significativas (Tabela 7) para os diferentes níveis

de inóculo dentro de cultivar dentro de isolado. Considerando, porém, cada nível de inóculo, houve diferenças significativas entre alguns tratamentos inoculados e não inoculados de ambos os cultivares. A análise de regressão (Tabela 8) não detectou significância para níveis dentro de cultivar dentro de isolado. Os dados originais constam da Tabela 48 (Apêndice).

Tabela 6. Efeito do potencial de inóculo na severidade dos sintomas de plantas dos cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de Inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	1G	2,00**	2,50	1,75	1,50
	Test.	1,75	1,00	0,75	0,25
HM	1G	2,25	2,25	2,25	1,75
	Test.	1,00	0,25	0,75	0,75

* Escala de notas onde "0" representa planta sadia e "4" representa planta morta.

** Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

Altura da parte aérea

A medida da altura da parte aérea apresentou diferenças significativas (Tabela 9) entre os níveis 1/2,5 e 1/160 com relação aos tratamentos inoculados para ambos os cultivares de milho. As plantas testemunhas não mostraram diferenças significativas com relação ao emprego de diferentes níveis para ambos os cultivares. Comparando-se os tratamentos inoculados e não inoculados em cada cultivar, para cada nível

Tabela 7. Efeito do potencial de inóculo na emergência de plântulas dos -
cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de Inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	1G	1,60*a** a	1,65a a	1,57a a	2,02a a
	Test.	2,18a a	2,44b a	2,59b a	2,49a a
HM	1G	1,57a a	1,72a a	1,64a a	2,15a a
	Test.	2,50b a	2,22a a	2,49b a	2,23a a

* Média de quatro repetições, baseada na transformação raiz quadrada da emergência.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (N/C/I) ou coluna (I/C/N), não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 17,57

DMS(1%) = 0,85 níveis dentro de cultivar dentro de isolado (N/C/I).

DMS(1%) = 0,69 isolados dentro de cultivar dentro de nível (I/C/N).

Tabela 8. Análise da regressão para emergência de plântulas de milho influenciada pelo potencial de inóculo, considerando os cultivares e inoculação.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	3,644	
		Q	0,371	
		C	0,076	
	Test.	L	0,523	
		Q	1,834	
		C	5,252	
HM	1G	L	5,668	
		Q	0,182	
		C	0,356	
	Test.	L	0,515	
		Q	0,024	
		C	1,432	

Tabela 9. Efeito do potencial de inóculo na altura da parte aérea (cm) de plantas dos cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de Inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	1G	7,56*a** a	8,25a ab	8,87a ab	11,31a b
	Test.	13,25b a	14,50b a	13,56b a	14,43b a
HM	1G	8,19a a	9,00a ab	9,25a ab	12,06a b
	Test.	12,75b a	14,31b a	14,56b a	14,69b a

* Média de quatro repetições, cada uma constituída da média de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (N/C/I) ou coluna (I/C/N) - não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 11,94

DMS (1%) = 3,27 níveis dentro de cultivar dentro de isolado (N/C/I)

DMS (1%) = 2,66 isolados dentro de cultivar dentro de nível (I/C/N)

Tabela 10. Análise da regressão da altura da parte aérea de plantas de milho no potencial de inóculo, considerando os cultivares e inoculação.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	16,148**	$\hat{Y} = 0,022X + 7,826$
		Q	0,151	
		C	0,206	
	Test.	L	0,612	
		Q	0,056	
		C	1,768	
HM	1G	L	17,190**	$\hat{Y} = 0,023X + 8,414$
		Q	0,001	
		C	0,442	
	Test.	L	1,732	
		Q	1,664	
			1,612	

de inóculo, as plantas testemunhas foram significativamente maiores que as inoculadas com *Pythium*. A análise de regressão (Tabela 10) indicou significância somente para os níveis quando inoculados com o isolado 1G, ocorrendo linearmente para ambos os cultivares.

Volume das raízes

A medida do volume das raízes mostrou diferenças significativas (Tabela 11) entre os níveis 1/2,5 e 1/160 com relação aos tratamentos inoculados com o isolado 1G, para ambos os cultivares de milho. O volume de raízes das plantas testemunhas não mostraram diferenças significativas com relação ao emprego de diferentes níveis para ambos os cultivares. Comparando os tratamentos inoculados com *Pythium* ou não inoculados, dentro de cada cultivar, para cada nível de inóculo, as raízes das plantas testemunhas foram significativamente maiores que as inoculadas. A análise de regressão (Tabela 12) indicou significância somente para os tratamentos inoculados dos dois cultivares, mostrando comportamento linear para ambos.

Peso fresco das raízes

O peso fresco das raízes (Tabela 13) das plantas do cultivar HMD-7974 mostrou diferença significativa entre os níveis 1/2,5 e 1/160 quando inoculadas com *Pythium*; já o cultivar milho Doce de Cuba, bem como as testemunhas de ambos os cultivares, não variaram significativamente para comparações de níveis dentro de cultivar dentro de isolado. Relacionando o efeito de inoculação dentro de cultivar e dentro de nível, houve diferença significativa, mostrando que as raízes das plantas inoculadas foram afetadas pela ação do fungo. A análise de regressão (Tabela 14) indicou que houve signifi-

Tabela 11. Efeito do potencial de inóculo no volume das raízes (cm^3) de plantas dos cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de Inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	1G	3,79*a** a	4,88a ab	6,26a ab	9,19a b
	Test.	13,56b a	15,05b a	15,04b a	14,81b a
HM	1G	4,89a a	6,26a ab	6,77a ab	11,18a b
	Test.	19,20b a	22,57b a	21,35b a	19,41b a

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (N/C/I) ou coluna (I/C/N) - não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 17,29

DMS (1%) = 4,93 níveis dentro de cultivar dentro de isolado (N/C/I)

DMS (1%) = 4,01 isolados dentro de cultivar dentro de nível (I/C/N)

Tabela 12. Análise da regressão do volume de raízes de plantas de milho - no potencial de inóculo, considerando os cultivares e inoculação.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	14,074**	$\hat{Y} = 0,031X + 4,377$
		Q	0,672	
		C	0,158	
	Test.	L	0,143	
		Q	0,522	
		C	0,704	
HM	1G	L	19,635**	$\hat{Y} = 0,037X + 5,327$
		Q	0,021	
		C	0,532	
	Test.	L	1,296	
		Q	1,373	
		C	4,426	

Tabela 13. Efeito do potencial de inóculo no peso fresco das raízes (g) de plantas dos cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7074 - (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de Inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	1G	4,44*a** a	4,47a a	4,63a a	6,63a a
	Test.	12,01b a	13,44b a	13,24b a	13,40b a
HM	1G	4,89a a	5,65a ab	6,32a ab	10,16a b
	Test.	16,62b a	19,73b a	19,18b a	17,40b a

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (N/C/I) ou coluna (I/C/N) - não diferem estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 19,73

DMS (1%) = 4,99 níveis dentro de cultivar dentro de isolado (N/C/I)

DMS (1%) = 4,06 isolados dentro de cultivar dentro de nível (I/C/N)

Tabela 14. Análise da regressão do peso fresco das raízes de plantas de milho no potencial de inóculo, considerando os cultivares e inoculação.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	2,934	$\hat{Y} = 0,033X + 4,837$
		Q	0,061	
		C	0,001	
	Test.	L	0,027	
		Q	0,256	
		C	0,697	
HM	1G	L	15,067**	$\hat{Y} = 0,033X + 4,837$
		Q	0,283	
		C	0,226	
	Test.	L	0,394	
		Q	1,968	
		C	3,351	

cância para níveis dentro do cultivar HMD-7974 para as plantas inoculadas, apresentando comportamento linear.

Peso fresco da parte aérea

A Tabela 15, referente ao peso fresco da parte aérea das plantas, não mostra diferenças significativas com relação aos diferentes níveis de inóculo, para ambos os cultivares de milho quando inoculados com o *Pythium* ou não inoculados. Plantas inoculadas ou não inoculadas, dentro de cultivar, dentro de nível mostraram diferenças significativas, indicando menor peso para as plantas inoculadas. A análise de regressão (Tabela 16) detectou significância para níveis dentro de cultivar, somente para as plantas inoculadas, mostrando tendência linear.

Peso seco da parte aérea

Os dados da Tabela 17 não mostram diferenças significativas para níveis de inóculo dentro de cultivar, tanto para plantas inoculadas com *Pythium* como não inoculadas. A análise de regressão (Tabela 18) mostrou significância somente para peso seco da parte aérea de plantas inoculadas para níveis dentro do cultivar HMD-7974, sendo um comportamento linear.

4.3.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados

A Tabela 19 mostra uma síntese dos parâmetros usados para avaliação do efeito do potencial de inóculo, no substrato, em dois cultivares de milho inoculados com *Pythium* e não inoculados.

Os parâmetros altura da parte aérea e volume das raízes detectaram diferenças significativas quando plan-

Tabela 15. Efeito do potencial de inóculo no peso fresco da parte aérea (g) de plantas dos cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de Inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	1G	6,32*a** a	7,79a a	7,08a a	12,86a a
	Test.	18,32b a	22,62b a	21,60b a	25,13b a
HM	1G	6,23a a	8,36a a	8,48a a	13,86a a
	Test.	23,80b a	26,20b a	25,28b a	24,74b a

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (N/C/I) ou coluna (I/C/N) - não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 21,50

DMS (1%) = 8,17 níveis dentro de cultivar dentro de isolado (N/C/I)

DMS (1%) = 6,64 isolados dentro de cultivar dentro de nível (I/C/N)

Tabela 16. Análise da regressão do peso fresco da parte aérea de plantas de milho no potencial de inóculo, considerando os cultivares e inoculação.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	8,084**	$\hat{Y} = 0,039X + 6,437$
		Q	0,240	
		C	0,372	
	Test.	L	5,156	
		Q	0,188	
		C	2,557	
HM	1G	L	9,959**	$\hat{Y} = 0,043X + 6,928$
		Q	0,002	
		C	0,553	
	Test.	L	0,011	
		Q	0,152	
		C	0,834	

Tabela 17. Efeito do potencial de inóculo no substrato no peso seco da parte aérea (g) de plantas dos cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de Inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	1G	0,54*a** a	0,64a a	0,61a a	1,06a a
	Test.	1,30b a	1,75b a	1,73b a	1,97b a
HM	1G	0,56a a	0,62a a	0,81a a	1,21a a
	Test.	1,88b a	2,18b a	2,14b a	2,12b a

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (N/C/I) ou coluna (I/C/N) - não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 23,72

DMS (1%) = 0,73 níveis dentro de cultivar dentro de isolado (N/C/I)

DMS (1%) = 0,60 isolados dentro de cultivar dentro de nível (I/C/N)

Tabela 18. Análise da regressão do peso seco da parte aérea de plantas de milho no potencial de inóculo, considerando os cultivares e inoculação.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	6,319	$\hat{Y} = 0,004X + 0,589$
		Q	0,123	
		C	0,174	
	Test.	L	5,602	
		Q	1,075	
		C	3,144	
HM	1G	L	10,507**	$\hat{Y} = 0,004X + 0,589$
		Q	0,266	
		C	0,001	
	Test.	L	0,225	
		Q	0,676	
		C	1,383	

Tabela 19. Apresentação geral dos parâmetros de avaliação para o efeito do potencial de inóculo (níveis) em dois cultivares de milho inoculados e não inoculados com *Pythium*.

Parâmetros	Cultivar Milho Doce de Cuba								Cultivar HMD-7974								CV (%)
	Isolado LG				Testemunha				Isolado LG				Testemunha				
	Níveis				Níveis				Níveis				Níveis				
	1/2,5	1/10	1/40	1/160	1/2,5	1/10	1/40	1/160	1/2,5	1/10	1/40	1/160	1/2,5	1/10	1/40	1/160	
Emergência (Nº plantas)**	1,60 a*	1,65 a	1,57 a	2,02 a	2,18 a	2,44 a	2,59 a	2,49 a	1,57 a	1,72 a	1,64 a	2,15 a	2,50 a	2,22 a	2,49 a	2,23 a	0,85 17,57
Altura parte aérea (cm)	7,56 a	8,25 ab	8,87 ab	11,31 b	13,25 a	14,50 a	13,56 a	14,43 a	8,19 a	9,00 ab	9,25 ab	12,06 b	12,75 a	14,31 a	14,56 a	14,69 a	3,27 11,94
Volume raízes (cm ³)	3,79 a	4,83 ab	6,26 ab	9,19 b	13,56 a	15,05 a	15,04 a	14,81 a	4,89 a	6,26 ab	6,77 ab	11,18 b	19,20 a	22,57 a	21,35 a	19,41 a	4,93 17,29
Peso fresco raízes (g)	4,44 a	4,47 a	4,63 a	6,63 a	12,01 a	13,44 a	13,24 a	13,40 a	4,89 a	5,65 ab	6,32 ab	10,16 b	16,62 a	19,73 a	19,18 a	17,40 a	4,99 19,73
Peso fresco p aérea (g)	6,32 a	7,79 a	7,08 a	12,86 a	18,32 a	22,62 a	21,60 a	25,13 a	6,23 a	8,36 a	8,48 a	13,86 a	23,80 a	26,20 a	25,28 a	24,74 a	8,17 21,50
Peso seco p. aérea (g)	0,54 a	0,64 a	0,61 a	1,06 a	1,30 a	1,75 a	1,73 a	1,97 a	0,55 a	0,62 a	0,81 a	1,21 a	1,88 a	2,18 a	2,14 a	2,12 a	0,73 23,72
Peso seco raízes (g)***	0,34	0,41	0,39	0,49	0,88	0,93	0,84	0,93	0,51	0,53	0,61	0,76	1,21	1,41	1,27	1,31	

* Médias seguidas pela mesma letra na linha para níveis dentro de isolado dentro de cultivar, não diferem estatisticamente entre si (Teste Tukey).

