

VARIABILIDADE DE *Helminthosporium carbonum* Ullstrup E DETERMINAÇÃO
DE FONTES DE RESISTÊNCIA EM LINHAGENS DE MILHO (*Zea mays* L.)

M A R I A M E N E Z E S

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 Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1976

memória de meus inesquecíveis pais,

dedico.

AGRADECIMENTOS

A autora apresenta os mais sinceros agradecimentos:

Ao Professor Dr. ERIC BALMER pela excelente orientação, estímulo, apoio e valiosas sugestões prestadas durante a realização do presente trabalho e redação da tese.

Ao Professor Dr. FERDINANDO GALLI, Chefe do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, e Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Fitopatologia, pelas atenções e estímulo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (C.N.Pq.) pela bolsa concedida e à Superintendência do Desenvolvimento do Estado do Ceará (SUDEC).

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Departamento de Fitopatologia pelas facilidades oferecidas para execução dos trabalhos inerentes ao curso.

Ao Professor Dr. HASIME TOKESHI pela prestimosa colaboração

na revisão dos originais e sugestões apresentadas.

Ao Professor Dr. CAIO O. N. CARDOSO e ao colega de curso JORGE YAMASHITA pela elaboração das fotografias.

Aos Professores Dr. HIROSHI KIMATI e Dr. ARMANDO BERGAMIN FILHO pelas sugestões durante o transcorrer do curso de Pós-Graduação, e também durante a elaboração do presente trabalho.

Ao colega YODIRO MASSUDA pelo resumo em Inglês.

Ao Dr. ALFREDO QUERINO DE CARVALHO pela revisão do Português.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação de Fitopatologia da ESALQ.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente ao Sr. PEDRO DA SILVA pela imprescindível ajuda na instalação dos experimentos e ao Sr. ANTONIO VITTI pelos serviços datilográficos.

Ao SAMUEL MARTINS, estudante de Agronomia, pela colaboração prestada nos trabalhos de laboratório.

Aos funcionários da Biblioteca Central da ESALQ.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho,

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Isolados Utilizados	20
4.2. Meios de Cultura	21
4.3. Isolamento do Patógeno e sua Preservação	22
4.4. Preparo da Suspensão de Conídios	23
4.5. Caracterização do Patógeno	24
4.5.1. Características fisiológicas	24
4.5.1.1. Influência do meio de cultura no crescimento linear e esporulação dos isolados "7L" e "Jac"	24
4.5.1.2. Influência da fonte de nitrogênio, temperatura e período de leitura na esporulação do isolado "7L"	25
4.5.2. Características morfológicas	26
4.5.2.1. Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em diferentes meios de cultura	27
4.5.2.2. Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em tecido foliar de milho	27
4.6. Testes de patogenicidade	28
4.6.1. Generalidades	28
4.6.2. Testes de patogenicidade em linhagem S2 de milho	29
4.6.2.1. Teste nº 1	29
4.6.2.2. Teste nº 2	31
4.6.3. Teste de patogenicidade em linhagem S3 de milho - Teste nº 3	32

4.6.4.	Teste de patogenicidade em progênies S3 de milho e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de <u>H. carbonum</u> - Teste nº 4	33
4.6.5.	Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho - Teste nº 5	34
4.6.6.	Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho para os reisolados obtidos de lesões de diferentes tamanhos formadas em material suscetível - Teste nº 6	36
5.	RESULTADOS	37
5.1.	Caracterização do Patógeno	37
5.1.1.	Características fisiológicas	37
5.1.1.1.	Influência do meio de cultura no crescimento dos isolados "7L" e "Jac"	38
5.1.1.2.	Influência do meio de cultura na esporulação dos isolados "7L" e "Jac"	40
5.1.1.3.	Influência da fonte de nitrogênio, temperatura e período de leitura na esporulação do isolado "7L"	42
5.1.2.	Características morfológicas	48
5.1.2.1.	Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em diferentes meios de cultura	50
5.1.2.2.	Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em tecido foliar de milho	52
5.2.	Testes de Patogenicidade	53
5.2.1.	Testes de patogenicidade em linhagens S2 de milho	53
5.2.1.1.	Teste nº 1	53
5.2.1.2.	Teste nº 2	55
5.2.2.	Teste de patogenicidade em progênies S3 de milho - Teste nº 3	58
5.2.3.	Teste de patogenicidade em progênies S3 de milho e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de <u>H. carbonum</u> - Teste nº 4	59
5.2.4.	Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho - Teste nº 5	62

5.2.5.	Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho para os reisolados obtidos de lesões de diferentes tamanhos formadas em material suscetível - Teste nº 6	64
6.	DISCUSSÃO	74
7.	CONCLUSÕES	85
8.	SUMMARY	87
9.	LITERATURA CITADA	89
10.	APÊNDICE	94

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Isolados utilizados e sua origem	20
Tabela 2 - Teste de patogenicidade em diferentes linhagens S2 de milho, para os isolados de <u>H. carbonum</u> , "7L" e "Jac".	54
Tabela 3 - Teste de patogenicidade em diferentes linhagens S2 de milho, para os isolados de <u>H. carbonum</u> , "7L" e "Jac".	56
Tabela 4 - Teste de patogenicidade em diferentes progênies S3 de milho para os isolados de <u>H. carbonum</u> , "7L" e "Jac" .	58
Tabela 5 - Teste de patogenicidade em diferentes progênies S3 de milho e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de <u>H. carbonum</u>	60
Tabela 6 - Teste de patogenicidade em linhagens S3 de milho, e algumas progênies S3 para os isolados de <u>H. carbonum</u> , "7L" e "Jac"	62
Tabela 7 - Teste de patogenicidade em linhagens S3 de milho, para os reisolados de <u>H. carbonum</u> obtidos de lesões grandes e pequenas apresentadas pela linhagem 929-B-5	70
Tabela 8 - Aparecimento e desenvolvimento de lesões, medidas em milímetros, para linhagens S3 de milho resistentes e suscetíveis, quando inoculadas com os isolados de <u>H. carbonum</u> , "7L" e "Jac", obtidos de lesões grandes e pequenas apresentadas pela linhagem 929-B-5	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Conídios de <u>H. carbonum</u> na extremidade do conidióforo	49
Figura 2 - Reação de resistência induzida pelos isolados "Jac" e "7L", respectivamente em 100% e 90% das plantas da linhagem 187-2B-5	65
Figura 3 - Reação de suscetibilidade induzida pelos isolados "Jac" e "7L" em 100% das plantas da linhagem 929-B-5	66
Figura 4 - Reação de resistência e suscetibilidade induzida pelos isolados "Jac" e "7L" em 100% das plantas da linhagem 260-1A-2	67
Figura 5 - Reação de suscetibilidade e moderada resistência induzida pelos isolados "Jac" e "7L", respectivamente, em 66,7% e 50% das plantas da linhagem 133-1A-2	68
Figura 6 - Reação de suscetibilidade e moderada resistência induzida pelos isolados "7L" e "Jac", respectivamente, em 30% e 10% das plantas da linhagem 1224-A-2	69

1. RESUMO

O presente trabalho versou sobre a identificação de dois isolados de fungo do gênero Helminthosporium, através de estudos relacionados com a morfologia dos conídios e a patogenicidade em linhagens de milho (Zea mays L.).

Os estudos morfológicos envolveram observações sobre comprimento, largura, número de septos, coloração e formato dos conídios para os dois isolados produzidos em diferentes substratos. Foi verificada uma variação no tamanho dos conídios, para ambos os isolados, de acordo com o substrato utilizado, sendo, no entanto, semelhantes as características morfológicas quando comparadas entre si. Considerando-se os parâmetros indicados na literatura, o fungo foi identificado como Helminthosporium carbonum Ullstrup.

Os testes de patogenicidade realizados em linhagens S2 e S3 de milho revelaram um comportamento diferente entre a reação induzida pelo isolado procedente de Sete Lagoas (MG) - "7L" -, e aquela induzida pelo isolado procedente de Inhumas (GO) - "Jac" -. Quando inoculados separadamente nas mesmas linhagens de milho, o isolado de Sete Lagoas mos-

trou-se mais patogênico que o isolado de Inhumas.

O emprego de linhagens diferenciais de milho para as raças 1 e 2 de H. carbonum permitiu identificar o isolado de Sete Lagoas como sendo provavelmente a raça 1, representando o isolado de Inhumas um outro biótipo diferente da raça 2.

Entre as linhagens S2 e S3 testadas, algumas se comportaram como suscetíveis a ambos os isolados; outras como resistentes aos mesmos, enquanto que outras apresentaram um comportamento segregante.

Também foram investigados alguns aspectos inerentes à fisiologia do patógeno, objetivando conhecer as condições mais favoráveis para a esporulação. Através destes estudos verificou-se que o meio de Lactose-caseína hidrolizada estimulou a esporulação de ambos os isolados. Com exceção de sulfato de amônia, as fontes de nitrogênio utilizadas estimularam a esporulação do isolado de Sete Lagoas. A temperatura de 23°C favoreceu uma melhor esporulação do patógeno, quando comparada à temperatura de 28°C, embora nesta última tenha ocorrido boa esporulação.

As leituras efetuadas para a esporulação nos diferentes períodos revelaram que a quantidade de conídios obtidos em um dado tempo era influenciada pela fonte de nitrogênio.

2. INTRODUÇÃO

O milho (Zea mays L.) figura entre as principais culturas do mundo, ocupando o terceiro lugar em produção e área semeada, após o trigo e o arroz (KRAUG, 1966 e SHURTLEFF et alii, 1973).

No Brasil, sua importância é destacada também em área colhida e produção, ocupando o primeiro lugar, seguido do arroz e do trigo. Destacam-se como maiores produtores os Estados do Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Santa Catarina, com respectivamente, 21,72%, 18,53%, 14,80%, 14,05% e 10,99% da produção nacional (BRASIL, 1975).

Várias doenças podem incidir sobre a cultura do milho, acarretando prejuízos aos agricultores pela diminuição da produção. Entre as doenças que ocorrem nas várias regiões do mundo, são encontradas as causadas por fungos do gênero Helminthosporium, destacando-se Helminthosporium maydis maydis Nisikado & Miyake, H. turcicum Passerini e H. carbonum Ullstrup. De modo geral, os sintomas causados pela incidência destes patógenos são caracterizados principalmente por lesões foliares, variáveis quanto ao tamanho e à forma. A ocorrência de tais lesões acarreta redução da área fotossintética da planta, com prejuízo para o seu metabolismo

normal, sendo que em condições severas pode induzir ao secamento das folhas afetadas.

No Brasil, a ocorrência de H. maydis e H. turcicum tem despertado a atenção dos melhoristas de milho, para o desenvolvimento de trabalhos de melhoramento genético visando à resistência a estes patógenos, como medida mais econômica de controle.

Recentemente, foi constatada nos Estados de Goiás (Inhumas) e Minas Gerais (Sete Lagoas) uma nova doença do milho, causada por uma espécie do gênero Helminthosporium. As características sintomatológicas apresentadas pelas plantas afetadas assemelhavam-se àquelas causadas por H. maydis, porém o organismo causal era morfológicamente diferente.

Diante da importância econômica da cultura do milho para o país e tendo em vista a constatação de uma nova doença, o presente trabalho teve como objetivos principais: identificar o patógeno, através das características morfológicas e testes de patogenicidade de dois isolados do gênero Helminthosporium; determinar fontes de resistências para futuros trabalhos de melhoramento do milho; estudar alguns aspectos da fisiologia do referido patógeno, principalmente no que concerne ao substrato para uma melhor esporulação, fornecendo assim informações básicas que possibilitem o preparo de suspensões de conídios, em quantidade suficiente para inoculação de populações de plantas utilizadas nos trabalhos de melhoramento para resistência à doença.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O gênero Helminthosporium Link ex Fries pertence à classe dos Deuteromicetos, ordem Moniliales, família Dematiaceae, incluindo considerável número de espécies que afetam gramíneas, especialmente milho, arroz, aveia, trigo e sorgo. Na identificação das espécies deste gênero, os critérios taxonômicos mais característicos, adotados por DRECHSLER (1923), LUTTRELL (1951, 1954 e 1963), são referentes à morfologia dos conídios e conidióforos. LUTTRELL (1951) considerou como principais critérios na identificação das espécies do gênero Helminthosporium o tipo de germinação dos conídios, forma, inserção do hilum, espessura da parede, coloração, largura, comprimento e septação. São admitidas variações, principalmente no tamanho dos conídios, num mesmo grupo de indivíduos, podendo ocorrer formas morfológicamente diferentes para as várias espécies do gênero mencionado.

De acordo com HOOKER et alii (1973), as espécies mais comumente encontradas causando "helminthosporioses" em milho (Zea mays L.) são representadas principalmente por H. turcicum Passerini (Trichometosphaeria turcica Luttrell), H. maydis Nisikado & Miyake (Cochliobolus heterostrophus Drechs.) e H. carbonum Ullstrup (Cochliobolus carbonum Nelson).

A distinção entre estas três espécies pode ser feita com base nas características morfológicas dos conídios e sintomas induzidos no hospedeiro. Assim sendo, o H. turcicum é distinguido facilmente do H. maydis e H. carbonum pela morfologia dos seus conídios e sintomatologia apresentada pelas plantas afetadas (ULLSTRUP, 1941 a). Segundo LUTTRELL (1951), os conídios do H. turcicum apresentam de 1 a 8 septos, tendo um comprimento variando de 45 μ a 132 μ e uma largura de 15 μ a 25 μ . São retos a levemente curvos, de coloração amarelo-acinzentada ou marrom-amarelada ou ainda oliva-pálida. Conforme DRECHSLER (1923), os conídios de H. turcicum apresentam uma das extremidades com forma abrupta e hilum proeminente. Em adição, SHURTLEFF et alii (1973) relataram a presença de conidióforos oliváceos com 2 a 4 septos e medindo 7 μ a 9 μ de largura por 150 μ a 250 μ de comprimento.

Já o H. maydis, de acordo com LUTTRELL (1951) e ULLSTRUP (1944), apresenta conídios menores que o H. turcicum, medindo 25 μ a 127 μ de comprimento por 7 μ a 21 μ de largura (tamanho médio: 89x15 μ) e uma variação no número de septos de 3 a 13. Os conídios mostram-se com curvatura pronunciada e uma coloração fuliginosa e oliváceo-pálida. Segundo SHURTLEFF et alii (1973), os conidióforos medem de 120 μ a 170 μ e apresentam-se curvos.

Com relação ao H. carbonum, ULLSTRUP (1944), SHURTLEFF et alii (1973) e LUTTRELL (1951) relataram as seguintes características morfológicas: comprimento dos conídios variando de 25 μ a 100 μ e a largura de 7 μ a 18 μ (média: 63 μ x 13 μ), com as extremidades arredondadas. Apresentam 2 a 12 septos, sendo de retos a levemente curvos, com coloração marrom-olivácea-escura. Os conidióforos podem produzir 1 a vários conídios em sua extremidade e medem 90 μ a 230 μ de comprimento por 5 μ a 7 μ de largura, apresentando uma coloração marrom-escura com tonalidade oli

vácea. São originados dos estômatos, de onde emergem em pequenos grupos ou individualmente.

As espécies mencionadas podem ser separadas com base nos sintomas induzidos em plantas de milho. Enquanto as lesões causadas por H. turcicum são acinzentadas, longas, variando o comprimento de 25 mm a 150 mm (SHURTLEFF et alii, 1973) e alcançam apreciável extensão do tecido foliar (ULLSTRUP, 1941 a), as apresentadas pelas plantas afetadas pelo H. maydis e H. carbonum são pequenas e mais numerosas. Entretanto, há semelhança entre os sintomas induzidos por estas duas últimas espécies. As lesões de H. maydis caracterizam-se por apresentar uma área central de cor palha, circundada por uma púrpura (ULLSTRUP, 1944). O tamanho dessas lesões varia de 6 x 12 mm a 19 mm (raça 0) e 6 a 12 mm x 6 a 27 mm (raça T), segundo SHURTLEFF et alii (1973). Entretanto, as lesões induzidas por H. carbonum são de ovais a circulares, podendo apresentar zonas concêntricas com centro marrom-claro, bordos de coloração marrom e medindo de 5 a 20 mm de comprimento (raça 1). Também lesões alongadas, irregulares, de coloração marrom-chocolate e medindo 3 a 20 mm de comprimento (raça 2) segundo ULLSTRUP (1944).

O tempo de formação das lesões induzidas pelas três espécies de Helminthosporium também pode servir de base para identificação das mesmas, adicionado a características morfológicas dos conídios. Assim, as lesões de H. turcicum formam-se 10 a 14 dias após a inoculação das plantas (KINSEY, 1971) ou 10 a 12 dias após inoculação (HOOKER et alii, 1973). Já as lesões de H. maydis formam-se 4 a 5 dias após a inoculação das plantas segundo HOOKER et alii (1973), e as lesões incitadas por H. carbonum formam-se 8 dias após a inoculação (ULLSTRUP, 1944).

A ocorrência das três espécies mencionadas, causando doenças em milho foi relatada em épocas diferentes. Assim, H. maydis foi

descrito e identificado em 1926 (ULLSTRUP, 1970), embora DRECHSLER (1925) já houvesse assinalado o estágio sexual que denominou Ophiobolus heterostrophus n. sp. e, posteriormente, DRECHSLER (1934) chamou de Cochliobolus heterostrophus. Por volta de 1970, devido à incidência da doença, trazendo prejuízos para a cultura do milho, estudos foram conduzidos por HOOKER et alii (1970) que permitiram confirmar a existência das raças T e O de H. maydis, sendo a primeira mais importante. Segundo PEREIRA (1976), o patógeno foi constatado no Brasil em novembro de 1970, tendo despertado atenção dos melhoristas.

Por outro lado, a ocorrência de H. turcicum foi relatada causando prejuízos em milho nos Estados Unidos, por volta de 1939 (ULLSTRUP, 1970). Segundo CHENELU (1962), as perdas causadas em milho pela incidência da doença induzida por este patógeno podem atingir 27 a 90% da produção. A existência de raças foi evidenciada por ROBLES (1949) e ROBERT & SPRANGUE (1960).

Finalmente, a mancha foliar do milho causada pelo fungo H. carbonum foi descrita pela primeira por ULLSTRUP (1944), embora sua ocorrência tenha sido evidenciada no Corn Belt, por volta de 1938 e 1939 (ULLSTRUP, 1941 a). Aconteceu, porém, que na época o patógeno foi confundido com H. maydis, em virtude da grande semelhança existente na sintomatologia apresentada pelas plantas afetadas e, também, na morfologia dos conídios. Posteriormente, ULLSTRUP (1944) realizou trabalhos comparativos, envolvendo isolados de H. maydis procedentes dos Estados do Sudeste e os oriundos do Corn Belt. Concluiu-se destes estudos que havia diferença estatisticamente significativa no comprimento médio dos conídios, entre os isolados mencionadas. Observou-se ainda que os conídios de H. maydis eram consideravelmente mais curvos, quando comparados com aqueles relativamente retos do patógeno do Corn Belt. Assim, diante das evidências apontadas para esses isolados, foi proposta pelo mesmo autor uma no-

va espécie para o patógeno do Corn Belt, sendo então assinalado o binomial H. carbonum para o agente da doença daquela região. Por sua vez, NELSON (1959) obteve o estágio perfeito de H. carbonum, através do cruzamento de isolados compatíveis, descrevendo-o como Cochliobolus carbonum Nelson.

ULLSTRUP (1941 a; 1944; 1954 a; 1954 b) relatou a existência de duas raças, raça 1 e raça 2 para a espécie de H. carbonum, tendo em vista as diferenças observadas na manifestação dos sintomas em plantas de milho, muito embora mostrassem semelhanças tanto nos seus aspectos morfológicos e culturais, quanto nos sintomas induzidos em espigas de milho. Em ambas as raças, comumente, aparecem variantes em cultura pura, embora não se tenha observado variação na virulência da raça 1. Recentemente, foi descrita e caracterizada uma nova raça 3 do H. carbonum por NELSON et alii (1973), que levaram em consideração a morfologia dos conídios e a virulência apresentada em linhagens de milho. A raça 3 revela certa diferença na morfologia dos conídios, mas, segundo NELSON et alii (1973) suas dimensões e características estão dentro dos parâmetros citados por LUTTRELL (1951) para H. carbonum. Além do mais, cruzamentos realizados entre as raças do H. carbonum mostraram-se férteis, indicando, assim, que não podem ser espécies biologicamente diferentes, mesmo que não sejam morfológicamente idênticas.

As variações na morfologia dos conídios das raças de H. carbonum são aqui relatadas de acordo com a literatura. Assim, ULLSTRUP (1944) assinalou para a raça 1 variação no comprimento e largura dos conídios, respectivamente, de 24,8 μ a 99,1 μ e 7,1 μ a 17,7 μ , sendo a média de 61,2 μ x 13,0 μ . O número de septos variou de 2 a 12, sendo a média de 6,8. A raça 2, citando ainda ULLSTRUP (1944), apresenta 64,0 μ de comprimento médio dos conídios e 13,3 μ para a média de largura. En-

tretanto, as variações observadas para o comprimento e largura dos conídios foram, respectivamente, de $24,8 \mu$ a $102,7 \mu$ e de $10,6 \mu$ a $17,7 \mu$. A variação no número de septos foi de 3 a 12, sendo a média de 7,2. Conforme o mesmo autor, a diferença observada entre o comprimento dos conídios das raças 1 e 2 de H. carbonum não mostrou significância estatística. Por outro lado, NELSON et alii (1973) verificaram que a raça 3 do H. carbonum apresenta seus conídios oliváceos, podendo ser oliváceos-escuros, retos a moderadamente curvos; e produzidos no ápice dos conidióforos. Os conídios apresentam uma variação no comprimento de $40,16 \mu$ a $107,52 \mu$, sendo o comprimento médio de $70,28 \mu$. Sua largura varia de $9,18 \mu$ a $18,16 \mu$, sendo a largura média de $13,26 \mu$. A curvatura dos conídios é mais pronunciada do que a normalmente encontrada para H. carbonum e, segundo os autores, parece ser intermediária entre H. carbonum e H. maydis.