** Dados transformados em $\sqrt{x}$.

*** Existência de não homogeneidade entre as parcelas para os tratamentos.

tas de milho Doce de Cuba foram inoculadas com *Pythium* em diferentes níveis. Os mesmos dois parâmetros anteriores mais o peso fresco das raízes propiciaram diferenças significativas para o cultivar HMD-7974. Através dos demais parâmetros não foi possível detectar diferenças entre os vários níveis de inóculo para ambos os cultivares. Para as plantas testemunhas nenhum critério possibilitou determinar significativamente possíveis diferenças entre os vários níveis para ambos os cultivares.

Na Tabela 19 consta ainda os dados referentes ao parâmetro peso seco das raízes, o qual não foi analisado estatisticamente, uma vez que revelou a existência de não homogeneidade entre as parcelas para os tratamentos.

4.3.3. Efeito do potencial de inóculo na porcentagem de redução observada para diferentes parâmetros

O cálculo da porcentagem de redução com relação aos níveis de inóculo é mostrado na Figura 2, para os diferentes parâmetros, em dois cultivares de milho.

Os resultados revelaram comportamentos semelhantes para ambos os cultivares considerando-se os diferentes níveis de inóculo para a maioria dos parâmetros avaliados. A altura da parte aérea; o volume das raízes; peso fresco das raízes; peso fresco da parte aérea e peso seco da parte aérea, mantiveram a mesma tendência para os dois cultivares. A altura da parte aérea, embora apresentando comportamento semelhante, mostra um percentual de redução bem menor que os demais. O parâmetro severidade dos sintomas para o cultivar HMD-7974, também apresenta uma tendência que se assemelha com aquelas obtidas para os anteriormente descritos, ao passo que para o cultivar milho Doce de Cuba a representação das porcentagens de redução para severidade dos sintomas não se relaciona com nenhum outro dentre os avaliados. A variável emergência, para ambos os cultivares, apresentou-se como sendo a que menos se

Figura 2. Efeito do potencial de inóculo na porcentagem de redução causada por *Pythium*, para diferentes parâmetros, em dois cultivares de milho.

relacionou com a tendência da maioria dos parâmetros avaliados.

A representação mostra, no geral, um decréscimo da porcentagem de redução, para a maioria dos parâmetros - avaliados, na medida que se diminui o potencial de inóculo no substrato.

4.4. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, nos danos causados pelo patógeno

Os dados referentes à temperatura do ambiente da casa-de-vegetação e do solo dos vasos, durante o transcorrer do experimento, constam da Figura 6 (Apêndice).

4.4.1. Parâmetros utilizados para avaliação do efeito da época de coleta das plantas

O efeito da época de coleta das plantas de dois cultivares de milho, quando inoculados com o isolado 1G de *Pythium*, é apresentado na Tabela 20 sob a forma de severidade dos sintomas. Nas Tabelas de 21 a 30, o experimento foi analisado através das análises de variância e de regressão, feitas separadamente, para os seguintes parâmetros: peso fresco da parte aérea; peso seco das raízes; peso seco da parte aérea; peso dos sólidos voláteis das raízes e peso dos sólidos voláteis da parte aérea.

Severidade dos sintomas

Pelo fato de não ocorrer variabilidade entre as parcelas dentro de alguns tratamentos, a análise estatística não foi feita, sendo apresentadas apenas as médias dos dados originais (Tabela 20). Foi verificado que o período decorrente após a inoculação não influenciou consideravelmente na severidade dos sintomas, que se mostrou elevado nos diferentes pe

ríodos para ambos os cultivares quando inoculados.

O parâmetro severidade dos sintomas aparece, - em comparação com os demais na Figura 3, na forma de porcentagem de redução.

Tabela 20. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, na severidade dos sintomas* para os cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Dias após a inoculação			
		10	17	24	31
DC	1G	2,00**	2,50	2,25	2,50
	Test.	0,25	0,00	0,00	0,00
HM	1G	2,50	2,75	2,50	2,25
	Test.	0,25	0,25	0,00	0,00

* Escala de notas onde "0" representa planta sadia e "4" representa planta morta.

** Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

Peso fresco da parte aérea

Os dados da Tabela 21 apresentam diferenças significativas para o peso fresco da parte aérea de plantas do cultivar milho Doce de Cuba quando inoculadas com *Pythium*, considerando a última época de coleta em comparação com as demais. Para plantas inoculadas do cultivar HMD-7974, houve significância da última época de coleta quando comparada com as duas primeiras. O peso fresco da parte aérea das plantas testemunhas, considerando dias dentro de cultivar, foi significativamente diferente para todos os tratamentos. Comparando os

Tabela 21. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, no peso fresco da parte aérea (g) para os cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Dias após a inoculação			
		10	17	24	31
DC	1G	0,78*a** a	2,46a a	4,34a a	10,49a b
	Test.	2,04a a	7,57b b	13,31b c	31,09b d
HM	1G	0,82a a	1,67a a	3,53a ab	8,08a b
	Test.	2,37a a	8,84b b	16,84b c	26,02b d

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (D/C/I) ou coluna (I/C/D) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 25,22

DMS (1%) = 5,19 dias dentro de cultivar dentro de isolado (D/C/I)

DMS (1%) = 4,22 isolados dentro de cultivar dentro de dia (I/C/D)

Tabela 22. Análise da regressão do peso fresco da parte aérea de plantas - de milho, na época de coleta, considerando o cultivar e o isolado.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	39,181**	$\hat{Y} = 0,443X - 4,563$
		Q	4,219	
		C	0,741	
	Test.	L	353,281**	$\hat{Y} = 0,063X^2 - 1,827X + 20,619$
		Q	30,678**	
		C	5,707	
HM	1G	L	22,879**	$\hat{Y} = 0,338X - 3,397$
		Q	2,811	
		C	0,115	
	Test.	L	255,205**	$\hat{Y} = 1,128X - 9,601$
		Q	1,505	
		C	0,004	

tratamentos inoculados e não inoculados com *Pythium*, em cada cultivar, para cada época de coleta, as partes aéreas das plantas testemunhas foram significativamente mais pesadas nas três últimas épocas de coleta. A análise de regressão (Tabela 22) indicou significância para período de coleta das plantas dentro de tratamentos inoculados e testemunhas nos dois cultivares, sendo quadrática na testemunha do milho Doce de Cuba e linear nos demais.

Peso seco das raízes

A Tabela 23 não revela diferenças significativas no peso seco das raízes de plantas de ambos os cultivares de milho, quando inoculadas com o isolado 1G de *Pythium*, para todas as épocas de coleta. Já o peso seco das raízes das plantas testemunhas apresentou diferenças significativas entre as duas últimas épocas de coleta em comparação com as duas primeiras, em ambos os cultivares. Comparando os tratamentos inoculados e não inoculados com *Pythium*, em cada cultivar, para cada época de coleta, as raízes das plantas não inoculadas foram significativamente mais pesadas que as dos tratamentos inoculados nas duas últimas épocas de coleta, para ambos os cultivares. A análise de regressão (Tabela 24) mostrou significância para período de coleta das plantas dentro de tratamentos inoculados e não inoculados do cultivar milho Doce de Cuba e para tratamentos não inoculados do cultivar HMD-7974, apresentando tendência linear para estes casos.

Peso seco da parte aérea

Na Tabela 25 são mostradas as diferenças significativas no peso seco da parte aérea de plantas do cultivar milho Doce de Cuba quando inoculadas com *Pythium*, considerando a última época de coleta em comparação com as demais. Para plantas inoculadas do cultivar HMD-7974, houve significância

Tabela 23. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, no peso seco das raízes (g) para os cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Dias após a inoculação			
		10	17	24	31
DC	1G	0,08*a** a	0,24a a	0,64a a	0,83a a
	Test.	0,14a a	0,65a a	1,84b b	2,67b b
HM	1G	0,11a a	0,16a a	0,51a a	0,78a a
	Test.	0,18a a	0,88a a	2,20b b	3,18b c

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (D/C/I) ou coluna (I/C/D) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 43,19

DMS (1%) = 0,95 dias dentro de cultivar dentro de isolado (D/C/I)

DMS (1%) = 0,77 isolados dentro de cultivar dentro de dia (I/C/D).

Tabela 24. Análise da regressão do peso seco das raízes de plantas de milho, na época de coleta, considerando o cultivar e o isolado.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	8,536**	$\hat{Y} = 0,038X - 0,329$
		Q	0,012	
		C	0,237	
	Test.	L	93,546**	$\hat{Y} = 0,125X - 1,234$
		Q	0,639	
		C	1,302	
HM	1G	L	6,723	
		Q	0,267	
		C	0,164	
	Test.	L	129,705**	$\hat{Y} = 0,148X - 1,412$
		Q	0,517	
		C	1,156	

Tabela 25. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, no peso seco da parte aérea (g) para os cultivares de milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Dias após a inoculação			
		10	17	24	31
DC	1G	0,07*a** a	0,25a a	0,38a a	1,08a b
	Test.	0,17a a	0,75b b	1,07b b	3,71b c
HM	1G	0,09a a	0,19a a	0,42a ab	0,91a b
	Test.	0,21a a	1,08b b	1,61b b	3,48b c

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (D/C/I) ou coluna (I/C/D) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 25,13

DMS (1%) = 0,57 dias dentro de cultivar dentro de isolado (D/C/I)

DMS (1%) = 0,46 isolados dentro de cultivar dentro de dia (I/C/D)

Tabela 26. Análise da regressão do peso seco da parte aérea de plantas de milho, na época de coleta, considerando o cultivar e o isolado.

Cultivar	Isolado	Regressão		Equação de regressão
DC	1G	L	33,191**	$\hat{Y}= 0,045X - 0,469$
		Q	4,572	
		C	1,084	
	Test.	L	406,760**	$\hat{Y}= 0,001x^3 - 0,051x^2 +$ $+0,866x - 4,399$
		Q	71,632**	
		C	22,810**	
HM	1G	L	24,809**	$\hat{Y}= 0,039X - 0,391$
		Q	2,625	
		C	0,085	
	Test.	L	364,085**	$\hat{Y}= 0,001x^3 - 0,057x^2 +$ $+1,103x - 6,199$
		Q	16,680**	
		C	9,805**	

somente entre a última época de coleta e as duas primeiras. O peso seco da parte aérea das plantas testemunhas não apresentou diferenças significativas entre as duas épocas intermediárias de coleta, porém, houve variação entre esses períodos - quando comparados com a primeira e a última época de coleta, sendo que estas foram significativamente diferentes entre si, para ambos os cultivares. Comparando os tratamentos inoculados e não inoculados com *Pythium*, em cada cultivar, para cada época de coleta, as plantas não inoculadas foram significativamente mais pesadas que os tratamentos inoculados nas três últimas épocas de coleta, para os dois cultivares. A análise de regressão (Tabela 26) revelou significância para dias dentro de plantas inoculadas e não inoculadas, para ambos os cultivares, sendo que a regressão para os dados das plantas inoculadas foi linear e para as testemunhas foi cúbica.

Peso dos sólidos voláteis das raízes

Os dados apresentados na Tabela 27 não mostram diferenças significativas no peso dos sólidos voláteis das raízes de plantas de ambos os cultivares de milho, quando inoculadas com o isolado LG de *Pythium*, para todas as épocas de coleta. As testemunhas apresentaram diferenças significativas entre as duas últimas épocas de coleta em comparação com as duas primeiras em ambos os cultivares. Comparando os tratamentos inoculados e não inoculados com *Pythium*, em cada cultivar, para cada época de coleta, os sólidos voláteis das raízes de plantas não inoculadas foram significativamente mais pesados que os das plantas inoculadas nas duas últimas épocas de coleta em ambos os cultivares. A análise de regressão (Tabela 28) mostrou significância para dias dentro de plantas inoculadas e não inoculadas do cultivar milho Doce de Cuba e para plantas não inoculadas do cultivar HMD-7974, ocorrendo comportamento linear para todos os casos.

Tabela 27. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, no peso dos sólidos voláteis das raízes (g) para os cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Dias após a inoculação			
		10	17	24	31
DC	1G	0,08*a** a	0,21a a	0,59a a	0,77a a
	Test.	0,12a a	0,56a a	1,65b b	1,84b b
HM	1G	0,08a a	0,14a a	0,47a a	0,61a a
	Test.	0,15a a	0,77a a	1,96b b	2,46b b

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (D/C/I) ou coluna (I/C/D) não diferem estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 51,10

DMS (1%) = 0,93 dias dentro de cultivar dentro de isolado (D/C/I)

DMS (1%) = 0,76 isolados dentro de cultivar dentro de dia (I/C/D)

Tabela 28. Análise da regressão do peso dos sólidos voláteis das raízes de plantas de milho, na época de coleta, considerando o cultivar e o isolado.

Cultivar	Isolado	Regressão		Equação de regressão
DC	1G	L	7,840**	$\hat{Y} = 0,035X - 0,316$
		Q	0,019	
		C	0,198	
	Test.	L	49,841**	$\hat{Y} = 0,089X - 0,790$
		Q	0,542	
		C	2,932	
HM	1G	L	4,653	
		Q	0,051	
		C	0,249	
	Test.	L	84,577**	$\hat{Y} = 0,116X - 1,051$
		Q	0,013	
		C	2,639	

Peso dos sólidos voláteis da parte aérea

Na Tabela 29 são apresentados dados que mostram diferenças significativas no peso dos sólidos voláteis da parte aérea de plantas do cultivar milho Doce de Cuba quando inoculadas com *Pythium*, considerando a última época de coleta em comparação com as duas primeiras. Para plantas inoculadas do cultivar HMD-7974, houve significância somente entre a primeira e última época de coleta. Os sólidos voláteis das plantas testemunhas, dentro de ambos os cultivares, apresentaram um significativo aumento de peso das primeiras para as últimas épocas de coleta. Comparando os tratamentos inoculados e não inoculados com *Pythium*, em cada cultivar, para cada época de coleta, o peso das plantas não inoculadas foi significativamente maior que os tratamentos inoculados, considerando a última época de coleta para o cultivar milho Doce de Cuba e as últimas três épocas para o HMD-7974. A análise de regressão (Tabela 30) mostrou significância para períodos de coleta dentro de plantas inoculadas e não inoculadas para ambos os cultivares, sendo que a regressão para os dados das plantas inoculadas foi linear em ambos os cultivares, enquanto que a regressão para o milho Doce de Cuba e o HMD-7974 não inoculados foi, respectivamente, cúbica e quadrática.

4.4.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados

A Tabela 31 apresenta uma síntese dos parâmetros usados para avaliação do efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, em dois cultivares de milho inoculados e não inoculados com *Pythium*.

Considerando os parâmetros peso seco das raízes e peso dos sólidos voláteis das raízes, os dados mostram que houve semelhança entre os resultados para ambos os culti-

Tabela 29. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, no peso dos sólidos voláteis da parte aérea (g) para os cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Dias após a inoculação			
		10	17	24	31
DC	1G	0,07*a** a	0,23a a	0,36a ab	0,97a b
	Test.	0,15a a	0,62a ab	0,92a b	3,19b c
HM	1G	0,08a a	0,17a ab	0,38a ab	0,88a b
	Test.	0,18a a	0,99b b	1,45b b	3,01b c

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas pela mesma letra na linha (D/C/I) ou coluna (I/C/D) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 33,99

DMS (1%) = 0,72 dias dentro de cultivar dentro de isolado (D/C/I)

DMS (1%) = 0,58 isolados dentro de cultivar dentro de dia (I/C/D)

Tabela 30. Análise da regressão do peso dos sólidos voláteis da parte aérea de plantas de milho, na época de coleta, considerando o cultivar e o isolado.

Cultivar	Isolado	Regressão	F	Equação de regressão
DC	1G	L	17,229**	$\hat{Y} = 0,040X - 0,423$
		Q	2,100	
		C	0,635	
	Test.	L	190,967**	
		Q	34,834**	
		C	9,874**	$\hat{Y} = 0,001X^3 - 0,061X^2 + 1,254X - 7,747$
HM	1G	L	14,590**	$\hat{Y} = 0,037X - 0,388$
		Q	1,831	
		C	0,054	
	Test.	L	115,140**	
		Q	45,602**	$\hat{Y} = 0,011X^2 - 0,346X + 3,242$
		C	2,207	

Tabela 31. Apresentação geral dos parâmetros de avaliação para o efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, em dois cultivares de milho inoculados e não inoculados com *Pythium*.

Parâmetros	Cultivar Milho Doce de Cuba										Cultivar RMD-7974										DVS (18)	CV (%)
	Isolado 1G					Testemunha					Isolado 1G					Testemunha						
	10	17	24	31	Dias	10	17	24	31	Dias	10	17	24	31	Dias	10	17	24	31	Dias		
Peso fresco P. aérea (g)	0,76	2,46	4,34	10,49	2,04	7,57	13,31	31,09	0,82	1,67	3,53	8,08	2,37	8,84	16,84	26,02	5,19	25,22				
	a*	a	a	b	a	b	c	d	a	a	ab	b	a	b	c	d						
Peso seco raízes (g)	0,08	0,24	0,64	0,83	0,14	0,65	1,64	2,67	0,11	0,16	0,51	0,78	0,18	0,88	2,20	3,18	0,95	43,19				
	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	b	c						
Peso seco p. aérea (g)	0,07	0,25	0,38	1,08	0,17	0,75	1,07	3,71	0,09	0,19	0,42	0,91	0,21	1,08	1,61	3,48	0,57	25,13				
	a	a	a	b	a	b	b	c	a	a	ab	b	a	b	b	c						
Peso sol. voláteis raízes (g)	0,08	0,21	0,59	0,77	0,12	0,56	1,65	1,84	0,08	1,14	0,47	0,61	0,15	0,77	1,96	2,46	0,93	51,10				
	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	a	a	a	a	b	b						
Peso sol. voláteis P. aérea (g)	0,07	0,23	0,36	0,97	0,15	0,62	0,92	3,19	0,08	0,17	0,38	0,88	0,16	0,99	1,45	3,01	0,72	33,99				
	a	a	ab	b	a	ab	b	c	a	ab	ab	b	a	b	b	c						
Peso fresco raízes (g)**	0,81	2,94	9,68	8,52	2,46	9,31	17,89	26,47	0,91	1,84	5,67	6,61	2,93	11,65	18,64	25,51						

* Médias seguidas pela mesma letra na linha, para dias dentro de isolado dentro de cultivar, não diferem estatisticamente entre si (Teste Tukey).

** Existência de não homogeneidade entre as parcelas para os tratamentos.

vares, tanto nos inoculados como nos não inoculados. Estes - dois parâmetros não detectaram diferenças significativas entre as diferentes épocas de coleta das plantas inoculadas, para ambos os cultivares. Os parâmetros referentes à parte aérea apresentaram semelhança entre os resultados para os tratamentos inoculados em ambos os cultivares, apresentando as testemunhas crescimentos maiores para os mesmos parâmetros.

Na Tabela 31 consta ainda os dados referentes ao parâmetro peso fresco das raízes, o qual não foi analisado estatisticamente, uma vez que revelou a existência de não homogeneidade entre as parcelas para os tratamentos.

4.4.3. Efeito da época de coleta na porcentagem de redução observada através de diferentes parâmetros

A representação gráfica para a porcentagem de redução das plantas inoculadas em relação à época de coleta é apresentada na Figura 3, para diferentes parâmetros, em dois cultivares de milho.

O cultivar milho Doce de Cuba mostra, para a maioria dos parâmetros, que a porcentagem de redução cresce na medida em que também aumenta a idade da planta, sendo que a variável peso dos sólidos voláteis das raízes apresenta, para a avaliação aos 31 dias, um resultado não relacionado com as demais. O cultivar HMD-7974, ao contrário do anterior, indica que a porcentagem de redução decresce com o aumento da idade da planta, sendo que neste cultivar a variável severidade dos sintomas, embora apresentando uma tendência semelhante às demais para as diferentes épocas de coleta, mostrou menor porcentagem de redução.

De modo geral, para ambos os cultivares, a primeira época de coleta revela uma variação maior nas porcentagens de redução, para diferentes parâmetros, quando comparada

Figura 3. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, na porcentagem de redução causada por *Pythium*, para diferentes parâmetros, em dois cultivares de milho.

com as variações observadas para as demais épocas. A coleta das plantas aos 17 dias, após a inoculação, é mostrada como sendo a que propiciou maior uniformidade entre os resultados para os diferentes parâmetros, principalmente para o cultivar HMD-7974.

4.5. Efeito da variabilidade de isolados do patógeno no desenvolvimento das plantas

Os dados referentes à temperatura do ambiente da casa-de-vegetação e do solo dos vasos, durante o transcorrer do experimento, constam da Figura 7 (Apêndice).

4.5.1. Parâmetros utilizados na avaliação da variabilidade do patógeno

O efeito da variabilidade de isolados de *Pythium*, em dois cultivares de milho, é apresentado na Tabela 32 sob a forma de severidade dos sintomas. Nas Tabelas de 33 a 38, os dados foram interpretados através da análise de variância feita, separadamente, para os seguintes parâmetros: altura da parte aérea; volume das raízes; peso fresco das raízes; peso fresco da parte aérea; peso seco das raízes e peso seco da parte aérea.

Severidade dos sintomas

Uma vez que a severidade dos sintomas não revelou variabilidade entre as parcelas, para alguns tratamentos, não foi feita a análise estatística, sendo apresentadas apenas as médias dos dados originais (Tabela 32).

Nos dois cultivares, a severidade dos sintomas causada no sistema radicular variou em função dos diferentes isolados utilizados. O isolado 4P, no milho Doce de Cuba, causou os sintomas mais severos, enquanto que no híbrido HM cau-

sou os sintomas menos severos quando comparado com outros.

Este parâmetro é comparado com os demais, na Figura 4, na forma de porcentagem de redução.

Altura da parte aérea

A análise para o efeito de isolados dentro de cultivares revelou, para o milho Doce de Cuba, que o isolado 4P reduziu significativamente a altura da parte aérea em relação à testemunha, ao passo que nenhum dos isolados, para o caso do cultivar HMD-7974, causou uma redução significativa em relação à testemunha (Tabela 33).

Volume das raízes

A Tabela 34 revela que, para o cultivar milho Doce de Cuba, somente o isolado 4P determinou uma redução significativa no volume das raízes das plantas, sendo que os demais, embora apresentando uma redução em relação à testemunha, não causaram efeitos significativos. Para o cultivar HMD-7974, os isolados B e 3G determinaram os menores volumes dos sistemas radiculares, ao passo que o isolado 4P foi o que causou menor redução no volume das raízes, aproximando-se dos resultados obtidos para a testemunha.

Peso fresco das raízes

O parâmetro peso fresco das raízes (Tabela 35) revela, para o cultivar milho Doce de Cuba, que o isolado 4P foi o único que causou significativos danos às raízes em relação à testemunha. No cultivar HMD-7974, o isolado 3G foi o que provocou maior quantidade de danos, diferindo significativamente do isolado 4P, que causou a menor quantidade de danos as raízes, chegando este a não diferir significativamente da testemunha.

Tabela 33. Efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* na altura da parte aérea (cm) de plantas dos cultivares Milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	I S O L A D O									
	A	B	D	F	1G	1P	2P	3G	4P	5G Test.
DC	11,93*	12,25	10,03	12,55	11,83	11,35	10,20	11,40	7,20	10,85 14,00a
	ab**	ab	ab	b	ab	ab	ab	ab	a	ab. b
HM	12,93	13,05	14,23	13,98	12,83	12,90	11,90	11,70	15,85	13,20 16,10a
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a a

* Média de quatro repetições, cada uma constituída da média de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (I/C) ou coluna (C/I) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV(%) = 15,07

DMS (1%) = 5,19 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 3,53 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 34. Efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* no volume das raízes (cm³) - de plantas dos cultivares Milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	I S O L A D O										Test.
	A	B	D	F	1G	1P	2P	3G	4P	5G	
DC	10,96* ab**	10,47 ab	6,64 ab	9,97 ab	8,36 ab	8,86 ab	8,40 ab	9,34 ab	4,71 a	8,47 ab	15,31a b
HM	15,30 abc	13,06 a	19,75 abc	18,33 abc	14,12 abc	15,65 abc	14,09 ab	12,66 a	24,46 bc	14,87 abc	24,71b c

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (I/C) ou coluna (C/I) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 29,20

DMS (1%) = 10,59 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 7,20 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 35. Efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* no peso fresco das raízes (g) de plantas dos cultivares Milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	I S O L A D O										Test.
	A	B	D	F	IG	LP	2P	3G	4P	5G	
DC	10,51* ab**	9,65 ab	5,78 ab	9,63 ab	8,02 ab	8,07 ab	7,13 ab	9,49 ab	3,33 a	7,18 ab	13,82a b
HM	14,43 ab	13,37 ab	18,71 ab	18,43 ab	14,50 ab	16,14 ab	14,44 ab	12,13 a	21,94 b	14,00 ab	22,85b b

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (I/C) ou coluna (C/I) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 27,60

DMS (1%) = 9,49 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) 6,45 cultivares dentro de isolado (C/I)

Peso fresco da parte aérea

Considerando o efeito de diferentes isolados dentro do cultivar milho Doce de Cuba, a Tabela 36 mostra que o isolado 4P foi o único cujos danos refletiram na parte aérea de forma significativa com relação à testemunha. No cultivar HMD-7974, os isolados A e 3G é que mostraram maior patogenicidade.