As raças fisiológicas do H. carbonum mostram diferenças no que concerne à patogenicidade em linhagens de milho e, de acordo com os trabalhos de ULLSTRUP (1941 a; 1944; 1954 a; 1954 b), NELSON et alii (1973), são assim relatadas:

A raça 1 é altamente virulenta em toda parte aérea de linhagens suscetíveis, causando lesões bem definidas que podem coalescer. Em condições ótimas para o desenvolvimento da doença, as plantas podem morrer antes da formação da espiga. A resistência e a suscetibilidade são demonstráveis em todos os estágios de desenvolvimento do hospedeiro. Sua distribuição geográfica, através do Corn Belt, vai de Iowa a Ohio e de Ohio River ao Norte da Indiana. Está, no entanto, na dependência de linhagens suscetíveis de milho, uma vez que a resistência é governada por um gene dominante. A linhagem Pr e o híbrido Pr x K61 são suscetíveis a esta raça.

ULLSTRUP (1944) verificou que o estágio inicial dos sintomas induzidos pela raça 1 é caracterizado por manchas pequenas de coloração verde-pálida ou clorótica, que com a evolução tornam-se necróticas. Com o desenvolvimento da lesão, os tecidos da parte central morrem, tomando uma coloração palha. As margens das lesões mostram zonas definidas variando do marrom-claro a púrpura. O tamanho das lesões é variável, podendo alcançar 20 mm de comprimento por 5 mm de largura quando completamente desenvolvidas. Apresentam um formato oblongo, uma vez que o desenvolvimento lateral do patógeno parece ser impedido pelas nervuras maiores. De acordo com ULLSTRUP (1941), os sintomas apresentados pelos seedlings inoculados não são muito diferentes daqueles observados no campo. Após 14 a 18 horas da inoculação em casa-de-vegetação, as plantas exibem pequenas manchas cloróticas que aumentam rapidamente, mostrando encharcamento da parte central da mancha. Após 7 dias da inoculação das plantas, as lesões são semelhantes em aspecto às aquelas encontradas no campo.

Entretanto, em linhagens resistentes, conforme ULLSTRUP (1941 a e 1954 b), os sintomas causados pela raça 1 são manifestados por pontos de coloração verde amarelada, medindo 0,5 mm a 1,0 mm de diâmetro, os quais tendem a diminuir de tamanho à medida que as folhas se desenvolvem. De acordo com ULLSTRUP (1944), o patógeno pode incidir sobre as espigas, ficando às mesmas recobertas, com o crescimento do fungo, de coloração escura. Como consequência da infecção da espiga, o patógeno pode ser facilmente disseminado pelas sementes.

A raça 2 é menos virulenta que a raça 1, conforme ULLSTRUP (1944 e 1954 b), sendo a resistência de natureza provavelmente poligênica. Os isolados desta raça, quando inoculados em plantas da linhagem Pr e híbrido Pr x K61, induzem à formação de pontos necróticos. As espigas são

mais frequentemente infectadas por esta raça do que as folhas. De acordo com ROBERT (1962) e PATEL & BAIN (1973), a raça 2 é menos especializada que a raça 1, apresentando uma ampla gama de hospedeiros entre as espécies de gramíneas.

Os sintomas induzidos pela raça 2, tendo em vista os trabalhos de ULLSTRUP (1944; 1954 b), são caracterizados pela formação de lesões alongadas, irregulares, de coloração marrom-chocolate, que às vezes coalescem formando áreas maiores de tecido necrosado. As lesões individuais, observadas no campo, apresentam tamanho variando de pontos necróticos a 20 mm de comprimento. A coalescência torna-se maior nas extremidades das folhas. Quando as plantas são inoculadas artificialmente, no estágio de 4 a 5 folhas, 7 dias após a inoculação, mostram lesões de coloração marrom-escura e formato alongado. As espigas, quando infectadas, apresentam sintomas semelhantes àqueles causados pela raça 1.

A raça 3 do H. carbonum difere em virulência dos isolados das raças 1 e 2 e também em morfologia dos conídios, vez que a curvatura dos mesmos é mais pronunciada do que aquela comumente observada para o H. carbonum. O patógeno é comum na Pennsylvania, tendo sido frequentemente isolado de milho no ano de 1972 (NELSON et alii, 1973). Conforme os mesmos autores, a raça 3 induz no hospedeiro a formação de lesões lineares entre as nervuras, variando, no entanto, quanto ao tamanho. Assim sendo, as lesões apresentam um comprimento máximo quando atingem 15 a 20 mm. A variação na largura vai de 0,5 mm a 20 mm. Entretanto, o tamanho das lesões, de acordo com os autores mencionados, varia com o genótipo do hospedeiro e também com o isolado do patógeno. As lesões apresentam coloração marrom-acinzentada, circundada por um bordo de marrom-claro a escuro. Seu tamanho máximo é atingido entre 7 a 10 dias após a inoculação.

BLANCO et alii (1974), estudando a composição racial de H. maydis e H. carbonum em híbridos com citoplasma normal, verificaram que dos 241 isolados de H. carbonum obtidos de tecidos de milho, na Pennsylvania, 124 eram da raça 2, 16 da raça 3 e um da raça 1 do patógeno mencionado. Em 1973, os isolados da raça 3 representaram aproximadamente 11% da população de H. carbonum. Segundo os autores, os isolados da raça 3, do mesmo modo que os da raça 2, pareceram não ser específicos às linhagens com citoplasma para macho-esterilidade, induzindo sintomas semelhantes num certo número de linhagens de milho.

Fatos mais recentes vem indicando a prevalência da mancha foliar do milho no Corn Belt, causada por um biótipo do H. carbonum. Primeiramente, HOOKER et alii (1973) fizeram relatos da ocorrência, na região citada, de um novo Helminthosporium causando doença em milho, caracterizada por lesões em folhas, bainhas e grãos. Embora alguns híbridos tenham sido afetados, a doença foi mais evidenciada em certas linhagens de milho. Do mesmo modo, WALLIN & LOONAN (1973) fizeram referência a uma doença de milho ocorrendo no Corn Belt, causada por um diferente Helminthosporium. O organismo causal apresentava semelhança com H. maydis, no que concerne aos sintomas incitados, mas era morfológicamente diferente do mesmo. Devido à grande semelhança com os conídios de H. carbonum, foi considerado por R.R. NELSON (comunicação pessoal com os autores) como possível raça 2 ou uma nova raça do H. carbonum. Posteriormente, HOOKER (1974 a) relatou que o organismo causal da doença do milho no Corn Belt por ele isolado, apresentava estreita identidade com o H. carbonum. Em trabalhos subsequentes, HOOKER (1974 b) refere-se ao padrão de patogenicidade que se assemelha à raça 2, porém difere da raça 1 e da raça 3 do H. carbonum. Finalmente, HOOKER (1974 c e 1975) refere-se também ao aumento da doença do milho no Corn Belt causada por H. carbonum, citando ainda os trabalhos de WALLIN & LOONAN (1973) e HOOKER et alii (1973) como sendo

relatos do mesmo patógeno.

Estudos relacionados com perdas de produção de plantas afetadas por H. carbonum e outras espécies de Helminthosporium foram desenvolvidos por ULLSTRUP & MILES (1957), através de epifitotias simuladas no campo. Os resultados, no que concerne ao H. carbonum, revelaram que o híbrido K61 x Pr1, resistente ao patógeno, produziu 5.552,55 kg/ha, enquanto que o híbrido simples suscetível, K61 x Pr, produziu somente 1.122,32 kg/ha. Entretanto, os dois híbridos tiveram igual produção de sementes na ausência da doença.

Do mesmo modo, FISHER et alii (1976) estudaram reações de doenças causadas por 4 espécies de Helminthosporium do milho e os efeitos refletidos na produção, através de inoculações artificiais no campo. Com relação ao H. carbonum, os autores verificaram que o isolado 72:44-6 pode causar perdas significantes na produção de híbridos suscetíveis.

Os primeiros estudos observando fontes de resistência em milho ao H. carbonum foram desenvolvidos por ULLSTRUP (1941 a) através de inoculações de plantas em casa-de-vegetação, tendo então a possibilidade de separar as raças 1 e 2, com base na sintomatologia apresentada. Entre as linhagens testadas, observou o autor que a linhagem Pr comportava-se como suscetível à raça 1 do patógeno e moderadamente suscetível à raça 2. Por sua vez, as linhagens 187-2, PI e o híbrido PH revelaram alta resistência para a raça 1 e suscetibilidade para a raça 2. Entretanto, com relação às linhagens 38-11, Ldg, 4-8, L317, foi verificada uma reação de resistência para ambas as raças do patógeno. Já a linhagem 66 mostrou alta resistência à raça 1 e uma suscetibilidade moderada à raça 2. Em adição, a linhagem HY revelou alta resistência à raça 1 e uma resistência à raça 2.

ULLSTRUP (1944), em seu trabalho para comparação dos isolados de H. maydis com os isolados do Corn Belt, observou o comportamento de algumas linhagens, híbridos simples e híbridos duplos, quando inoculados com as raças 1 e 2 de H. carbonum e os isolados de H. maydis. A reação das plantas no que concerne aos isolados de H. carbonum variou de suscetível, moderadamente suscetível, moderadamente resistente e resistente. Desta forma, as linhagens K61, K44 e Pr mostraram-se suscetíveis ao isolado da raça 1, enquanto que a reação ao isolado da raça 2 foi moderadamente suscetível para as linhagens mencionadas. Por outro lado, as linhagens Pr-1 e 187-2 revelaram reação de resistência à raça 1, mas, em relação à raça 2, o comportamento das duas linhagens citadas foi de suscetibilidade e moderadamente suscetível, respectivamente. Já a linhagem 38-11 mostrou-se resistente à raça 1 e moderadamente resistente à raça 2. A linhagem Pr-1, segundo o mesmo autor, é homocigota para resistência e foi obtida pelo cruzamento de Pr com uma linhagem resistente e retrocruzada durante 5 gerações, seguindo-se duas autofecundações. Os híbridos simples inoculados, tais como K61 x Pr e K61 x K44 apresentaram reação de suscetibilidade à raça 1 e uma reação moderadamente suscetível à raça 2. Por sua vez, o híbrido simples 187-2 x L317 mostrou reação de resistência à raça 1 e moderadamente suscetível à raça 2. Desta forma, foram selecionadas linhagens suscetíveis e resistentes ao H. carbonum, as quais são empregadas como diferenciais para as duas raças do patógeno.

HOOKER (1974 a), investigando sobre fontes de resistência ao H. carbonum, isolado 72:44-6, testou diferentes linhagens de milho, no estágio de 4 a 5 folhas. Os resultados obtidos indicaram uma variação na reação ao patógeno, mostrando algumas linhagens apenas pontos cloróticos, enquanto que outras, pequenas lesões necróticas. As lesões, segundo o mesmo autor, variaram em tamanho sobre uma mesma folha, não tendo sido observada influência do citoplasma no tamanho das lesões, quando dife-

rentes citoplasmas foram testados. A maior média para o tamanho da lesão foi 7 mm, tendo ocorrido variação de 1 mm a 9 mm. Algumas linhagens testadas apresentaram somente pontos de penetração, comportando-se como resistentes ao patógeno, enquanto que outras apresentaram a média do tamanho das lesões variando de 5 mm a 7 mm, o que indica um comportamento suscetível ao patógeno. As demais linhagens apresentaram a média do tamanho das lesões variando de 1 mm a 4 mm.

Do mesmo modo, HOOKER (1974 b) estudou a reação de várias linhagens, inoculadas em condições de campo com o H. carbonum, isolado 72:44-6. Os resultados obtidos indicaram uma certa variação na reação ao patógeno nas linhagens testadas. Considerando-se todas as linhagens, o comprimento das lesões variou de 1 mm a 20 mm. Algumas linhagens mostraram-se muito suscetíveis ao patógeno, havendo infecção do colmo e espiga, com diminuição no tamanho das sementes. Além disso, as plantas pareceram mais suscetíveis à podridão do colmo. O tempo úmido favoreceu a disseminação secundária do patógeno, o qual foi isolado posteriormente do colmo e dos tecidos da raiz.