Peso seco das raízes

Os diferentes isolados inoculados no cultivar milho Doce de Cuba não mostraram variações significativas para patogenicidade, considerando o peso seco das raízes (Tabela 37), já, no cultivar HMD-7974, os isolados B, 1G, 2P, 3G e 5G causaram reduções significativamente diferentes em relação à testemunha.

Peso seco da parte aérea

Na Tabela 38, a análise para isolados dentro de cultivar mostra, para o milho Doce de Cuba, que o isolado 4P foi o mais patogênico, diferindo o peso seco da parte aérea das plantas por ele colonizadas, significativamente da testemunha; já, no cultivar HMD-7974, os isolados D, F e 4P foram os menos patogênicos, sendo que os demais foram mais severos e com resultados variando significativamente da testemunha.

4.5.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados

A Tabela 39 apresenta uma síntese dos parâmetros usados para avaliação do efeito da variabilidade de iso-

Tabela 36. Efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* no peso fresco da parte aérea (g) de plantas dos cultivares Milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	I S O L A D O									
	A	B	D	F	LG	LP	2P	3G	4P	5G Test.
DC	11,89*	16,23	9,32	13,49	11,69	11,08	8,51	11,53	4,68	8,80 20,65a
	ab**	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	a	ab b
HM	15,77	16,97	20,79	19,09	16,58	17,67	18,88	13,29	23,97	16,49 29,15a
	a	ab	ab	ab	ab	ab	ab	a	ab	ab b

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (I/C) ou coluna (C/I) não diferem, estatisticamente entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 31,59

DMS (1%) = 13,36 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 9,08 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 37. Efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* no peso seco das raízes (g) - de plantas dos cultivares Milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	I S O L A D O										Test.
	A	B	D	F	1G	1P	2P	3G	4P	5G	
DC	0,83* a**	0,80 a	0,47 a	0,74 a	0,63 a	0,71 a	0,54 a	0,80 a	0,30 a	0,59 a	1,19a a
HM	1,26 ab	1,16 a	1,71 ab	1,49 ab	1,03 a	1,30 ab	1,10 a	0,99 a	1,79 ab	1,10 a	2,16b b

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (I/C) ou coluna (C/I) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 32,82

DMS (1%) = 0,94 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 0,64 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 38. Efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* no peso seco da parte aérea -
(g) de plantas dos cultivares Milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	I S O L A D O									
	A	B	D	F	1G	1P	2P	3G	4P	5G Test.
DC	1,08* ab**	1,56 ab	0,89 ab	1,26 ab	1,21 ab	1,04 ab	0,81 ab	1,11 ab	0,44 a	0,89 ab 2,06a b
HM	1,55 a	1,60 a	1,88 ab	1,92 ab	1,61 a	1,79 a	1,78 a	1,34 a	2,44 ab	1,79 a 3,22b b

* Média de quatro repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (I/C) ou coluna (C/I) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 34,20

DMS (1%) = 1,43 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 0,97 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 39. Apresentação geral dos parâmetros de avaliação para o efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* em dois cultivares de milho inoculados e não inoculados.

Parâmetros	Cultivar Milho Doce de Cuba										Cultivar HMD-7974										DS CV (%) (1)		
	Isolados										Isolados												
	A	B	D	F	IG	LP	2P	3G	4P	5G	Test.	A	B	D	F	IG	LP	2P	3G	4P		5G	Test.
Altura P. aérea (cm)	11,93 ab*	12,25 ab	10,03 ab	12,55 b	11,83 ab	11,35 ab	10,20 ab	11,40 ab	7,20 a	10,85 ab	14,00 b	12,93 a	13,05 a	14,23 a	13,98 a	12,83 a	12,90 a	11,90 a	11,70 a	15,85 a	13,20 a	16,10 a	5,19 15,07
Volume raízes (cm³)	10,96 ab	10,47 ab	6,64 ab	9,97 ab	8,36 ab	8,86 ab	8,40 ab	9,34 ab	4,71 a	8,47 ab	15,31 b	15,30 abc	13,06 a	19,75 abc	18,33 abc	14,12 abc	15,65 abc	14,09 ab	12,66 a	24,46 bc	14,87 abc	24,71 c	10,59 29,20
Peso fresco raízes (g)	10,51 ab	9,65 ab	5,78 ab	9,63 ab	8,02 ab	8,07 ab	7,13 ab	9,49 ab	3,33 a	7,18 ab	13,82 b	14,43 ab	13,37 ab	18,71 ab	18,43 ab	14,50 ab	16,14 ab	14,44 ab	12,13 a	21,94 b	14,00 ab	22,85 b	9,49 27,60
Peso fresco P. aérea (g)	11,89 ab	16,23 ab	9,32 ab	13,49 ab	11,69 ab	11,08 ab	8,51 ab	11,53 ab	4,68 a	8,80 ab	20,65 b	15,77 a	16,97 ab	20,79 ab	19,09 ab	16,58 ab	17,67 ab	18,88 ab	13,29 a	23,97 ab	16,49 ab	29,15 b	13,36 31,59
Peso seco raízes (g)	0,83 a	0,80 a	0,47 a	0,74 a	0,63 a	0,71 a	0,54 a	0,80 a	0,30 a	0,59 a	1,19 a	1,26 ab	1,16 a	1,71 ab	1,49 ab	1,03 a	1,30 ab	1,10 a	0,99 a	1,79 ab	1,10 a	2,16 b	0,94 32,82
Peso seco P. aérea (g)	1,08 ab	1,56 ab	0,89 ab	1,26 ab	1,21 ab	1,04 ab	0,81 ab	1,11 ab	0,44 a	0,89 ab	2,06 b	1,55 a	1,60 a	1,88 ab	1,92 ab	1,61 a	1,79 a	1,78 a	1,34 a	2,44 ab	1,79 a	3,22 b	1,43 34,20

* Médias seguidas pela mesma letra na linha, para isolados dentro de cultivar, não diferem estatisticamente entre si (Teste Tukey).

lados de *Pythium* em dois cultivares de milho inoculados e não inoculados.

Considerando isolados dentro do cultivar milho Doce de Cuba, é mostrado que o parâmetro peso seco das raízes foi o único que não apresentou variação significativa entre a testemunha e todos os isolados. Todos os demais parâmetros de tectaram diferença significativa entre a testemunha e o isolado 4P. Considerando os isolados dentro do cultivar HMD-7974, o parâmetro altura da parte aérea não detectou diferença significativa entre a testemunha e os demais isolados, sendo que todos os demais parâmetros mostraram diferença significativa entre a testemunha e o isolado 3G.

Na Tabela 39, é possível ainda, verificar que os isolados de *Pythium* testados se comportam diferentemente - quanto a sua patogenicidade, dependendo do cultivar utilizado.

4.5.3. Efeito da variabilidade de isolados do patógeno na porcentagem de redução

A Figura 4 representa graficamente a porcentagem de redução das plantas de dois cultivares de milho, quando inoculados com 10 isolados de *Pythium*, separadamente, para diferentes parâmetros de avaliação.

A maior patogenicidade em plantas do cultivar milho Doce de Cuba, considerando os diferentes parâmetros, foi causada pelos isolados D e 4P, sendo que a menor severidade da doença foi representada pelos isolados A, B, F e 3G. No cultivar HMD-7974, maior severidade da doença é mostrada em plantas inoculadas com os isolados A, B e 3G e a menor patogenicidade foi a apresentada pelo isolado 4P.

Os parâmetros volume de raízes e os pesos das raízes e da parte aérea mostram uma tendência semelhante, considerando a maioria dos isolados para cada cultivar separadamente. A severidade dos sintomas revela uma menor porcentagem

Figura 4. Efeito da variabilidade de isolados de *Pythium* na porcentagem de redução, para diferentes parâmetros, em dois cultivares de milho.

de redução, sendo que a altura da parte aérea foi o menos sensível dos parâmetros, apresentando as menores porcentagens de redução.

4.6. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium*

Os dados referentes à temperatura do ambiente da casa-de-vegetação e do solo dos vasos, durante o transcorrer do experimento, constam da Figura 7 (Apêndice).

4.6.1. Parâmetros utilizados para a avaliação da reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium*

A reação de cultivares de milho a dois isolados de *Pythium* é apresentada na Tabela 40, sob a forma de severidade dos sintomas. Nas Tabelas de 41 a 46 o experimento foi interpretado através da análise de variância feita, separadamente, para os seguintes parâmetros: emergência; altura da parte aérea; volume das raízes; peso fresco das raízes; peso fresco da parte aérea; peso seco das raízes e peso da parte aérea.

Severidade dos sintomas

Visto que a avaliação pela severidade dos sintomas não revelou variabilidade entre as parcelas para alguns tratamentos, a análise estatística não foi feita; sendo apresentadas apenas as médias dos dados originais (Tabela 40).

Este parâmetro revelou que a severidade da doença variou consideravelmente nos diferentes tratamentos em função dos cultivares e isolados.

Este mesmo parâmetro é comparado com os demais, na Figura 5, na forma de porcentagem de redução.

Tabela 40. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* na forma de severidade dos sintomas.

Isolado	C U L T I V A R							
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP
D	2,33**	2,00	1,67	1,33	1,67	2,00	1,75	3,00
4P	2,33	2,33	2,33	2,00	2,33	2,00	4,00	4,00
Test.	0,33	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,33	0,00

* Escala de notas onde "0" representa planta sadia e "4" representa planta morta.

** Média de três repetições, cada uma constituída de duas plantas.

Emergência

Considerando isolados dentro de cultivar, a Tabela 41 não revela qualquer diferença na emergência de plântulas para os cultivares, quando inoculados com os isolados D e 4P de *Pythium*, em comparação com os tratamentos não inoculados. Os dados originais constam da Tabela 49 (Apêndice).

Altura da parte aérea

A medida da altura da parte aérea (Tabela 42), para isolados dentro de cultivar, mostra que os cultivares CB, AP, VD e VF quando inoculados com os dois isolados de *Pythium*, não apresentaram diferenças significativas em comparação com as respectivas testemunhas. Já os cultivares HM e PP mostraram-se altamente suscetíveis ao isolado 4P, sendo que ambos os cultivares inoculados com os dois isolados cresceram significativamente menos que as respectivas testemunhas. O cultivar DC, embora se comportando de maneira semelhante para os dois isolados, mostrou diferenças significativas entre as plantas inoculadas e não inoculadas.

Volume das raízes

A Tabela 43 revela os cultivares DC, HM e PP como sendo aqueles que apresentaram os menores volumes para os sistemas radiculares, quando comparados com as respectivas testemunhas não inoculadas. Os cultivares CB e AP não chegaram a sofrer significativos danos, quando inoculados com ambos os isolados de *Pythium*. Já os cultivares CA, VD e VF mostraram uma suscetibilidade maior ao isolado 4P que ao isolado D.

Tabela 41. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* quanto a emergência de plântulas.

Isolado	C U L T I V A R									
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP		
D	1,79*a**	2,44a	2,44a	2,29a	2,52a	2,31a	1,90a	1,52a		
4P	2,16 a	2,28a	2,37a	2,16a	2,52a	2,31a	1,38a	1,24a		
Test.	2,37a	2,51a	2,38a	2,30a	2,65a	2,58a	1,90a	1,99a		
	a	a	a	a	a	a	a	a		

* Média de três repetições, baseada na transformação raiz quadrada da emergência

** Médias seguidas da mesma letra na linha (C/I) ou coluna (I/C) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV(%) = 13,45

DMS (1%) = 0,91 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 0,74 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 42. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* quanto a altura da parte aérea (cm).

Isolado	C U L T I V A R									
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP		
D	14,20*a**	15,20ab	17,00a	14,87a	14,93a	13,37a	13,83b	10,87b		
4P	13,10a	12,03a	14,33a	13,53a	12,10a	13,03a	1,60a	1,77a		
Test.	18,53b ab	16,93b ab	17,50a ab	14,27a a	15,37a ab	15,10a ab	19,50c b	17,20c ab		

* Média de três repetições, cada uma constituída da média de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (C/I) ou coluna (I/C) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (1%) = 12,16

DMS (1%) = 5,21 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 4,22 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 43. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* quanto ao volume das raízes (cm³).

Isolado	C U L T I V A R									
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP		
D	7,77*a**	15,30ab	17,84a	17,33a	14,42ab	15,42ab	5,88a	3,46a		
4P	9,22a	7,94a	12,35a	13,18a	10,25a	9,11a	1,00a	1,00a		
Test.	18,25b	20,09b	19,85a	16,60a	20,66b	18,42b	17,78b	13,37b		
	a	a	a	a	a	a	a	a		

* Média de três repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (C/I) ou coluna (I/C) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 27,26

DMS (1%) = 10,83 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 8,78 cultivares dentro de isolado (C/I)

Peso fresco da parte aérea

Os dados da Tabela 44 mostram que os cultivares CB e AP foram os únicos que não apresentaram diferenças entre os tratamentos inoculados com os dois isolados de *Pythium* e as testemunhas. Os cultivares HM e PP se mostraram suscetíveis a ambos os isolados, sendo que os cultivares DC, CA, VD e VF apresentaram uma suscetibilidade significativamente maior ao isolado 4P que ao isolado D.

Peso seco das raízes

O peso seco das raízes (Tabela 45) apresenta os cultivares CA, CB, VF, HM e PP mostrando alta suscetibilidade ao isolado 4P quando comparados com as testemunhas. Já os cultivares AP e VD não apresentaram diferenças significativas quando comparados os tratamentos inoculados com as testemunhas. O cultivar DC mostrou maior suscetibilidade ao isolado D, para este parâmetro.

Peso seco da parte aérea

A Tabela 46 mostra o cultivar AP não variando significativamente da testemunha, quando inoculado com os isolados D e 4P de *Pythium*. Os demais cultivares apresentaram maior suscetibilidade ao isolado 4P que ao isolado D.

4.6.2. Apresentação geral dos resultados obtidos para os parâmetros utilizados

A Tabela 47 apresenta uma síntese dos parâmetros usados para a avaliação da reação de cultivares de milho quando inoculados e não inoculados com dois isolados de *Pythium*.

Tabela 44. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* quanto ao peso fresco da parte aérea (g).

Isolado	C U L T I V A R									
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP		
D	14,71*ab**	18,40ab	25,41b	18,82a	21,34ab	21,83ab	9,03a	7,78a		
4P	11,43a	10,85a	14,62a	15,72a	12,37a	12,67a	0,27a	0,29a		
Test.	22,81b a	21,81b a	23,71ab a	21,12a a	24,73b a	25,06b a	27,48b a	23,44b a		

* Média de três repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (C/I) ou coluna (I/C) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 24,08

DMS (1%) = 12,67 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 10,27 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 45. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* quanto ao peso seco das raízes (g).

Isolado	C U L T I V A R									
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP		
D	0,69*a**	1,46ab	1,81ab	1,37a	1,60a	1,71ab	0,68a	0,57ab		
4P	0,89ab	0,77a	1,35a	1,73a	1,36a	1,27a	0,15a	0,08a		
Test.	1,57b	1,93b	2,25b	1,74a	2,05a	2,12b	2,09b	1,38b		
	a	a	a	a	a	a	a	a		

* Média de três repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (C/I) ou coluna (I/C) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 24,47

DMS (1%) = 1,03 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) = 0,84 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 46. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* quanto ao peso seco da parte aérea (g).

Isolado	C U L T I V A R							
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP
D	1,38*ab**	2,07ab	3,29b	1,78a	2,61ab	2,31ab	1,03a	0,91a
4P	1,10a	1,11a	1,85a	1,75a	1,38a	1,02a	0,02a	0,04a
Test.	2,48b	2,72b	2,73ab	2,55a	3,06b	2,98b	3,37b	2,84b
	a	a	a	a	a	a	a	a

* Média de três repetições, cada uma constituída de duas plantas.

** Médias seguidas da mesma letra na linha (C/I) ou coluna (I/C) não diferem, estatisticamente, entre si (Teste Tukey).

CV (%) = 25,60

DMS (1%) = 1,54 isolados dentro de cultivar (I/C)

DMS (1%) 1,25 cultivares dentro de isolado (C/I)

Tabela 47. Apresentação geral dos parâmetros de avaliação para a reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium*.

Parâmetros	C U L T I V A R															
	DC		CA		CB		AP		VD		VF		HM		PP	
	D	Isolados 4p Test.	D	Isolados 4p Test.	D	Isolados 4p Test.	D	Isolados 4p Test.	D	Isolados 4p Test.	D	Isolados 4p Test.	D	Isolados 4p Test.	D	Isolados 4p Test.
Energência (Nº plantas)**	1,79	2,16 2,37	2,44	2,28 2,51	2,44	2,37 2,38	2,29	2,16 2,30	2,52	2,52 2,65	2,31	2,31 2,58	1,90	1,38 1,90	1,52	1,24 1,99
	a*	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a
Altura P. aérea (cm)	14,20	13,10 18,53	15,20	12,03 16,93	17,00	14,33 17,50	14,87	13,53 14,27	14,93	12,10 15,37	13,37	13,03 15,10	13,83	1,60 19,50	10,87	1,77 17,20
	a	a a b	ab a	a b	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	a a a	b a c	b a c	b a c	b a c
Volume raízes (cm³)	7,77	9,22 18,25	15,30	7,94 20,09	17,84	12,35 19,85	17,33	13,18 16,60	14,42	10,25 20,66	15,42	9,11 18,42	5,88	1,00 17,78	3,46	1,00 13,37
	a	a b	ab a	a b	a a a	a a a	a a a	a a a	ab a	a b	ab a	a b	a a b	a a b	a a b	a a b
Peso fresco P. aérea (g)	14,71	11,43 22,81	18,40	10,85 21,81	25,41	14,62 23,71	18,82	15,72 21,12	21,34	15,37 24,73	21,83	12,67 25,06	9,03	0,27 27,48	7,78	0,29 23,44
	ab	a b	ab a	a b	b a b	a a ab	a a a	a a a	ab a	a b	ab a	a b	a a b	a a b	a a b	a a b
Peso seco raízes (g)	0,69	0,89 1,57	1,46	0,77 1,93	1,81	1,35 2,25	1,37	1,73 1,74	1,60	1,36 2,05	1,71	1,27 2,12	0,68	0,15 2,09	0,57	0,08 1,38
	a	ab b	ab a	a b	ab a	a b	a a a	a a a	a a a	a a a	ab a	a b	a a b	a a b	ab a	a b
Peso seco P. aérea (g)	1,38	1,10 2,48	2,07	1,11 2,72	3,29	1,85 2,73	1,78	1,75 2,55	2,61	1,38 3,06	2,31	1,02 2,98	1,03	0,02 3,37	0,91	0,04 2,84
	ab	a b	ab a	a b	b a b	a b	a a a	a a a	ab a	a b	ab a	a b	a a b	a a b	a a b	a a b
Peso fresco raízes (g)***	9,18	10,98 20,79	17,83	9,47 23,16	20,10	14,88 22,14	20,35	15,93 11,46	16,29	12,75 23,40	20,98	12,43 21,66	7,93	1,55 20,84	5,55	0,48 15,81

* Médias seguidas pela mesma letra na linha, para isolados dentro de cultivar, não diferem estatisticamente entre si (Teste Tukey).

** Dados transformados em $\sqrt{x}$

*** Existência de não homogeneidade entre as parcelas para os tratamentos.

Considerando isolados dentro de cultivar, é mostrado que o parâmetro emergência foi o único a não conseguir detectar diferenças entre os tratamentos inoculados e as testemunhas, para todos os cultivares. A altura da parte aérea mostrou diferenças entre os tratamentos inoculados e não inoculados para os cultivares DC, HM e PP. O volume de raízes só não conseguiu detectar diferenças significativas entre os tratamentos inoculados e as testemunhas nos cultivares CB e AP. O cultivar AP foi o único a não mostrar diferença significativa entre os tratamentos inoculados e não inoculados com *Pythium* para todos os parâmetros. O peso seco das raízes só não conseguiu mostrar diferenças entre tratamentos inoculados e testemunhas nos cultivares AP e VD.

Na Tabela 47 consta, ainda, os dados referentes ao parâmetro peso fresco das raízes, o qual não foi analisado estatisticamente, uma vez que revelou a existência de não homogeneidade entre as parcelas para os tratamentos.

4.6.3. Efeito da reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* na porcentagem de redução

A Figura 5 representa graficamente a porcentagem de redução das plantas de 8 cultivares de milho para diferentes parâmetros de avaliação, quando inoculados com os isolados D e 4P de *Pythium*, separadamente.

Quando inoculados com o isolado 4P, as maiores porcentagens de redução ocorreram para os cultivares HM e PP e as menores quantidades de danos foi para o cultivar AP. O isolado D, quando inoculado, provocou os maiores danos nos cultivares DC, HM e PP, considerando os diferentes parâmetros de avaliação; sendo que os cultivares CB, AP e VD foram os que apresentaram maior resistência.

O parâmetro altura da parte aérea apresentou pouca sensibilidade para mostrar diferenças entre plantas inoculadas e não inoculadas. A emergência foi a menos sensível

Figura 5. Porcentagem de redução, para diferentes parâmetros, na reação de cultivos de milho a dois isolados de *Pythium*.

mostrando, em alguns casos, não detectar diferenças entre os tratamentos inoculados e os não inoculados.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização taxonômica do patógeno

Em função da variabilidade e da ambigüidade dos caracteres morfológicos, o gênero *Pythium* apresenta sérias dificuldades no que se refere à classificação taxonômica das espécies.

A impossibilidade de se ter em mãos um critério prático e padronizado, principalmente na área aplicada, tem levado muitos pesquisadores a errôneas conclusões e demoradas polêmicas.

Os dez isolados estudados no presente trabalho, obtidos de lesões em raízes de plantas de milho, apresentaram os resultados constantes no item 4.1. Eles apresentaram caracteres tais como: hábito de crescimento exibindo escasso micélio aéreo, sendo no geral, radial denso; presença de esporângios lobulados; dimensão média dos oogônios em torno de 25,7µm de diâmetro com mínimo de 20,9 e máximo de 30,9µm (Tabela 1); temperatura de crescimento ótimo entre 30 e 35°C (Tabela 2); presença de oogônios predominantemente terminais; número de anterídios variando de 1 a 6 (normalmente 1 ou 2), sendo monóclinos com maior frequência (típico de *Pythium graminicolum* Subramaniam); oosporos viáveis, normalmente pleróticos; presença de considerável número de oosporos abortivos (típico

de *Pythium arrhenomanes* (Drechsler).

Segundo MIDDLETON (1943), *P. graminicolum* e *P. arrhenomanes*, quando observados microscopicamente e quando considerados em relação às temperaturas de crescimento, são indistinguíveis entre si. Porém, os dados de temperatura obtidos no presente trabalho aproximam-se dos dados mencionados por PLAATS-NITERINK (1981) para *P. graminicolum*. Os resultados relativos às dimensões dos oogônios enquadram-se, segundo a maioria dos autores, dentro das características de *P. graminicolum*. Porém, muitas dessas estruturas apresentaram medidas típicas de *P. arrhenomanes* visto possuírem dimensões comuns. Outros parâmetros observados como a relação entre oosporos abortivos e não abortivos; pleróticos e apleróticos; origem anteridial e número de anterídios; oogônios intercalares e terminais e tipos de esporângios, não conferem muita precisão e têm valor relativo para diferenciar as duas espécies, segundo BIESBROK e HENDRIX (1967), VAARTAJA (1967) e HENDRIX e CAMPBELL (1974). DRECHSLER (1936) reportou, como caráter diferenciador das espécies, o aspecto relativo à distância da origem dos anterídios em relação ao oogônio.

WATANABE (1974) considerou que essas duas espécies são mais ou menos idênticas morfológicamente e, em função de resultados comuns obtidos em dois dos isolados por ele estudados, concluiu pelo enquadramento dos espécimes em um complexo denominado *Pythium graminicolum* - *Pythium arrhenomanes*. Critério análogo foi adotado por HENDRIX e PAPA (1974), que enquadraram essas duas espécies em um complexo, juntamente com outras 13 do gênero *Pythium*, incluindo, por exemplo *P. aphanidermatum* que também é patógeno de gramíneas, porém, causando predominantemente sintomatologia bastante característica de podridão do colmo. Deve ser salientado que Hendrix e Papa, pela extensa experiência e manuseio de grande número de espécimes, tinham uma visão mais ampla das variações. Ao contrário, Watanabe trabalhou com número restrito de isolados oriundos de apenas uma cultura.

Considerando que nenhuma das características observadas é taxativa para a determinação a nível específico, optou-se pela utilização do complexo. Assim sendo, preferiu-se usar o sensu WATANABE (1974) ao sensu HENDRIX e PAPA (1974), por aquele refletir, mais fielmente, as características dos isolados apresentados no presente trabalho.

5.2. Desinfecção de sementes de milho

O emprego de acetona como veículo para fungicidas sistêmicos tem sido feito no tratamento de sementes visando a erradicação de *F. moniliforme*, com sucesso (O'NEILL *et al.*, 1979 e DAMICONE *et al.*, 1981).

A análise dos dados constantes da Tabela 3 mostra que o fungicida benomyl, quando veiculado por acetona, proporcionou, em altas concentrações, uma erradicação eficaz de *F. moniliforme* de sementes de milho, porém, reduziu drasticamente, em todas as concentrações, a porcentagem de germinação. O fato do tratamento com acetona, sem fungicida, por 24 horas, apresentar um comportamento semelhante, segue, então, que este veículo funciona interferindo negativamente na germinação de sementes de milho. DAMICONE *et al.* (1981), usando benomyl na tentativa de erradicação do mesmo fungo em sementes de aspargo pelo mesmo processo, chegaram a resultados opostos, concluindo que a porcentagem de germinação e a eficiência na erradicação do fungo estavam diretamente relacionadas com o aumento da concentração do fungicida veiculado por acetona; o trabalho ainda mostra que benomyl, quando veiculado pela água, apresentou resultados inferiores.