Novamente, HOOKER (1974 c) estudou a reação de diversos híbridos ao H. carbonum, isolado 72:44-6, inoculados no estágio de 4 a 5 folhas em casa-de-vegetação. A avaliação da doença, efetuada 14 dias após a inoculação, mediante a determinação do tamanho das lesões individuais, revelou uma variação no tamanho das lesões numa mesma folha, entre plantas de um certo híbrido e entre os híbridos. Observou o autor a predominância de lesões pequenas nos híbridos que tinham como pais as linhagens H95, Mol2 ou R177. Estas linhagens também apresentaram lesões pequenas, quando testadas. O tamanho das lesões, considerando-se todos os híbridos, variou de 1 mm a 7 mm, sendo a maior média 6 mm. Entre os híbridos testados, alguns apresentaram reação caracterizada por pontos cloróticos.

Num outro estudo, HOOKER (1975) investigou sobre a reação de híbridos simples e duplos de milho quando inoculados no campo com o H. carbonum, isolado 72:44-6, observando que os mesmos expressaram mais resistência à doença quando no estágio adulto do que no estágio de seedlings. O comprimento médio das lesões variou de 1 mm a 14 mm. As linhagens resistentes, como H95 e R177, tenderam para dominância nos híbridos. Entre os híbridos testados, alguns apresentaram lesões cujo comprimento variou de 7 mm a 14 mm, comportando-se como suscetíveis.

Com relação aos estudos da herança da resistência ao patógeno, foi observado por ULLSTRUP (1941 a) que todas as linhagens e híbridos testados mostraram ser altamente resistentes à raça 1 de H. carbonum. Baseado nesta observação, ULLSTRUP (1941 b) desenvolveu estudos sobre a herança da suscetibilidade à raça 1 do referido patógeno. Assim sendo, os dados obtidos na segregação dos seedlings F2 dos cruzamentos originais, bem como dos seedlings resultantes de retrocruzamento e, também, dos seedlings de progênes F3, mostraram que a suscetibilidade à raça 1 de H. carbonum é condicionada por um par de genes, sugerindo o autor que estes genes fossem designados hm hm. Os indivíduos heterozigotos apresentam resistência dominante. Desta forma, ULLSTRUP (1954 b) fez referência sobre a resistência dos híbridos ao patógeno, a menos que aqueles sejam formados por duas linhagens homozigotas para suscetibilidade. Entretanto, conhecendo-se a reação da linhagem ao patógeno, tal cruzamento poderá ser evitado. Com relação à raça 2, o mesmo autor relata que o modo de herança não tem sido estudado, mas sugere que vários genes estejam envolvidos.

Com relação aos estudos sobre a fisiologia das espécies de Helminthosporium citadas, alguns trabalhos foram desenvolvidos por GARRAWAY & BILLOTTE (1973), envolvendo o cultivo da raça T de H. maydis em um meio basal, ao qual foi adicionado glucose como fonte de carbono, em várias concentrações, e, também tiamina ou micronutrientes (Cu, Fe, Mn e

Zn). A temperatura de incubação utilizada foi de 28°C. Os resultados obtidos revelaram esporulação abundante à medida que se aumentava a concentração de glucose.

Outros estudos sobre esporulação "in vitro" das raças T e O do H. maydis foram realizadas por LARSEN & SAFFORD (1973). A investigação teve como objetivo conhecer o melhor meio de cultura para produção de inóculo, tendo sido constatado que o meio contendo lactose como fonte de carbono apresentou bons resultados para esporulação e crescimento linear do fungo mencionado. Das fontes de nitrogênio utilizadas, caseína hidrolizada foi a mais importante na esporulação do H. maydis. Com relação à temperatura, os autores observaram que o ótimo de esporulação ocorreu na faixa de 24-28°C.

MALCA & ULLSTRUP (1962), estudando o efeito da nutrição de carbono e nitrogênio no crescimento e esporulação do H. turcicum e H. carbonum, verificaram que maltose, D-glucose e sacarose foram mais eficientemente utilizadas no crescimento. H. turcicum apresentou uma melhor esporulação quando L-sorbose e D-glucose foram misturadas. Ambas as espécies de fungos utilizaram mais eficientemente para o crescimento o nitrogênio orgânico. Tanto o H. turcicum como o H. carbonum apresentaram pouco crescimento e esporulação no meio contendo nitrogênio amoniacal.

HALE & ROANE (1961) investigaram sobre a nutrição de H. carbonum fazendo variar os nutrientes num meio basal. Os estudos foram desenvolvidos com vitaminas (tiamina, biotina, inositol e piridoxina), com açúcares (galactose, glucose, sacarose, maltose, frutose e manose), com diferentes níveis de asparagina como fonte de nitrogênio e relação fonte de nitrogênio e pH. Os resultados obtidos mostraram que o H. carbonum cresceu bem nas fontes de carbono e nitrogênio utilizadas e no pH do meio.

O fungo utilizou o nitrogênio tanto na forma reduzida como na forma oxidada. Os autores observaram que nenhuma das vitaminas induziu marcada mudança na taxa de crescimento, quando comparado com o meio basal ou com o meio contendo glucose e caseína hidrolizada.

Entre os fatores nutricionais que desempenham papel importante no desenvolvimento dos fungos encontram-se o carbono e o nitrogênio, considerados fontes essenciais para o crescimento e esporulação. Com relação à utilização de nitrogênio, ROBBINS & STEINBERG, citados por BAIS *et alii* (1970), classificaram fungos tendo em vista sua habilidade na utilização de diferentes fontes de nitrogênio. LILLY & BARNETT (1951) observaram que a esporulação de alguns fungos é favorecida por certas fontes de nitrogênio, que podem não ser as mesmas que favorecem o crescimento. Do mesmo modo, nem todas as fontes de carbono são igualmente adequadas para a frutificação de fungos, podendo ocorrer que uma fonte de carbono seja favorável ao crescimento e não ser adequada para a esporulação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolados Utilizados

Os isolados do patógeno utilizados no presente trabalho foram os constantes da Tabela 1.

Tabela 1. Isolados utilizados e sua origem

Isolados	Origem
"7L"	Sete Lagoas (MG)
"Jac"	Inhumas (GO)
"7L" LP	Oriundo de lesões pequenas formadas na linhagem 929-B-5
"7L" LG	Oriundo de lesões grandes formadas na linhagem 929-B-5
"Jac" LP	Oriundo de lesões pequenas formadas na linhagem 929-B-5
"Jac" LG	Oriundo de lesões grandes formadas na linhagem 929-B-5

4.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados tanto para o estudo do crescimento linear e esporulação dos isolados "7L" e "Jac", como para o estudo da morfologia dos conídios foram os seguintes:

Batata-dextrose-ágar: BDA (KELMAN, 1967)

Meio de Czapek: CZAPEK - K_2HPO_4 , 1,0 g; $NaNO_3$, 3,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; KCl, 0,5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g; Sacarose, 30,0 g; ágar, 15,0 g para 1000 ml de água destilada (TUIITE, 1969).

Nutriente-ágar: NA - Extrato de carne, 3,0 g; peptona, 10,0 g; ágar, 20,0 g, para 1000 ml de água destilada (KELMAN, 1967).

Meio de lactose-caseína hidrolizada: LCH - Lactose, 37,5 g; caseína hidrolizada, 3,0 g; KH_2PO_4 , 1,0 g; $MgSO_4$, 0,5 g; ágar, 15,0 g para 1000 ml de água destilada; e 2 ml de solução de micronutrientes (MALCA & ULLSTRUP, 1962). A solução de micronutrientes foi preparada segundo LILLY & BARNETT (1951), através do emprego de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 723,5 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 439,8 mg; e $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 203,0 mg, dissolvidos em 1000 ml de água destilada e desmineralizada. A solução assim preparada foi clarificada com ácido sulfúrico.

Os meios de cultura utilizados no estudo das fontes de nitrogênio sobre a esporulação do isolado "7L" foram preparados a partir de um meio basal ao qual adicionaram-se, separadamente, as fontes de nitrogênio. O meio basal apresentou a seguinte composição: KH_2PO_4 , 1,0 g; $MgSO_4$, 0,5 g; e ágar, 10,0 g (LILLY & BARNETT, 1951), quantidade suficiente para 1000 ml de água destilada e desmineralizada. As fontes de

nitrogênio empregadas foram em número de quatro, sendo duas orgânicas (ca-seína e asparagina) e duas inorgânicas (nitrato de potássio - KNO_3 e sulfato de amônia - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). A quantidade de nitrogênio usada para cada fonte foi padronizada para um teor equivalente a 0,373 g de N por litro de meio de cultura (MALCA & ULLSTRUP, 1962). A fonte de carbono empregada foi lactose, numa quantidade equivalente a 10,0 g de carbono por litro do meio de cultura.

4.3. Isolamento do Patógeno e sua Preservação

O isolamento do patógeno foi efetuado a partir de lesões foliares, em tecidos previamente desinfetados superficialmente, mantidos em condições de umidade elevada durante um período de 48 horas. Este ambiente úmido foi conseguido mediante o emprego de placas de Petri esterilizadas contendo papel de filtro sobre o qual foram adicionados 2 ml de água destilada estéril. A desinfecção superficial dos tecidos foi feita através da imersão dos mesmos, durante 1 minuto, em uma solução obtida pela diluição de uma parte de hipoclorito de sódio (QBoa), contendo 5% de cloro ativo, para três partes de água destilada estéril.

Em condições assépticas, com auxílio de uma lupa estereoscópica e de uma agulha de laboratório, fez-se a transferência de conídios do fungo, desenvolvidos em câmara úmida, para o meio de cultura desejado.

Foi seguido o mesmo procedimento para o reisolamento do patógeno de lesões pequenas e grandes, formadas em folhas de milho inoculadas artificialmente.

A preservação do patógeno foi feita em tecido foliar, destacado de plantas de milho que apresentaram reação de suscetibilidade durante os experimentos realizados. As folhas contendo lesões características foram secadas entre folhas de jornal, e depois mantidas à temperatura ambiente, em sacos de papel devidamente identificados. O material assim acondicionado serviu como fonte de inóculo durante o desenvolvimento dos trabalhos experimentais.

4.4. Preparo da Suspensão de Conídios

Durante a execução dos trabalhos, foram empregadas suspensões de conídios obtidas através da adição de 10 ml de uma solução de água estéril mais o espalhante tween-80, a cada placa de Petri contendo ou o meio de cultura com o crescimento do fungo ou o tecido foliar sobre o qual o patógeno esporulou. A solução contendo tween-80 foi preparada usando-se uma gota do produto para 100 ml de água destilada estéril. Um pincel foi passado sobre a superfície do meio, a fim de se conseguir uma maior liberação dos conídios. A suspensão contendo as estruturas do patógeno foi passada através de duas camadas de gaze esterilizada, a fim de se eliminarem fragmentos de meio de cultura e reduzir a quantidade de micélio em suspensão.

4.5. Caracterização do Patógeno

A caracterização do patógeno envolveu estudos sobre algumas de suas características fisiológicas que possibilitassem o conhecimento de condições para obtenção de inóculo necessário aos trabalhos experimentais de inoculação e, também, estudos sobre a morfologia dos conídios que permitissem a identificação do patógeno, juntamente com os testes de patogenicidade.