Por outro lado, quando veiculado por água, em alta concentração, o benomyl acarretou uma redução na porcentagem de germinação com relação à testemunha, indicando, assim, fitotoxidez inerente ao produto, tenha sido evitado o abastecimento do patógeno (Tabela 3).

O fato da acetona condicionar uma penetração

mais profunda dos fungicidas sistêmicos ethazol e carboxin nas sementes de soja e algodão, faz com que sua remoção posterior, através de lavagens, seja dificultada segundo O'NEILL *et al.* (1979); porém, DAMICONE *et al.* (1981) trataram sementes de aspargo durante 24 horas e, a seguir, procederam à lavagem das mesmas com água estéril, reportando os autores a eficiência deste procedimento na remoção dos resíduos de benomyl. O fato dos trabalhos mencionados se referirem às sementes e fungicidas diferentes pode naturalmente estar suscitando conclusões não coincidentes.

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que tratamentos nas concentrações inferiores a 500mg/l não interferem no processo de germinação mesmo por longos períodos de contato do fungicida com as sementes. Porém, a eficiência na desinfecção, abaixo deste nível, é visivelmente diminuída.

Os dados da Tabela 5 determinam o tempo mínimo de tratamento a que devem ser submetidas as sementes de milho tratadas com benomyl a 500mg/l, visando evitar o aparecimento de *F. moniliforme*.

Embora tenha-se evitado o aparecimento de *F. moniliforme* de sementes de milho, uma vez que não foi possível isolar o fungo de sementes tratadas, DANIELS (1983) resalta que mesmo não sendo constatado na semente tratada com benomyl, após a germinação desta, o fungo pode ser frequentemente isolado a partir de plântulas se desenvolvendo em condições assépticas, sugerindo assim um efeito fungistático do produto em ação no interior das sementes. Porém, no presente trabalho, após a germinação das sementes tratadas nas placas contendo meio de batata-cenoura-agar, partes da plântula tocavam o meio, não tendo sido verificado qualquer crescimento do fungo.

Com relação ao tratamento de sementes de milho utilizando o hipoclorito de sódio, os dados constantes da Tabela 3 mostraram a ineficácia do processo na erradicação do fungo, embora não tenha interferido na porcentagem de germina

ção. Tal resultado ratifica o relatado por ANDEREG e GUTHRIE (1981) e DANIELS (1983). Por outro lado, EL-MELEIGI *et al.* (1981) utilizaram hipoclorito de sódio a 1% mais etanol a 59% a altas temperaturas e curtos períodos de exposição para erradicar, com sucesso, o *F. miniliforme* de sementes de milho, o qual sugerem estar localizado nas aberturas naturais e ferimentos do pericarpo. Por outro lado, SALAMA e MISHIRICKY (1973) demonstraram que o fungo ocupa as partes internas das sementes e que um tratamento superficial, portanto, era ineficaz, salientando, porém, que tratamentos térmicos poderiam surtir efeito positivo, e isto foi confirmado por EL-MELEIGI *et al.* (1981) e DANIELS (1983).

5.3. Metodologia geral empregada nos testes de patogenicidade

As condições utilizadas visando realizar os testes de patogenicidade com *Pythium*, em milho, em condições de casa-de-vegetação, mostraram-se adequadas. Os vasos empregados (Figura 1), com orifício lateral de drenagem, minimizaram as contaminações, que são freqüentes em recipientes com furos na parte inferior dos mesmos. A utilização de tais vasos revelou maior praticidade que o sistema empregado por KOIKE e YANG (1971), que utilizaram uma placa-de-petri invertida para evitar o contato do vaso, com furo na parte inferior, e o balcão.

O substrato utilizado para manutenção das plantas, constituído de areia lavada e autoclavada, revelou-se propício para o teste, conforme já havia sido preconizado por ELLIOTT (1942) e HALPIN e HANSON (1958). Assim sendo, a coleta foi facilitada proporcionando a remoção eficiente, pela água, das partes sólidas que ficam aderidas às raízes. Isto fez com que os sintomas fossem melhor visualizados (Figura 1G) para a avaliação dos índices de doença, e os parâmetros

relacionados com pesos das raízes sofressem menor influência dos resíduos sólidos.

As temperaturas mantidas na casa-de-vegetação, durante o transcorrer dos experimentos, evidenciadas nas Figuras 6 e 7, se revelaram adequadas para a obtenção de resultados, em função dos objetivos propostos. Essas mesmas temperaturas médias, em torno de 24-25°C, foram empregadas com sucesso por HOOKER (1956b) quando testou a patogenicidade de *P. graminicola* em 25 variedades de milho e também por PRATT e JANKE (1980) trabalhando com o mesmo fungo em plantas de sorgo. Como mostram as referidas figuras, embora as temperaturas máximas e mínimas do ambiente sofressem variações mais bruscas que as temperaturas no interior dos vasos, as temperaturas médias seguiram comportamentos semelhantes, conforme já havia sido observado por RANDS e DOPP (1934).

O substrato utilizado para a produção do inóculo, constituído de quirera de milho-areia e água, foi satisfatório e já havia sido empregado anteriormente por PRATT e JANKE (1980) para *P. graminicolum* em trabalho com sorgo e por VALDEBENITO (1982) para *P. arrhenomanes* em trabalho com cana-de-açúcar. A redução na quantidade de quirera na areia para 2,5% (peso/peso), em relação a usada por VALDEBENITO (1982), foi aconselhável, visto que, em testes experimentais, o alto teor de substrato orgânico favorecia, quando inoculado nos vasos, a incidência de saprófitas, que mascaravam os resultados tanto nos tratamentos inoculados como nas testemunhas. - Proporção semelhante já havia sido utilizada por PRATT e JANKE (1980). A manutenção dos frascos para a incubação, à temperatura de 25°C, durante 16 dias no escuro, propiciou uma colonização satisfatória do substrato. O crescimento micelial foi quase imperceptível, quando observado externamente, provavelmente em função da baixa quantidade de matéria orgânica constituída somente pela quirera presente na areia dos frascos contendo a cultura do patógeno.

A mistura, através de agitação em sacos plásticos, do conteúdo dos frascos inoculados com areia autoclavada, durante dois minutos, resultou numa homogeneização satisfatória. A ausência de contato direto das sementes com a camada de inóculo conseguida por uma camada de 3 cm de areia autoclavada depositada sobre o substrato contendo o inóculo, permitiu que ocorresse a emergência de plântulas, possibilitando a continuação dos experimentos, concordando com o que já havia sido descrito por BUCHHOLTZ (1942) e FORBES *et al.* (1981). No presente trabalho, no entanto, ocorreu uma alta incidência de "Damping-off", conforme pode ser visualizado na Tabela 7 referente ao parâmetro emergência.

As sementes de milho utilizadas em todos os experimentos foram tratadas com benomyl, segundo a metodologia desenvolvida no presente trabalho (Item 3.2.), mostrando-se bastante eficaz este tratamento, uma vez que não foi detectada qualquer incidência de *F. moniliforme*, considerando observações e isolamentos feitos nas plantas testemunhas, em todos os ensaios.

Os critérios de avaliação para as doenças causadas no sistema radicular de plântulas de milho, por fungos do gênero *Pythium*, são os mais diversos. Os vários pesquisadores que publicaram trabalhos tratando do assunto, adotaram um ou mais parâmetros sem, contudo, estabelecer comparações entre os mesmos.

É demonstrado no presente trabalho, que o parâmetro emergência de plântulas, embora apresentando baixo coeficiente de variação, (Tabelas 7 e 41) não detectou diferenças significativas entre os vários tratamentos, portanto demonstrou baixa sensibilidade nas condições em que foi realizado o teste. PRATT e JANKE (1980) utilizando, entre outros, o parâmetro emergência para avaliação de cultivares de sorgo, em condições de casa-de-vegetação, a *P. graminicola*, não aconselha o emprego deste critério, sugerindo como mais confiável

a tomada do peso fresco das raízes. Isto, segundo comentários de FORBES *et al.* (1981), aparece quando as sementes são localizadas entre distâncias de 1 e 4cm da camada de inóculo, podendo ocorrer diferentes níveis de "Damping-off" tanto em pré como em pós emergência.

A exemplo da emergência, a altura da parte aérea, utilizada por HASKETT e MURPHY (1953), também apresentou menor coeficiente de variação, porém, a altura de plantas inoculadas pouco diferiram da altura de plantas testemunha. FORBES *et al.* (1981) utilizaram, entre outros, os parâmetros comprimento das folhas e das raízes para testar variedades de sorgo a *P. graminicola* em condições de casa-de-vegetação. Esses critérios são criticáveis, pois a altura da parte aérea ou o comprimento das raízes não reflete a massa ou o volume do órgão considerado, o que pode ser argumentado também para o caso das folhas em que o comprimento não reflete nem o peso e nem a superfície da mesma.

A medida do volume do sistema radicular não é referida como critério de avaliação para podridão de raízes de milho a *Pythium*. Este método sofre limitações comuns aos pesos fresco e seco das raízes, que são as partículas de matéria orgânica e de areia que ficam retidas na malha radicular, agravada, no caso de peso fresco, pela dificuldade de se enxugar o excesso de água sem iniciar o processo de secamento das raízes mais finas. A determinação de volume tem limitações no que se refere a equipamento de precisão para sua determinação, além do que é extremamente moroso.

Os pesos fresco e seco das raízes, utilizados com mais frequência por vários pesquisadores (SUMMERS, 1952; HASKETT e MURPHY, 1953; PRATT e JANKE, 1980 e FORBES *et al.*, 1981), apresentam os inconvenientes já mencionados, ou seja, além das raízes propriamente ditas, são pesados, também, excesso de água e partículas de matéria orgânica e de areia, acarretando imprecisão ao método.

Os pesos fresco e seco da parte aérea, de acor

do com os resultados obtidos no presente trabalho, principalmente no experimento referente a reação de cultivares de milho, foram os mais sensíveis de todos; apresentando coeficientes de variação razoáveis, em confronto com os demais parâmetros. O peso fresco da parte aérea representa, principalmente, um sistema rápido de avaliação, não sofrendo as interferências mencionadas para avaliações relacionadas às raízes que acarretam imprecisão. O critério peso seco de toda a planta, baseado na porcentagem de redução das plantas inoculadas em relação às testemunhas, é recomendado por ERWIN e CAMERON (1957), que o utilizaram para avaliação de resistência de variedades de milho doce a *P. graminicola* em condições de casa-de-vegetação. No presente trabalho optou-se pela separação das plantas em parte aérea e sistema radicular, tal como já havia sido feito por ELLIOTT (1942).

Avaliações através dos pesos de sólidos voláteis das raízes e da parte aérea, feitas a fim de eliminar as causas de imprecisão dos pesos frescos e secos, não apresentaram vantagens em função das dificuldades inerentes à metodologia.

O critério de severidade dos sintomas, embora empírico, foi utilizado por HOOKER (1953a, 1953b, 1956a e 1956b) e RAO *et al.* (1978) para avaliar podridão em raízes de plântulas de milho em condições de casa-de-vegetação. Tal critério tem a vantagem da alta praticabilidade e rapidez, sendo que no presente trabalho os resultados foram razoáveis quando comparados com os demais parâmetros.

De forma geral, a eficiência dos diferentes critérios de avaliação na discriminação entre os tratamentos variou segundo as finalidades ou objetivos dos experimentos.

5.4. Efeito do potencial de inóculo no substrato, demonstrado no desenvolvimento das plantas

Com relação ao efeito do potencial de inóculo no substrato, sobre o desenvolvimento das plantas de milho, houve uma relação direta entre a diminuição da concentração de inóculo e a severidade da doença. Isto concorda com o demonstrado por PRATT e JANKE (1980) que utilizaram três níveis de inóculo de *P. graminicola* em plantas de sorgo. Considerando que para se avaliar podridões de raízes é necessário a evidenciação de sintomas, então, não é aconselhável a utilização de altos potenciais de inóculo, pois isto acarretaria a destruição de todo o sistema radicular, impedindo consequentemente estabelecer comparações.

Considerando-se os dados obtidos através da análise estatística e aqueles referentes à representação gráfica da porcentagem de redução (Figura 2), nota-se para este último caso que os três primeiros níveis de inóculo propiciaram a ocorrência de uma maior porcentagem de redução para a maioria dos parâmetros (ao redor de 65%), ao passo que o último nível proporcionou uma diminuição na severidade de doença nas raízes das plantas com uma consequente diminuição na porcentagem de redução (ao redor de 50% para o milho Doce de Cuba e de 40% para o HMD-7974). Assim sendo, é de conveniência que o nível de inóculo de *Pythium* para milho, a ser empregado em trabalhos em casa-de-vegetação, visando estudos de podridão de raízes, esteja por volta de uma parte do inóculo produzido no substrato de areia-quirera de milho (item 3.5.2.) diluída com 100 partes de areia autoclavada. PRATT e JANKE (1980) utilizaram três potenciais de inóculo para *P. graminicola* em sorgo e recomendaram a concentração ora proposta para os três experimentos seguintes, em condições de casa-de-vegetação, foi utilizada a concentração de inóculo obtida misturando-se 1 parte do frasco de vidro inoculado com 100 partes

de areia autoclavada, sendo obtidos bons resultados.

5.5. Efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, nos danos causados pelo patógeno

O efeito da época de coleta das plantas, após a inoculação, nos danos causados pelo patógeno revela, para a maioria dos parâmetros, que somente as observações feitas para a última época de avaliação diferiram significativamente das demais épocas. Isto é perfeitamente lógico, pois as plantas mesmo doentes continuam a se desenvolver, porém, numa taxa significativamente menor que as testemunhas. Quando analisados, através da porcentagem de redução, os tratamentos inoculados em relação às testemunhas (Figura 3), verifica-se que na segunda época de coleta (17 dias), praticamente todos os parâmetros apresentaram uma tendência para quantidades semelhantes de porcentagens de redução, a não ser o índice de doença, uma vez que este é empírico. HASKETT e MURPHY (1953), testando em condições de casa-de-vegetação os danos causados por *P. graminicola* em raízes de cevada, procederam a coleta das plantas aos 15 dias após a inoculação, que se deu concomitantemente com a semeadura. ERWIN e CAMERON (1957) coletaram plantas de milho inoculadas com *P. graminicola* aos 47 dias após a inoculação, conseguindo determinar altas porcentagens de redução dos tratamentos inoculados em relação às testemunhas. Já, PRATT e JANKE (1980) coletaram aos 14 dias após a inoculação, para avaliar com bons resultados o efeito de *P. graminicola* em raízes de plantas de sorgo inoculadas com idades de 2, 4 e 8 semanas. No presente trabalho, optou-se por coletar as plantas aos 30 dias de idade, pois não ocorrem grandes variações em termos de porcentagem de redução, comparando as três últimas épocas de coleta, além do que os pesos e medidas tomados em plantas maiores implicam em menor erro metodológico.

As representações gráficas para a porcentagem de redução apresentada pelos tratamentos inoculados com *Pythium* em relação às respectivas testemunhas revelam, para os dois cultivares de milho, que a primeira época de coleta foi a que mostrou maior discrepância entre os diferentes parâmetros analisados estatisticamente. Já, da segunda época de coleta em diante, os resultados das porcentagens de redução mostraram tendências semelhantes para a maioria dos parâmetros.

A comparação entre os diferentes critérios de avaliação em relação às épocas de coleta das plantas de dois cultivares de milho, quando inoculados com *Pythium*, revela que, dentro de cada cultivar, os parâmetros referentes à parte aérea apresentaram resultados que indicam um comportamento semelhante em relação às épocas de coleta consideradas. Já os parâmetros referentes às raízes não detectaram diferenças significativas entre as várias épocas. O parâmetro peso fresco da parte aérea foi o único em que as testemunhas de ambos os cultivares mostraram diferenças significativas entre todas as épocas de coleta.

5.6. Efeito da variabilidade de isolados do patógeno no desenvolvimento das plantas

Os resultados do estudo da variabilidade na patogenicidade entre os isolados de *Pythium*, apresentados na Tabela 39, propiciaram detectar, dependendo do critério de avaliação, a existência de patogenicidade significativamente diferente entre os isolados de *Pythium* obtidos em lesões, em raízes de plantas de milho. A literatura apresenta poucas referências sobre o assunto. Um estudo sobre especialização de *P. graminicola* foi feito por HAMPTON (1957), que trabalhou com isolados provenientes de lesões em raízes de várias gramineas, entre elas o milho, realizando inoculações cruzadas, o autor concluiu que os isolados obtidos em milho foram mais pa-

togênicos à própria cultura, sendo que os outros isolados se comportaram da mesma maneira com seus respectivos hospedeiros. O isolado 4P, neste experimento, apresentou-se como o mais patogênico ao cultivar milho Doce de Cuba, no entanto, para o cultivar HMD-7974 foi o menos patogênico. Considerando que para a maioria dos parâmetros avaliados não ocorreram diferenças significativas, segue, então, que os isolados estudados no presente trabalho variam em patogenicidade, porém, não significativamente.

5.7. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium*

Os resultados das avaliações para reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* revelaram que, para a maioria dos parâmetros avaliados, os cultivares Pirapoca e DC mostraram-se como sendo os mais suscetíveis a ambos os isolados. O cultivar PP foi significativamente mais afetado que o cultivar composto B, inoculados com o isolado D quando comparados com suas respectivas testemunhas. Os cultivares composto B e o composto Amplo se mostraram significativamente mais resistente que o Pirapoca, quando inoculados com os dois isolados em questão, em confronto com as respectivas testemunhas. O cultivar HMD-7974 se comportou de maneira semelhante ao cultivar Pirapoca para a maioria dos parâmetros avaliados, porém, deve ser considerado que as sementes do HMD-7974 utilizadas neste experimento foram as remanescente do ano anterior, o que deve ter provavelmente influido na diminuição da resistência. Quanto à germinação, os resultados indicam que o HMD-7974 não mostrou qualquer variação, considerando-se o tratamento testemunha quando comparado aos demais cultivares onde foram empregadas sementes colhidas no ano (Tabela 47).

A resistência de cultivares de milho a *P. graminicolum* tem sido freqüentemente detectada em plântulas, em condições de casa-de-vegetação. HO e KOEPPER (1942) trabalharam em linhagens, variedades, híbridos simples e híbridos du-

plos, visando obter respostas das plântulas frente a *P. graminicola*, em condições de casa-de-vegetação. Assim, foram determinados diferentes níveis, desde altamente resistentes até altamente suscetíveis. Diferenças altamente significativas de comportamento entre linhagens de milho a *P. graminicola* foram detectadas por HOOKER (1956b), em condições de casa-de-vegetação. Nas mesmas condições, ERWIN e CAMERON (1957) estudaram as respostas de 5 variedades de milho doce a *P. graminicola*, encontrando variações nos níveis de resistência e de tolerância ao patógeno. Dessa forma, as condições em que foi desenvolvido o presente experimento, propiciaram a detecção de níveis de resistência ao *Pythium* em plântulas de cultivares de milho.

Considerando isolados dentro de cultivar para a análise da reação de diferentes cultivares, os parâmetros peso fresco e seco da parte aérea (Tabelas 44 e 46) foram os parâmetros mais sensíveis, pois detectaram diferenças entre os tratamentos inoculados e não inoculados para todos os cultivares, excluindo o cultivar AP, que por sua vez se mostrou como o cultivar mais resistente entre todos os testados. O cultivar HM, ainda que tenha se comportado de maneira semelhante ao DC e PP, neste experimento, há que se considerar - que em outros experimentos ele mostrou boa resistência. A justificativa é que no presente ensaio, exclusivamente para esse cultivar, foram utilizadas sobras de sementes do ano anterior, o que pode sugerir uma diminuição da resistência.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, nas condições do presente trabalho, pode-se extrair as seguintes conclusões:

1. Os patógenos do gênero *Pythium* isolados de lesões em raízes de plantas de milho pertencem ao complexo *Pythium graminicolum* - *Pythium arrhenomanes* sensu WATANABE, 1974.

2. O tratamento de sementes de milho, durante 4 horas, com benomyl em solução aquosa à concentração de 500 mg/l evita o aparecimento de *Fusarium moniliiforme* de sementes naturalmente contaminadas, quando após o tratamento, estas são colocadas em placas-de-petri contendo meio de batata-cenoura-agar.

3. O efeito da concentração do inóculo, do complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes*, no desenvolvimento das plantas pode ser detectado através dos parâmetros altura da parte aérea e volume das raízes.

4. Em diferentes períodos após a inoculação, isolado do complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes* influi diferentemente no desenvolvimento das plantas de milho, quando avaliadas através dos parâmetros peso fresco da parte aérea, peso seco da parte aérea e peso dos sólidos voláteis da parte aérea.

5. Os isolados do complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes* variam quanto à patogenicidade, dependendo do cultivar, para avaliações feitas através dos parâmetros altura da parte aérea, peso fresco da parte aérea, peso fresco das raízes, volumes das raízes, peso seco da parte aérea e peso seco das raízes.

6. Os cultivares de milho variam quanto à suscetibilidade aos isolados do complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes*, para avaliações feitas através dos parâmetros altura da parte aérea, peso fresco da parte aérea, volume de raízes, peso seco da parte aérea e peso seco de raízes.

7. O peso fresco da parte aérea é o parâmetro mais adaptado para a avaliação da reação de plantas jovens de cultivares de milho à podridão de raízes causada pelo complexo *P. graminicolum* - *P. arrhenomanes* em condições de casa-de-vegetação.

LITERATURA CITADA

- ANDEREGG, J. e J.W. GUTHRIE, 1981. Seedborne *Fusarium moniliforme* and seedling infection in Hybrid sweet corn. Phytopathology, St. Paul, 71:1196-1198.
- ANDREWS, E.A., 1943. Seedling blight and root rot of grasses in Minnesota. Phytopathology, St. Paul, 33:234-239.
- BEDENDO, I.P., 1978. Metodologia para detecção de *Fusarium moniliforme* Sheld e sua ocorrência em sementes de milho (Zea mays L.) produzidas no Estado de São Paulo. ^{ESALQ-} USP, Piracicaba, S.P., 68p. (Dissertação de Mestrado).
- BIESBROCK, J.A. and F.F. HENDRIX, Jr., 1967. A taxonomic study of *Pythium irregulare* and related species. Mycologia, Lancaster, 59:943-952.
- BIESBROCK, J.A. e F.F. HENDRIX, Jr., 1970. Influence of soil water and temperature on root necrosis of peach caused by *Pythium* spp. Phytopathology, St. Paul, 60:880-882.
- BROWN, W., 1924. Two micological methods. I. A simple method of freeing fungal cultures from bacteria. II. A method of isolating single strains of fungi by cutting out a hyphal tip. Annals of Botany, 38:401-404.

- BRUEHL, G.W., 1976. Management of food resources by fungal colonists of cultivated soils. Annual Review of phytopathology, California, 14:247-264.
- BRUEHL, G.W., 1983. Nonspecific genetic resistance to soil-borne fungi. phytopathology, St. Paul, 73:943-951.
- BUCHHOLTZ, W.F., 1942. Cross pathogenic effects of *Pythium graminicolum*, *Pythium debaryanum*, and *Helminthosporium sativum* on seedlings of crested wheatgrass. phytopathology, St. Paul, 32:2 (Abstr.).
- CARVALHO, P.C.T. de, 1962. Nota prévia sobre a ocorrência - de *Pythium arrhenomanes* Drechsler, em raízes de gramíneas. Revista de Agricultura, Piracicaba, 37:50-52.
- CARVALHO, P.C.T. de, 1965. Ocorrência no Brasil de algumas espécies de *Pythium* pringsheim de interesse à olericultura. Rickia, São Paulo, 2:89-106.
- DAMICONE, J.P.; D.R. COOLEY e W.J. MANNING, 1981. Benomyl in acetone eradicates *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum* from asparagus seed. plant Disease, St. Paul, 65:892-893.
- DANIELS, B.A., 1983. Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. plant Disease, St. Paul, 67:609-611.
- DICKSON, J.G., 1923. Influence of soil temperature and moisture on the development of the seedling blight of wheat and corn caused by *Gibberella saubinetii*. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C., 23:837-870.
- DRECHSLER, C., 1929. The beet water mold and several related root parasites. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C., 38:309-361.

- DRECHSLER, C., 1936. *Pythium graminicolum* and *P. Arrhenomanes*. Phytopathology, St. Paul, 26:676-684.
- DRECHSLER, C., 1949. Longevity of some *Pythium* species in maize-meal agar cultures. Phytopathology, St. Paul, 32:503 (abstr.).
- EIRA, A.F. e N.L. de SOUZA, 1934. Aparato de precisão para medição do volume de órgãos vegetais ou objetos de geometria irregular. Summa Phytopathologica, São Paulo, 10:34-35.
- ELLIOTT, C., 1942. Relative susceptibility to *Pythium* root rot of twelve dent corn inbreds. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C., 64:711-723.
- EL-MELEIGI, M.A.; J.K. UYEMOTO e L.E. CLAFLIN, 1981. A method for removing *Fusarium moniliforme* from infested corn kernels. Phytopathology, St. Paul, 71(2):215. (abstr.).
- ERWIN, D.C. e J.W. CAMERON, 1957. Susceptibility of five sweet corn varieties to *Pythium graminicola*. Plant Disease Reporter, St. Paul, 41(12):988-991.
- FIGUEIREDO, M.B., 1967. Aplicação do método de Castellani para a conservação de fungos fitopatogênicos. O Biológico, São Paulo, 33:9-13.
- FOLEY, D.C., 1962. Systemic infection on corn by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, St. Paul, 52:870-872.
- FORBES, G.A.; O. ZIV e R.A. FREDERIKSEN, 1981. The influence of infection timing, infection techniques and site on the reactions of sorghum seedlings to *Pythium*. Phytopathology, St. Paul, 71:874 (abstr.).