4.5.1. Características fisiológicas

Nos estudos relacionados com a fisiologia do patógeno, procurou-se conhecer o melhor meio de cultura para crescimento e esporulação dos isolados "7L" e "Jac" e, também, a melhor fonte de nitrogênio para crescimento e esporulação do isolado "7L", fazendo-se variar a temperatura e o período de leitura.

4.5.1.1. Influência do meio de cultura no crescimento linear e esporulação dos isolados "7L" e "Jac"

Os meios de cultura utilizados para o estudo foram os seguintes: BDA, CZAPEK, LCH e NA, já descritos no item 4.2.

A inoculação das placas contendo os diferentes meios de cultura foi feita através da transferência de discos do meio de BDA (5 mm de diâmetro) com as estruturas de reprodução do patógeno, para o centro

de cada placa de Petri. As placas assim preparadas foram mantidas à temperatura de 28°C, em estufa, sem iluminação interna, até o período de 120 horas, quando o crescimento do fungo, em alguns meios atingiu o diâmetro da placa.

As leituras referentes ao crescimento linear foram efetuadas em intervalos de 24 horas, através da medida de dois diâmetros das colônias, perpendiculares entre si, com auxílio de uma régua milimetrada.

Para determinação da esporulação, foram efetuadas avaliações após o período de 120 horas de incubação, mediante o emprego da câmara de Neubauer (hemocitômetro). Para esta avaliação foi feita uma suspensão de conídios, seguindo-se a mesma técnica descrita no item 4.4.

Este experimento constou de 8 tratamentos representados pelos quatro meios de cultura e os dois isolados do patógeno. Foi seguido um delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições. A análise estatística dos resultados obedeceu a um esquema fatorial 4 x 2.

4.5.1.2. Influência da fonte de nitrogênio, temperatura e período de leitura na esporulação do isolado "7L"

Neste ensaio, foram utilizadas 4 fontes de nitrogênio, nitrato de potássio, asparagina, sulfato de amônia e caseína hidrolizada adicionadas separadamente ao meio basal (LILLY & BARNETT, 1951), conforme descrito no item 4.2.

As placas foram inoculadas com uma suspensão de conídios

preparada como descrito no item 4.4., sendo modificada no que concerne à substituição da água destilada pela água desmineralizada estéril e, também, no que tange à eliminação do emprego do tween-80. Cada placa recebeu 0,2 ml da suspensão de conídios, fazendo-se uma distribuição uniforme pela superfície do meio, com auxílio de uma espátula de Drigalsky. As placas assim preparadas foram mantidas às temperaturas de 23°C e 28°C, em estufas sem iluminação interna.

As avaliações para esporulação do isolado "7L" foram efetuadas em 3 períodos distintos de incubação: 7, 14 e 21 dias, através de contagens dos conídios em câmara de Neubauer, sendo o resultado expresso em conídios por mililitro $\times 10^4$. Para cada avaliação, nos diferentes períodos, fez-se uma suspensão de conídios preparada conforme descrito no item 4.4.

O ensaio constou de 24 tratamentos, representados pelas 4 fontes de nitrogênio, 2 temperaturas e 3 períodos de leitura. Seguiu-se um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições. Foi realizada uma análise estatística obedecendo-se um esquema fatorial $4 \times 2 \times 3$.

4.5.2. Características morfológicas

Os estudos da morfologia dos conídios foram feitos para os isolados "7L" e "Jac", produzidos em diferentes meios de cultura e também em tecido foliar de milho, observando-se o comprimento, largura, formato, septação e coloração dos citados conídios. As medições foram feitas mediante o emprego do micrômetro de Baush & Lomb. Para cada substrato utilizado foram efetuadas 100 medições de conídios tomados ao acaso.

4.5.2.1. Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em diferentes meios de cultura

Placas de Petri contendo os meios de BDA, CZAPŁK, NA e LCH foram inoculadas com discos de meio de BDA (5 mm de diâmetro) contendo as estruturas do patógeno em estudo, e mantidas à temperatura de 28°C, durante 6 dias. Foi seguido um delineamento inteiramente casualizado, com 8 tratamentos, representados pelos dois isolados e os quatro meios de cultura, sendo 5 o número de repetições.

Após o período de 6 dias foram efetuadas as determinações para o tamanho dos conídios, tanto para o isolado "7L" como para o isolado "Jac", partindo-se de suspensões feitas para cada meio de cultura. O preparo da suspensão seguiu a mesma técnica descrita no item 4.4. Foram feitas cinco repetições, representando cada uma delas 20 medições de conídios tomados ao acaso, de modo a perfazer um total de 100 medições de conídios por meio de cultura.

Para verificação da significância das médias do comprimento dos conídios, obtidas nos diferentes meios de cultura e envolvendo os dois isolados, foi efetuada análise estatística, seguindo-se um esquema fatorial 4×2 .

4.5.2.2. Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em tecido foliar de milho

Folhas de milho, linhagem 929-B-5, com lesões típicas para os isolados, resultantes dos testes de patogenicidade, após desinfecção superficial foram mantidas em câmara úmida, durante 96 horas, à temperatu

ra ambiente, aproximadamente 26°C. A desinfecção superficial dos tecidos foliares foi feita do mesmo modo descrito para o isolamento do patógeno, conforme item 4.3. A câmara úmida consistiu no emprego de placas de Petri, contendo papel de filtro umedecido com água estéril, após prévia esterilização.

Após o período de 96 horas, procedeu-se à preparação da suspensão de conídios, como descrito no item 4.4. Para cada isolado foram feitas 10 amostragens, procedendo-se em cada amostragem a medições de 10 conídios tomados ao acaso.

A verificação da significância para diferenças entre as médias obtidas para o comprimento dos conídios dos isolados "7L" e "Jac", produzidos em substrato natural, foi feita através do teste "t".

4.6. Testes de Patogenicidade

4.6.1. Generalidades

Os testes de patogenicidade foram realizados em plantas de milho, linhagens S2 e S3, quando no estágio de 4 a 5 folhas. Este estágio foi atingido aproximadamente entre 14 a 15 dias após o plantio. As plantas, num total de 5 por vaso, foram inoculadas no final da tarde por aspersão da parte aérea e, em seguida, colocadas em câmara úmida, onde permaneceram por um período de 16 horas. Após este período, os vasos foram removidos da câmara úmida e mantidas sobre as mesas da casa-de-vegetação durante 12 a 14 dias, quando foram efetuadas as leituras finais.

Em todos os testes de patogenicidade conduzidos, os vasos foram distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, sendo incluídos vasos testemunhas, contendo plantas não inoculadas, para termo de comparação.

O inóculo utilizado nos testes de patogenicidade consistiu de uma suspensão de conídios preparada do mesmo modo descrito nos itens 4.3 e 4.4.

A padronização do inóculo foi efetuada mediante a determinação da concentração de conídios em câmara de contagem (hemocitômetro de Hausser & Son), seguindo-se a sua diluição com água destilada para 5000 conídios por ml. A técnica de preparação e padronização do inóculo foi a mesma para ambos os isolados.

Para cada teste de patogenicidade, foi feita uma avaliação de 12 a 14 dias após a inoculação. O critério de avaliação empregado, no entanto, foi modificado quando novos conhecimentos foram adquiridos. Por tanto, a avaliação de cada experimento será descrita no texto dos testes de patogenicidade respectivos.

4.6.2. Testes de patogenicidade em linhagens S2 de milho

4.6.2.1. Teste nº 1

As linhagens utilizadas neste teste de patogenicidade, num total de 26, fornecidas pelo Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", foram as seguintes:

Composto A - Linhagens: 209, 495, 1114, 1166, 1201-1, 1285, 1409, 1411, 1625, 1778, 1788, 2070, 2697.

Composto B - Linhagens: 489-2, 544, 615-2, 635-1, 642-2, 653, 682-1, 717, 753, 934, 1033, 1109-1, 1177,

O experimento constou de 52 tratamentos, representados pelas 26 linhagens e os 2 isolados, com duas repetições. O delineamento seguido foi o inteiramente casualizado.

Este teste de patogenicidade foi efetuado entre os meses de maio e junho/75, tendo a temperatura variado de 22°C a 30°C.

A avaliação dos sintomas apresentados pelas linhagens testadas foi efetuada 14 dias após a inoculação, sendo observado o aspecto da lesão, com relação ao seu tamanho, formato e coloração. Assim sendo, foram adotados os critérios apresentados abaixo, para os dois isolados testados:

I s o l a d o "7L"

- R₁ - sem lesões ou apresentando pontos cloróticos.
- R₂ - lesões cloróticas e em forma de riscas estreitas, estas apresentando um aspecto piramidal.
- R₃ - lesões variando de pontos circulares a elípticos. As maiores apresentando tecido necrosado na parte central, com ou sem bordo pigmentado e halo clorótico.
- S - lesões bem definidas e delimitadas pelas nervuras, aspecto tendendo para o retangular, com a parte central constituída de tecido necrótico e podendo apresentar bordos carmins. Lesões maiores com 9 a 10 mm de comprimento por 2 a 5 mm de maior largura.

I s o l a d o "Jac"

- R_1 - sem lesões ou apresentando pequenos pontos cloróticos.
- R_2 - lesões cloróticas, tendendo para riscas cloróticas na fase inicial de alongamento. Lesões maiores apresentando aspecto elíptico.
- R_3 - lesões circulares, tendendo para elípticas. Lesões maiores com centro necrótico e delimitadas pelas nervuras.
- S - lesões elípticas com centro de coloração palha, podendo apresentar bordo pigmentado e confluência das lesões. Lesões maiores podendo alcançar 5 a 7 mm de comprimento por 2 a 3 mm de maior largura.

4.6.2.2. Teste nº 2

As linhagens utilizadas como hospedeiro neste teste de patogenicidade foram fornecidas pelo Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", sendo as seguintes:

- Composto A - Linhagens: 70-2, 133-1, 260-1, 405-2, 527 ;
598, 668, 909, 1117, 1224, 1390, 1534, 1659 ,
- Composto B - Linhagens: 21-1, 64, 139-2, 187-2, 255, 329-1,
397-1, 453-1, 539, 605, 688, 780, 948-2.

Constou este experimento de 52 tratamentos com duas repetições. Os tratamentos foram representados pelas 26 linhagens e os 2 isolados do patógeno. A distribuição dos vasos na casa-de-vegetação seguiu um delineamento inteiramente casualizado.

O experimento foi realizado entre os meses de setembro e outubro de 1975, tendo ocorrido uma variação de temperatura entre 20°C e 32°C.

A avaliação dos sintomas apresentados pelas linhagens testadas foi feita 12 dias após a inoculação das plantas, sendo adotado o mesmo critério do teste anterior. Por ocasião da leitura final, foram efetuadas medidas para o tamanho das lesões, em algumas linhagens, tomando-se ao acaso 3 lesões por folha nas duas repetições e estabelecendo-se a variação no tamanho da lesão.

4.6.3. Teste de patogenicidade em linhagens S3 de milho - Teste nº3

As linhagens S3 utilizadas neste teste de patogenicidade resultaram de plantas de linhagens S2, que se mostraram suscetíveis aos isolados "7L" e "Jac", quando testadas em casa-de-vegetação, sendo em seguida transplantadas para o campo do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, onde foram autofecundadas. Após obtenção das sementes das plantas autofecundadas, um total de 11 linhagens S3 foram testadas, sendo elas: 21-1B-1, 64-B-1, 86-1A-1, 313-B-1, 316-B-1, 378-B-1, 453-1B-1, 688-B-1, 929-B-1, 933-2B-1, 3022-A-1.

O delineamento utilizado neste experimento foi o inteiramente casualizado, consistindo de 22 tratamentos com duas repetições. Os tratamentos foram representados pelas 11 linhagens e os 2 isolados em estudo.

Este teste de patogenicidade foi realizado no período com-

preendido entre janeiro e fevereiro de 1976. As condições de temperatura na casa-de-vegetação variaram de 23°C a 36°C.

A avaliação dos sintomas apresentados pelas linhagens S3 foi feita 12 dias após a inoculação, tendo havido modificação no critério anteriormente adotado. Desta forma, neste teste de patogenicidade a reação das plantas aos isolados foi registrada como resistente (R), moderadamente resistente (MR) e suscetível (S), cujas características são apresentadas a seguir:

R - pontos cloróticos e clorótico-necróticos.

MR - lesões do tipo suscetível, porém de menor tamanho e menor número, com presença de pontos cloróticos e necróticos.

S - lesões alongadas, bem definidas, podendo apresentar ou não bordo marrom.

4.6.4. Teste de patogenicidade em progênies S3 de milho e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de H. carbonum - Teste nº 4.

As plantas utilizadas neste teste de patogenicidade foram obtidas mediante seleção prévia em linhagens S2, para a reação de resistência ou suscetibilidade aos 2 isolados do patógeno, em condições de casa-de-vegetação. Em seguida foram transplantadas para o campo do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, e posteriormente autofecundadas. Também foram utilizadas linhagens diferenciais fornecidas pelo Dr. A.J. ULLSTRUP da Universidade de Purdue, Indiana, a fim de identificar a ocorrência de possíveis raças.

As linhagens utilizadas foram as seguintes:

Linhagens S3: 64-B-1; 70-2A-1; 86-1A-1; 86-1A-2; 313-B-1;
313-B-2; 313-B-3; 313-B-4; 313-B-5; 316-B-1;
483-B-2; 483-B-3; 483-B-4; 688-B-1; 929-B-1;
929-B-2; 929-B-3; 929-B-4; 929-B-5; 1534-A-1.

Linhagens diferenciais: K61, K61-1; Pr e Pr-1.

Constou este experimento de 48 tratamentos, representados pelas 24 linhagens e os dois isolados em estudo, sendo repetido duas vezes. A distribuição dos vasos na casa-de-vegetação seguiu um delineamento inteiramente casualizado.

O presente teste de patogenicidade foi realizado no período compreendido entre fevereiro e março de 1976, tendo a temperatura variado de 24°C a 35°C.

A avaliação dos sintomas apresentados pelas linhagens S3 e diferenciais testadas foi feita 12 dias após a inoculação das plantas, seguindo-se o mesmo critério adotado no experimento constante do item 4.6.3.

4.6.5. Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho- Teste nº 5

As plantas utilizadas neste teste de patogenicidade foram linhagens S3, oriundas de linhagens S2 semeadas no campo do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, e posteriormente autofecundadas e também, algumas progênies S3 originadas de plantas de linhagens S2, selecionadas em

casa-de-vegetação, quanto à resistência ou suscetibilidade aos isolados do patógeno e transplantadas para o campo, sendo posteriormente autofecundadas. Assim sendo, um total de 47 linhagens foram testadas, sendo elas: 19-A-2; 20-A-2; 31-A-1; 48-A-1; 64-2A-1; 64-B-3; 68-1A-1; 68-2A-2; 70-2A-4; 72-A-3; 83-A-1; 86-1A-1; 88-A-3; 89-A-2; 133-1A-2; 139-2B-2 ; 187-2B-5; 231-B-4; 255-B-1; 260-1A-2; 313-B-1; 316-B-1; 319-1B-1; 329-1B-1; 388-B-1; 397-1B-3; 405-2A-1; 453-1B-3; 483-B-3; 527-A-2; 531-B-3; 539-B-3; 546-B-3; 605-B-3; 668-A-1; 688-B-2; 751-1B-3; 780-B-1; 909-A-1; 948-2B-1; 948-2B-3; 929-B-5; 1078-B-1; 1117-A-2; 1224-A-2; 1390-A-1 e 1534-A-2.

O delineamento utilizado neste experimento foi o inteiramente casualizado, com 94 tratamentos e duas repetições. Os tratamentos foram representados pelas 47 linhagens testadas e os 2 isolados do patógeno utilizados.

Este teste de patogenicidade foi realizado no período correspondente entre abril e maio de 1976, tendo a temperatura variado de 22°C a 34°C.

A avaliação dos sintomas apresentados pelas linhagens 53 foi efetuada 12 dias após a inoculação das plantas, seguindo-se o mesmo critério adotado no experimento constante do item 4.6.3.

4.6.6. Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho para os reisolados obtidos de lesões de diferentes tamanhos formadas em material suscetível.- Teste nº 6

Para este teste de patogenicidade foram utilizados os seguintes hospedeiros: 20-A-2; 88-A-3; 187-2B-5; 929-B-3. Quatro isolados ("7L" LP, "7L" LG, "Jac" LP e "Jac" LG) oriundos de lesões pequenas e grandes apresentadas pela linhagem 929-B-5, constituíram o inóculo utilizado neste experimento, objetivando conhecer a influência do tamanho da lesão na patogenicidade dos isolados.

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado, consistindo de 16 tratamentos com duas repetições.

Este experimento foi realizado durante o mês de julho de 1976, tendo a temperatura na casa-de-vegetação variado de 23°C a 34°C.

A avaliação deste teste de patogenicidade foi efetuada 12 dias após a inoculação das plantas, seguindo-se o mesmo critério adotado no experimento constante do item 4.6.3.

Durante o período correspondente ao presente teste, foram feitas observações sobre o aparecimento e desenvolvimento das lesões, iniciando-se as leituras 24 horas após a inoculação das plantas.

A determinação do tamanho das lesões foi feita mediante o emprego de um paquímetro, efetuando-se a medida de 3 por linhagem, nas duas repetições, em intervalos de 24 horas. As lesões foram marcadas, de modo a possibilitar o estudo diário do seu desenvolvimento durante 9 dias.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do Patógeno

Os resultados obtidos para caracterização dos isolados "7L" e "Jac", através dos estudos de alguns aspectos da fisiologia do patógeno e também da morfologia dos conídios são apresentados a seguir:

5.1.1. Características fisiológicas

Em todos os meios de cultura empregados observou-se que os isolados "7L" e "Jac" apresentaram características culturais semelhantes, formando colônias escuras, quase pretas, com aspecto de feltro.

5.1.1.1. Influência do meio de cultura no crescimento dos isolados "7L" e "Jac".

Os dados obtidos para o crescimento linear, medidos em milímetro após 120 horas, e as respectivas análises de variância são apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 do Apêndice.

A análise de variância dos dados (Tabela 2, do Apêndice) revelou um efeito altamente significativo para a influência dos diferentes meios de cultura no crescimento linear dos dois isolados. As medidas de crescimento linear, considerando-os os dois isolados em conjunto, obtidas nos meios de LCH, CZAPEK, BDA e NA foram respectivamente: 90,00; 89,16 ; 88,00 e 70,33.

O teste de Tukey, com dms igual a 13,22, ao nível de 1% de probabilidade, revelou diferença altamente significativa para as medidas de crescimento dos isolados nos meios de LCH, CZAPEK e BDA, quando comparado com aquela obtida no meio de NA. Não houve diferença estatística entre as médias de crescimento dos dois isolados, considerados em conjunto nos três primeiros meios de cultura.

A análise de variância (Tabela 2, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação meios x isolados, mais aqueles devidos a meios de cultura, para o estudo do efeito de meios dentro de isolados, revelou diferenças significativas, aos níveis de 5% e 1% de probabilidades, respectivamente para o crescimento linear dos isolados "7L" e "Jac" nos diferentes meios de cultura.

As médias para o crescimento linear dos dois isolados nos

diferentes meios de cultura são apresentados a seguir:

Isolados	Meios de Cultura			
	BDA	LCH	CZAPEK	NA
"7L"	90,00 a ^{a/}	90,00 a	88,33 ab	74,33 b
"Jac"	86,00 a	90,00 a	90,00 a	66,33 b

a/ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si.

O teste de Tukey, com dms igual a 14,70 e 18,83, respectivamente, aos níveis de 5% e 1% de probabilidades, revelou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as médias de crescimento linear do isolado "7L" observadas nos meios de BDA e LCH, e aquela obtida em meio de NA. Não foi observada diferença estatística entre as médias de crescimento obtidas nos 3 primeiros meios, e também entre as médias de crescimento nos meios de CZAPEK e de NA. Com relação ao isolado "Jac", o teste de Tukey mostrou diferença altamente significativa entre as médias de crescimento obtidas nos meios de BDA, LCH e CZAPEK e aquela obtida em meio de NA.

A análise de variância (Tabela 4, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade para a interação isolados x meios de cultura, mais aqueles devidos a isolados, para o estudo do efeito de isolados dentro de meios de cultura, não mostrou diferença significativa.

5.1.1.2. Influência do meio de cultura na esporulação dos isolados "7L" e "Jac"

Os dados obtidos para esporulação dos isolados "7L" e "Jac", após um período de 120 horas, nos diferentes meios de cultura, e as respectivas análises de variâncias são apresentados nas Tabelas 5, 6, 7 e 8, do Apêndice.

A análise de variância (Tabela 6, do Apêndice) revelou um efeito altamente significativo para os diferentes meios de cultura na esporulação dos isolados "7L" e "Jac", e também para a interação meios de cultura x isolados.

As médias para a esporulação dos dois isolados considerados em conjunto, obtidas nos meios de LCH, CZAPEK, BDA e NA foram respectivamente, 384,50, 223,83, 196,66 e 105,00. O teste de Tukey, com dm s igual a 26,34 e 33,75, respectivamente, aos níveis de 5% e 1% de probabilidades, revelou uma diferença altamente significativa entre a média de esporulação observada no meio de LCH e aquela observada nos demais meios de cultura, e também uma diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, entre a média de esporulação obtida nos meios de CZAPEK e aquela obtida no meio de BDA. A média da esporulação obtida no meio de BDA revelou uma diferença altamente significativa em relação àquela obtida no meio de NA.

A análise de variância (Tabela 7, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação meios de cultura x isolados, mais aqueles devidos a meios de cultura, para o estudo do efeito de meios dentro de isolados, revelou significância ao nível de 1% de probabilidade para a esporulação dos isolados "7L" e "Jac" nos diferentes meios de cultura.

As médias para esporulação dos dois isolados nas diferentes combinações meios de cultura e isolados são apresentadas a seguir:

Isolados	Meios de Cultura			
	LCH	CZAPEK	BDA	NA
"7L"	350,00 a ^{a/}	241,66 b	201,66 b	112,00 c
"Jac"	419,00 a	206,00 b	191,66 b	98,00 c

a/ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si.

A diferença mínima significativa para o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade foi 47,73. A comparação das médias para a esporulação do isolado "7L" nos diferentes meios de cultura, através do teste de Tukey, revelou uma diferença altamente significativa para a média da esporulação produzida em LCH e aquela produzida nos demais meios de cultura. As médias de esporulação nos meios de CZAPEK e BDA diferiram, ao nível de 1% de probabilidade, daquela obtida em NA.