- FREZZI, M.J., 1956. Espécies de *Pythium* fitopatôgenas identificadas em la Republica Argentina. Revista de Investigaciones Agrícolas, Buenos Aires, 10(2):113-241.
- FUTRELL, M.C. e M. KILGORE, 1969. Poor stands of corn and reduction of root growth caused by *Fusarium moniliforme*. Plant Disease Reporter, Washington, D.C., 53:213-215.
- GOODMAN, L.A., 1964. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. Annals of Mathematical Statistics, 35(2):716-725.
- HALPIN, J.E. e E.W. HANSON, 1958. Effect of age of seedlings of alfafa, red clover, ladino white clover, and sweetclover on susceptibility to *Pythium*. Phytopathology, St. Paul, 48:481-485.
- HAMPTON, R.O., 1955. Comparative pathogenicity of Pythiaceous fungi on corn. Iowa State College Journal of Science, Ames, 30(2):295-299.
- HAMPTON, R.O., 1957. Host specialization in *Pythium graminicolum* and pathogenicity of *P. graminicolum* to four host species in soil amended with nitrogen and phosphorus. Iowa State College Journal of Science, Ames, 32:184-185 (abstr.).
- HAMPTON, R.O. e W.F. BUCHHOLTZ, 1959. Seasonal occurrence of *Pythium graminicolum* on roots of field-grown corn. Iowa State College Journal of Science, Ames, 33(4):489-495.
- HANSING, E.D., 1967. Sistemic fungicide for control of loose smut [*Ustilago tritici*] of winter wheat. Phytopathology, St. Paul, 57:814 (abstr.).

- HANSING, E.D., 1978. Techniques for evaluation seed-treatment fungicides. In: Methods for evaluating plant fungicides , nematocides and bactericides. The American Phytopathological Society, St. Paul, 141 p.
- HASKETT, W.C. e H.C. MURPHY, 1953. Relative susceptibility of barley varieties to *Pythium graminicola* Subr. Phytopathology, St. Paul, 43:474 (abstr.).
- HENDRIX, F.F. e W.A. CAMPBELL, 1974. Taxonomic value of reproductive cell size in the genus *Pythium*. Mycologia, Lancaster, 66:681-684.
- HENDRIX, F.F. e K.E. PAPA, 1974. Taxonomy and genetics of *Pythium*. Proceedings of the American Phytopathological Society, St. Paul, 1:200-207.
- HO, W.C. e I.E. MELHUS, 1938. *Pythium graminicolum* on barley in Iowa. Phytopathology, St. Paul, 28:9 (abstr.).
- HO, W.C. e J.M. KOEPPER, 1942. Host response of maize seedlings to *Pythium graminicolum*. Phytopatology, St. Paul 32:9 (abstr.).
- HOOKE, A.L., 1953a. Severity of corn seedlings disease in Iowa soils. Iowa Academy of Science, Ames, 60:158-162.
- HOOKE, A.L., 1953b. Relative pathogenicity of *Pythium* species attacking seedlings corn. Iowa Academy of Science, Ames, 60:163-166.
- HOOKE, A.L., 1956a. Correlation of resistance to eight *Pythium* species in seedlings corn. Phytopathology, St. Paul, 46:175-176.

- HOOKEER, A.L., 1956b. Association of resistance to several seedling, root, stalk, and ear diseases in corn. Phytopathology, St. Paul, 46:379-384.
- HOPPE, P.E., 1949. Differences in *Pythium* injury to corn seedlings at high and low soil temperatures. Phytopathology, St. Paul, 39:77-84.
- HOPPE, P.E. e J.T. MIDDLETON, 1950. Pathogenicity and occurrence in Wisconsin soils of *Pythium* species which cause seedlings disease in corn. Phytopathology, St. Paul, 40: 13 (abstr.).
- HOSNEY, M.; W.E. ASHOUR; A.R. SIRRY e S.M. FATHY, 1967. Fungi carried by corn seed and their importance in causing corn disease in the United Arab Republic. Plant Disease Reporter, St. Paul, 51:53-56.
- IBRAHIM, I.A. e S.A. FARAG, 1965. A study of some fungi isolated from grains of Egiptian maize varieties. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C., 13:401-413.
- JOHANN, H.; J.R. HOLBERT e J.G. DICKSON, 1926. A *Pythium* seedling blight and root rot of dent corn. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C., 37(8):443-464.
- KAGEYAMA, K. e T. UI, 1980. A selective medium for isolation of *Pythium* spp. Annals of the Phytopathological Society - of Japan, Tokyo, 46:542-544.
- KENDRICK, E.L., 1953. The influence of environment on the physiology and pathogenicity of *Pythium* species on corn seedlings. Phytopathology, St. Paul, 43:477 (abstr.).

- KING, S.B. e G.E. SCOTT, 1981. Gentotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, St. Paul, 71:1245-1247.
- KNAPHUS, G. e W.F. BUCHHOLTZ, 1958. Vertical distribution of *Pythium graminicolum* in soil. Iowa State College Journal of Science, Ames, 33(2):201-207.
- KOIKE, H., 1971. Individual and combined effects of *Pythium tardicrescens* and *Pythium graminicola* on sugarcane: A first report. Plant Disease Report, St. Paul, 55:766-770.
- KOIKE, H. e S. YANG, 1971. Influence of sugarcane mosaic virus strain H and *Pythium graminicola* on growth of sugarcane. Phytopathology, St. Paul, 61:1090-1092.
- KULIK, M.M. e J.F. SCHOEN, 1982. Germination, vigour, and field emergence of sweet corn seeds infected by *Fusarium moniliforme*. Seed Science & Technology, 10:595-604.
- MACHACEK, J.E., 1934. A simple method of obtaining *Pythium* cultures free from bacteria. Phytopathology, St. Paul, 24:301-303.
- MANNS, T.F. e J.F. ADAMS, 1923. Parasitic fungi internal of seed corn. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C., 23(7):495-524.
- MCCARTER, S.M. e R.H. LITTRELL, 1968. Pathogenicity of *Pythium myriotylum* to several grass and vegetable crops. - Plant Disease Reporter, St. Paul, 52:179-183.
- McKEEN, W.E., 1977. Growth of *Pythium graminicola* in barley roots. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 55:44-47.

- MELCHERS, L.E., 1956. Fungi associated with Kansas hibrid - seed corn. Plant Disease Reporter, St. Paul, 40:500-506.
- MELCHERS, L.E. e C.O. JOHNSTON, 1924. Second progress report on studies of corn seed germination and the prevalence of *Fusarium moniliiforme* and *Diplodia zeae*. Phytopathology, St. Paul, 14:45 (abstr.).
- MIDDLETON, J.T., 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. Memoirs of the Torrey Botanical Club, London, 20:1-171.
- MILANEZ, A.I., 1984. A problemática da identificação de espécies dentro do gênero *Pythium* Pringsheim. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, 9:304-305 (abstr.).
- MILLER, P.M., 1955. V-8 juice agar as a general-purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology, St. Paul, 45:461-462.
- MOHAMED, H.A., W.E. ASHOUR, A.R. SIRRY e S.M. FATHI, 1967. - Fungi carried by corn seed and their importance in causing corn diseases in the United Arab Republic. Plant Disease Reporter, St. Paul, 51:53-56.
- MOHAMED, H.A.; W.E. ASHOUR; A.R. SIRRY e S.M. FATHI, 1968. - Fungi causing seedling blight of corn in the United Arab Republic. Plant Disease Reporter, St. Paul, 52:84-86.
- O'NEILL, N.R.; G.C. PAPAVIZAS e J.A. LEWIS, 1979. Infusion and translocation of systemic fungicides applied to seeds in acetone. Phytopathology, St. Paul, 69:690-694.
- OSWALD, J.W., 1950. Etiology of cereal root rots in California. Hilgardia, S. Francisco, 19:447-462.

- PIMENTEL GOMES, F., 1966. Curso de estatística experimental.
Livraria Nobel S.A., São Paulo, SP. 404p.
- PLAATS-NITERINK, A.J. VAN DER, 1981. Monograph of the genus
Pythium. Studies in Mycology nº 21, Baarn (Netherlands),
242p.
- PRATT, R.G. e G.D. JANKE, 1980. Pathogenicity of three spe-
cies of *Pythium* to seedlings and mature plants of grain
sorghum. Phytopathology, St. Paul, 70:766-771.
- RANDS, R.D. e E. DOPP, 1934. Variability in *Pythium arrhenoma-
nes* in relation to root rot of sugarcane and corn. Jour-
nal of Agricultural Research, Washington, D.C., 49:189-221.
- RAO, B.; A.F. SCHMITTHENNER; R. CALDWELL e C.W. ELLETT, 1978.
Prevalence and virulence of *Pythium* species associated
with root rot of corn in poorly drained soil. Pythopatho-
logy, St. Paul, 68:1557-1563.
- REDDY, C.S. e J.R. HOLBERT, 1924. Experiments to show the
effects of certain seed treatments on corn. Phytopatholo-
gy, St. Paul, 14:44-45.
- ROBERTSON, G.I., 1980. The genus *Pythium* in New Zealand. -
New Zealand Journal of Botany, Auckland, 18:73-102.
- SALAMA, A.M. e A.G. MISHRICKY, 1973. Seed transmission of
maize wilt fungi with special reference to *Fusarium monili-
forme* Sheld. Phytopathologische Zeitschrift, Berlim, 77:
356-362.
- SCHMITTHENNER, A.F. e J.W. HILTY, 1962. A method for stu-
dying postemergence seedling root rot. Phytopathology, St.
Paul, 52:177-179.

- SHURTLEFF, M.C., 1980. A compendium of corn diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, 105p.
- SILVA, M.O.S.A., 1977. Análises físico-químicas para controle das estações de tratamento de esgotos. CETESB, São Paulo, SP, 277p.
- SLEETH, B., 1945. Agar medium and technique for isolating *Pythium* free of bacteria. Phytopathology, St. Paul, 35:1030-1031.
- STAUDINGER, W.L. e W.F. BUCHHOLTZ, 1965. Effect of two legume and two grass crop root systems on *Pythium graminicolum* disease-inciting potencial on field soil. Iowa State Journal of Science, Ames, 39(4):453-458.
- SUMMERS, T.E., 1952. Destruction of maize roots by *Pythium graminicola* subr. and *Diabrotica undecimpunctata* Howardi Barber. Iowa State College Journal of Science, Ames, 26:294-295.
- SUMMERS, T.E. e W.F. BUCHHOLTZ, 1958. Time and frequency of recovery of *Pythium debaryanum* and *Pythium graminicolum* - from roots of growing barley seedlings. Iowa State College Journal of Science, Ames, 33(2):209-217,
- TANAKA, M.A. de S. e E. BALMER, 1980. Efeito da temperatura e dos microrganismos associados ao tombamento na germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.). Fitopatologia Brasileira, Brasília, D.F., 5:87-93.
- VAARTAJA, O., 1967. Occurrence of falcate antheridia in *Pythium* species, particularly in *P. irregulare* and its synonym, *P. polymorphon*. Mycologia, Lancaster, 59:870-877.

- VALDEBENITO, S., R.M., 1982. Podridão de raízes de cana-de-açúcar: Fungos associados e reação de cultivares a *Pythium arrhenomanes*. ESALQ-USP, Piracicaba, SP. 167p. (Tese - Doutorado).
- VAN DER ZWET, T., 1958. The effect of flooding on *Pythium* root rot in nonsterile soil. Phytopathology, St. Paul, 48:345-346 (abstr.).
- WARMKE, H.E. e N.C. SCHENCK, 1971. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and *Helminthosporium maydis* on and in corn seeds as related to T cytoplasm. Plant Disease Reporter, St. Paul, 55:486-489.
- WATANABE, T., 1974. Fungi isolated from the underground parts of sugar cane in relation to the poor ratooning in Taiwan. (2) *Pythium* and *Pythiogeton*. Transactions of the Mycological Society of Japan, Tokyo, 15:343-357.
- WATERHOUSE, G.M., 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Mycological Papers, Kew, Surrey (England), n° 109, p.1-15.

A P Ê N D I C E

Figura 6. Variação da temperatura no transcorrer dos experimentos: Efeito do potencial de inóculo (à esquerda) e Efeito da época de coleta das plantas (à direita).

Figura 7. Variação da temperatura no transcorrer dos experimentos: Variabilidade dos isolados (à esquerda) e Reação de cultivares (à direita).

Tabela 48. Efeito do potencial de inóculo na emergência de plântulas dos cultivares milho Doce de Cuba (DC) e HMD-7974 (HM).

Cultivar	Isolado	Níveis de inóculo			
		1/2,5	1/10	1/40	1/160
DC	LG	2,75*	3,00	2,50	4,25
	Test.	4,75	6,00	6,75	6,25
HM	LG	2,50	3,50	2,75	4,75
	Test.	6,25	5,00	6,25	5,00

* Média de quatro repetições, dados originais do número de plantas emergidas.

Tabela 49. Reação de cultivares de milho a isolados de *Pythium* quanto a emergência de plântulas.

Isolado	C u l t i v a r							
	DC	CA	CB	AP	VD	VF	HM	PP
D	3,33*	6,00	6,00	5,33	6,33	5,33	3,67	1,67
4P	5,00	5,33	5,67	4,67	6,33	5,33	2,00	1,67
T	5,67	6,33	5,67	5,33	7,00	6,67	3,67	4,00

* Média de três repetições, dados originais do número de plantas emergidas.