A comparação das médias para esporulação do isolado "Jac" nos diferentes meios de cultura revelou diferença altamente significante entre a obtida em LCH e aquela obtida nos demais meios de cultura. As médias de esporulação observadas nos meios de CZAPEK e BDA não diferiram entre si, mas diferiram da média de esporulação obtida em meio de NA, ao nível de 1% de probabilidade.

A análise de variância (Tabela 8, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação isolados x meios de cultura, mais aqueles devidos a isolados, para o estudo do efeito destes últimos dentro de meios de cultura, revelou significância aos níveis de 5% e 1%

de probabilidades, para a esporulação dos isolados "7L" e "Jac", respectivamente, nos meios de CZAPEK e LCH.

5.1.1.3. Influência da fonte de nitrogênio, temperatura e período de leitura na esporulação do isolado "7L".

Os dados obtidos para esporulação do isolado "7L" em diferentes fontes de nitrogênio, fazendo-se variar temperatura e períodos de leitura, e as respectivas análises de variância são apresentados nas Tabelas 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 do Apêndice.

A análise de variância (Tabela 10, do Apêndice) para dados transformados em \sqrt{x} , revelou um efeito altamente significativo para a influência das fontes de nitrogênio, temperatura e períodos de leitura na esporulação do isolado "7L" e também para a interação fontes de nitrogênio x períodos de leitura, na esporulação do mesmo isolado.

As médias da esporulação obtidas nos meios contendo como fonte de nitrogênio asparagina, nitrato de potássio, caseína e sulfato de amônia foram, respectivamente, 10,17, 10,10, 9,46 e 7,04.

O teste de Tukey, com dms igual a 1,52, para o nível de 1% de probabilidade, revelou diferença altamente significativa entre a esporulação do isolado "7L" nos meios contendo asparagina, nitrato de potássio e caseína como fonte de nitrogênio, e aquela observada em sulfato de amônia. As médias de esporulação obtidas nas três primeiras fontes não diferiram entre si.

As médias para esporulação obtidas às temperaturas de 23°C

e 28°C foram, respectivamente, 9,78 e 8,60.

As médias para esporulação obtidas nos períodos de leitura correspondentes a 7, 14 e 21 dias foram, respectivamente, 8,38, 7,83 e 11,36.

O teste de Tukey, com dms igual a 1,23 para o nível de 1% de probabilidade, revelou uma diferença altamente significativa entre a média da esporulação obtida aos 21 dias e aquelas obtidas nos períodos de 7 e 14 dias. Não foi observada diferença estatística entre as médias de esporulação nos dois últimos períodos.

A análise de variância (Tabela 11, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação fontes de N x períodos de leitura, mais aqueles devidos a fontes, para o estudo do efeito das fontes de nitrogênio dentro de períodos de leitura, na esporulação do isolado "7L", revelou um efeito altamente significativo para esporulação nas diferentes fontes de nitrogênio dentro de 7, 14 e 21 dias.

As médias para esporulação do isolado "7L" nas diferentes fontes de nitrogênio para os diferentes períodos de leitura são apresentadas a seguir:

Períodos em dias	Fontes de Nitrogênio			
	Asparagina	KNO ₃	Caseína	(NH ₄) ₂ SO ₄
21	13,78 ^{a/}	12,36 a	12,06 a	7,24 b
14	9,78 a	6,57 b	8,57 ab	6,43 b
7	6,96 b	11,37 a	7,76 b	7,44 b

a/ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si

O teste de Tukey, com dms igual a 2,64, ao nível de 1% de probabilidade, revelou uma diferença altamente significativa entre as médias de esporulação do isolado "7L", observadas no período de 21 dias, nos meios contendo asparagina, nitrato de potássio, caseína e aquela obtida em sulfato de amônia. No período correspondente a 14 dias, a média de esporulação obtida em asparagina diferiu, ao nível de 1% de probabilidade, daquelas obtidas em nitrato de potássio e sulfato de amônia, porém não apresentou diferença estatística quando comparada com a média de esporulação obtida em caseína. As esporulações observadas nos meios de nitrato de potássio, caseína e sulfato de amônia não diferiram significativamente entre si. No período de 7 dias, a média de esporulação em nitrato de potássio revelou uma diferença altamente significativa quando comparada com aquelas obtidas nas demais fontes de nitrogênio. Não houve significância estatística entre as médias de esporulação obtidas nos meios contendo asparagina, caseína e sulfato de amônia, no mesmo período de 7 dias.

A análise de variância (Tabela 12, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação períodos x fontes de N, mais aqueles devidos a períodos de leituras, para o estudo da influência destes últimos dentro de fontes de nitrogênio, na esporulação do isolado "7L", revelou um efeito altamente significativo para esporulação do isolado "7L" nos períodos dentro de nitrato de potássio, asparagina e caseína.

As médias para esporulação nos diferentes períodos são apresentadas a seguir, para as diferentes fontes de nitrogênio:

Períodos em dias	Fontes de Nitrogênio			
	Asparagina	KNO ₃	Caseína	(NH ₄) ₂ SO ₄
21	13,78 ^a /	12,36 a	12,06 a	7,24 a
14	9,78 b	6,57 b	8,57 b	6,43 a
7	6,96 c	11,37 a	7,76 b	7,44 a

a/ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si

O teste de Tukey, com dms igual a 2,46, ao nível de 1% de probabilidade, revelou uma diferença altamente significativa entre a média da esporulação obtida em asparagina no período de 21 dias, e aquelas obtidas nos períodos de 14 e 7 dias. As médias para a esporulação obtidas nos períodos de 14 e 7 dias no referido meio também revelaram diferenças altamente significativas. As médias para esporulação em nitrato de potássio revelaram uma diferença altamente significativa entre aquelas obtidas nos períodos de 21 e 7 dias e a obtida no período de 14 dias. Para as médias de esporulação em caseína o teste de Tukey revelou uma diferença altamente significativa entre a produção de conídios no período de 21 dias e aquelas obtidas nos períodos de 14 e 7 dias. Não houve diferença significante entre as médias de esporulação nos períodos de 14 e 7 dias, na mesma fonte de caseína. As médias de esporulação em meio de sulfato de amônia não diferiram significativamente entre si nos 3 períodos de leitura.

A análise de variância (Tabela 13, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação fontes de N x temperatura, mais aqueles devidos a fontes de N, para o estudo da influência das fontes de N dentro de temperaturas, revelou um efeito altamente significativo para a esporulação do isolado "7L" nas fontes dentro das temperaturas de 23°C e 28°C.

As médias para a esporulação do isolado "7L" nas diferentes combinações fonte de N e temperatura são apresentadas abaixo:

Temperatura	Fontes de Nitrogênio			
	Asparagina	KNO ₃	Caseína	(NH ₄) ₂ SO ₄
23°C	11,34 a ^{a/}	10,83 a	9,99 a	6,98 b
28°C	9,01 a	9,37 a	8,94 a	7,09 b

a/ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si

O teste de Tukey, com dms igual a 2,15, ao nível de 1% de probabilidade, revelou uma diferença altamente significativa entre as médias de esporulação obtidas à temperatura de 23°C nos meios contendo asparagina, nitrato de potássio e caseína e aquela obtida em meio de sulfato de amônia. Não foi observada diferença significativa entre as médias das três primeiras fontes de nitrogênio. As médias para a esporulação, observadas à temperatura de 28°C, nas fontes de asparagina, nitrato de potássio e caseína, não diferiram entre si, mas, o teste de Tukey revelou uma diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade, entre a média de esporulação em nitrato de potássio e aquela obtida em sulfato de amônia.

A análise de variância (Tabela 14, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação temperaturas x fontes de N, mais aquele devido à temperatura, para o estudo da influência desta última dentro de fontes de N sobre a esporulação do isolado "7L", revelou um efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade para a esporulação do isolado "7L" a 23°C e 28°C no meio contendo nitrato de potássio co

mo fonte de nitrogênio. Também, uma diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade para a esporulação do mesmo isolado às temperaturas de 23°C e 28°C em asparagina.

A análise de variância (Tabela 15, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação período de leitura x temperaturas, mais aqueles devidos a períodos, para o estudo da influência do período de leitura dentro das temperaturas na esporulação do isolado "7L", revelou efeitos altamente significativos para a esporulação nos períodos dentro de 28°C e de 23°C.

As médias para as diferentes combinações temperaturas e períodos de leitura são apresentadas a seguir:

Temperatura	Períodos de Leitura		
	7	14	21
23°C	8,66 b ^{a/}	8,72 b	11,97 a
28°C	8,11 b	6,95 b	10,75 a

a/ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si

O teste de Tukey, com dms igual a 1,74, ao nível de 1% de probabilidade, revelou uma diferença altamente significativa entre as médias de esporulação do isolado "7L" obtidas no período de 21 dias, às temperaturas de 23°C e 28°C, e aquelas obtidas nos períodos de 14 e 7 dias às mesmas temperaturas.

A análise de variância (Tabela 16, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação temperaturas x períodos de leitura, mais aquele devido à temperatura, para o estudo da influência

desta última dentro de períodos de leitura na esporulação do isolado "7L", revelou efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade, para as médias de esporulação obtidas nas temperaturas de 23°C e 28°C, no período de 21 dias. No período de 14 dias, ocorreu uma diferença significativa, ao nível de 1% de probabilidade, para as médias de esporulação obtidas a 23°C e 28°C.

5.1.2. Características morfológicas

Os estudos desenvolvidos para identificação dos isolados do patógeno, considerando-se a morfologia dos conídios, mostraram que os conídios produzidos nos diferentes meios de cultura, bem como os produzidos em tecido foliar de milho, apresentavam semelhança morfológica, embora tenha sido observada considerável variabilidade quanto ao tamanho, septação, formato e coloração, dentro de cada isolado. Assim sendo, os conídios apresentaram-se de retos a moderadamente curvos, com as extremidades arredondadas, e na maioria produzidos em grupos de 3 a 6, nas extremidades dos conidióforos (Fig. 1). A coloração variou de marrom-oliváceo a marrom-escuro, sendo esta variação comum tanto nos conídios produzidos nos diferentes meios de cultura, como naqueles produzidos em tecido foliar.



Figura 1. Conídios de H. carbonum na extremidade do conidióforo

5.1.2.1. Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em diferentes meios de cultura

Os dados obtidos para o tamanho dos conídios dos isolados "7L" e "Jac" produzidos em diferentes meios de cultura são apresentados na Tabela 17, do Apêndice, enquanto que aqueles relativos ao comprimento dos conídios dos dois isolados e as respectivas análises de variância são apresentados nas Tabelas 18, 19, 20 e 21, do Apêndice.

A análise de variância (Tabela 19, do Apêndice) revelou um efeito altamente significativo para a influência dos meios de cultura no comprimento dos conídios dos isolados "7L" e "Jac". Revelou igualmente efeitos significativos, ao nível de 5% de probabilidade, para o comprimento dos conídios dos isolados "Jac" e "7L" e para a interação meios de cultura x isolados.

As médias para o comprimento dos conídios, considerando-se os 2 isolados em conjunto, obtidas nos meios de LCH, BDA, CZAPEK e NA foram respectivamente, 74,96, 67,03, 61,02 e 57,31. O teste de Tukey, com dms igual a 4,79, ao nível de 1% de probabilidade, revelou diferença altamente significativa entre o comprimento dos conídios em meio de LCH e nos demais meios de cultura. A média do comprimento dos conídios observada no meio de BDA, também mostrou uma diferença altamente significativa quando comparada com as médias obtidas nos meios de CZAPEK e NA. Não foi observada diferença estatística entre as médias de comprimento dos conídios produzidos nestes dois últimos meios de cultura.

A análise de variância (Tabela 20, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação meios de cultura x isolados, mais aqueles devidos a meios de cultura, para o estudo da influência de meios dentro de isolados, revelou efeitos altamente significativos pa-

ra o comprimento dos conídios nos diferentes meios de cultura.

As médias para o comprimento dos conídios dos isolados "Jac" e "7L", considerando-se as diferentes combinações para meios e isolados, são apresentadas a seguir:

Isolados	Meios de Cultura			
	LCH	BDA	CZAPEK	NA
"Jac"	75,36 a ^{a/}	67,23 b	65,17 b	57,99 c
"7L"	74,57 a	66,84 b	56,88 c	56,63 c

a/ Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si

O teste de Tukey, com dms igual a 5,49, ao nível de 1% de probabilidade, revelou diferença altamente significativa para o comprimento dos conídios do isolado "Jac" e também para o comprimento daqueles do isolado "7L" produzidos no meio de LCH em relação aos obtidos nos demais meios de cultura. As médias para o comprimento dos conídios do isolado "Jac" nos meios de BDA e CZAPEK diferiram, ao nível de 1% de probabilidade daquela obtida no meio de NA, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre o comprimento dos conídios do isolado "Jac" produzidos nos meios de BDA e CZAPEK. As médias do comprimento dos conídios do isolado "7L" produzidos no meio de BDA revelaram diferença altamente significativa, quando comparadas com aquelas produzidas nos meios de CZAPEK e NA. Não houve diferença estatística entre o comprimento dos conídios do isolado "7L" produzidos no meio de CZAPEK e aquele produzido no meio de NA.

A análise de variância (Tabela 21, do Apêndice) para o desdobramento dos graus de liberdade da interação isolados x meios de cultura, mais aqueles devidos a isolados, para o estudo da influência destes últimos dentro dos meios de cultura, revelou uma diferença altamente significativa entre os isolados "Jac" e "7L" no meio de CZAPEK. Os isolados nos demais meios de cultura não apresentaram diferença significativa entre si.

5.1.2.2. Morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em tecido foliar de milho.

Os resultados obtidos para a morfologia dos conídios produzidos pelos isolados "7L" e "Jac" em tecido foliar de milho são apresentados na Tabela 22, do Apêndice.

A morfologia dos conídios, apresentada por ambos os isolados, mostrou a mesma semelhança na variação. Examinando-se a média do comprimento obtido para cada isolado, numa amostragem representada por 100 conídios, foi observada uma diferença de $2,99 \mu$ em favor do isolado "Jac". A comparação das médias pelo teste "t" não revelou diferença significativa para o comprimento médio dos conídios entre o isolado "7L" e o isolado "Jac".

Portanto, os resultados indicaram uma variação no tamanho dos conídios, para o isolado "7L", correspondendo de $28,0 \mu$ a $100,0 \mu$ (média: $61,49 \mu$ a $73,03 \mu$) para o comprimento; $9,0 \mu$ a 20μ (média: $11,93 \mu$ a $17,43 \mu$) para a largura; 2 a 12 (média: 6,4 a 8,5) para o número de septos. Com relação ao isolado "Jac" foi observada uma variação no tamanho dos conídios, correspondendo de $25,0 \mu$ a $98,0 \mu$ (média: $65,53 \mu$ a $80,26 \mu$).

μ) para o comprimento; 8,0 μ a 19,0 μ (média: 12,98 μ a 14,21 μ) para a largura; 3 a 12 (média: 7,4 a 9,2) para o número de septos.

Pelas características morfológicas apresentadas pelos conídios nos diferentes substratos, e considerando os parâmetros apontados para H. carbonum, e ainda a confirmação pessoal por parte do Dr. A.J. ULLSTRUP da Universidade de Purdue, os isolados foram identificados como pertencentes à espécie H. carbonum.

5.2. Testes de Patogenicidade

Os vários testes de patogenicidade desenvolvidos para identificação do patógeno e conhecimento das fontes de resistência ao mesmo foram realizados em linhagens S2 e S3 de milho, sendo os resultados apresentados nos itens correspondentes.

5.2.1. Testes de patogenicidade em linhagens S2 de milho

5.2.1.1. Teste nº 1

Os resultados obtidos no presente teste de patogenicidade, envolvendo os dois isolados de H. carbonum, são os constantes da Tabela 2.

Tabela 2. Teste de patogenicidade em diferentes linhagens S2 de milho, para os isolados de H. carbonum, "7L" e "Jac"

Linhagens S2	Reação das Plantas							
	Isolado "7L"				Isolado "Jac"			
	R1	R2	R3	S	R1	R2	R3	S
Composto A								
209	<u>a/</u>	-	<u>b/</u>	+	+	-	-	+
495	-	-	+	+	-	+	-	+
1114	-	-	+	+	+	-	-	-
1166	-	-	-	+	-	-	-	+
1201-1	-	-	-	+	+	-	-	-
1285	-	-	+	-	+	-	-	-
1409	-	-	-	+	+	-	-	-
1411	-	-	+	+	+	-	+	-
1625	-	-	+	+	+	-	-	-
1778	-	-	+	+	+	-	+	-
1788	-	-	-	+	+	-	+	-
2070	-	-	+	+	+	+	-	-
2697	-	-	+	+	+	+	+	-
Composto B								
171	-	-	+	+	-	-	+	-
489-2	-	+	-	-	-	-	+	+
544	+	+	-	-	+	-	-	-
615-2	-	-	-	+	-	-	+	+
635-1	-	-	-	+	+	-	-	+
642-2	-	+	+	+	-	+	-	-
653	-	-	+	+	-	-	+	-
682-1	-	-	-	+	-	-	-	+
753	-	-	-	+	+	+	+	-
934	-	-	+	+	+	+	+	-
1033	-	-	+	+	-	+	+	-
1109-1	-	-	+	+	-	-	+	-
1177	-	-	+	+	-	+	-	+

a/ Ausência da ocorrência da reação em questão

b/ Ocorrência da reação em questão

Pelo exposto na Tabela 2, pode-se constatar a patogenicida de dos dois isolados de H. carbonum. Entretanto, foi verificado que as linhagens testadas reagiram de modo diferente quando inoculadas separadamente com os isolados "7L" e "Jac", denotando maior patogenicidade para o isolado "7L".

Embora tenha ocorrido segregação para resistência e suscetibilidade dentro de uma mesma linhagem, para a maioria dos casos com relação a ambos os isolados, foi verificado que as linhagens 1166 (Composto A) e 682-1 (Composto B) apresentaram a mesma reação de suscetibilidade quando inoculadas tanto com o isolado "7L", como com o isolado "Jac". Entretanto, com referência às linhagens 1201-1, 1409 e 1788 (Composto A), ocorreu uma reação diferencial, revelando diferença no comportamento dos dois isolados, quando inoculados nestes hospedeiros.

A manifestação dos sintomas nas linhagens que se comportaram como suscetíveis foi iniciada 24 horas após a inoculação na forma de pontos cloróticos. Os seedlings foram considerados resistentes ou suscetíveis pelo aspecto das lesões 12 a 14 dias após a inoculação, embora aos 8 dias já fossem observadas lesões com tamanho definido. Observou-se uma variação no tamanho das lesões, de linhagem para linhagem, dentro de uma mesma linhagem, e também numa mesma folha, quando inoculadas separadamente com os isolados "7L" e "Jac".

5.2.1.2. Teste nº 2

Os resultados obtidos neste teste de patogenicidade envolvendo os dois isolados "7L" e "Jac" são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teste de patogenicidade em diferentes linhagens S2 de milho, para os isolados de H. carbonum, "7L" e "Jac"

Linhagens S2	% de Plantas e Nível de Resistência Observado							
	Isolado "7L"				Isolado "Jac"			
	R1	R2	R3	S	R1	R2	R3	S
Composto A								
70-2	60,0	0,0	0,0	40,0	66,7	0,0	33,3	0,0
133-1	50,0	33,3	0,0	16,7	62,5	0,0	0,0	37,5
260-1	85,7	0,0	0,0	14,3	66,7	0,0	33,3	0,0
406-2	60,0	0,0	0,0	40,0	100,0	0,0	0,0	0,0
527	0,0	0,0	100,0	0,0	30,0	40,0	30,0	0,0
598	60,0	0,0	0,0	40,0	80,0	0,0	20,0	0,0
668	50,0	0,0	0,0	50,0	100,0	0,0	0,0	0,0
909	66,7	0,0	22,2	11,1	80,0	0,0	0,0	20,0
1117	70,0	30,0	0,0	0,0	60,0	0,0	40,0	0,0
1224	63,6	0,0	0,0	36,4	60,0	0,0	0,0	40,0
1390	80,0	0,0	10,0	10,0	55,6	0,0	44,4	0,0
1534	55,6	0,0	22,2	22,2	30,0	0,0	20,0	50,0
1659	75,0	25,0	0,0	0,0	66,7	33,3	0,0	0,0
Composto B								
21-1	60,0	0,0	0,0	40,0	71,4	0,0	0,0	28,6
64	42,9	0,0	28,6	28,6	0,0	44,4	33,3	22,2
139-2	50,0	0,0	10,0	40,0	50,0	50,0	0,0	0,0
187-2	70,0	0,0	10,0	20,0	100,0	0,0	0,0	0,0
255	0,0	0,0	75,0	25,0	66,7	33,3	0,0	0,0
329-1	90,0	10,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
397-1	12,5	0,0	0,0	87,5	50,0	50,0	0,0	0,0
453-1	20,0	0,0	20,0	60,0	30,0	60,0	10,0	0,0
539	50,0	12,5	12,5	25,0	77,8	22,2	0,0	0,0
605	88,9	11,1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
688	11,1	0,0	0,0	88,9	0,0	0,0	40,0	60,0
780	71,4	28,6	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0
948-2	10,0	0,0	80,0	10,0	100,0	0,0	0,0	0,0

Do mesmo modo como apontado no teste nº 1, foi verificada uma tendência para maior patogenicidade do isolado "7L", quando comparado com o isolado "Jac". O comportamento das linhagens S2 testadas, na maioria dos casos mostrou segregação para resistência e suscetibilidade, em proporções variáveis para cada um dos isolados, indicando variabilidade genética entre as plantas. De um modo geral, as linhagens segregantes apresentaram tendência para dominância de resistência, com exceção das linhagens 397-1 e 688 (Composto B) em que a percentagem de plantas suscetíveis para o isolado "7L" foi superior àquela de plantas resistentes. O mesmo foi observado para a linhagem 688, quando inoculada com o isolado "Jac".

A determinação do tamanho das lesões, efetuada para algumas linhagens, revelou certa variação numa mesma folha de cada linhagem, para um mesmo isolado, e também variação no tamanho e número de lesões dentro de uma linhagem inoculada com os dois isolados separadamente. O tamanho das lesões induzidas pelo isolado "7L" variou de 10,0 mm x 2,5 mm a 1,5 mm x 0,5 mm, enquanto que aquele das lesões induzidas pelo isolado "Jac", nas diferentes linhagens, variou de 5,5 mm x 2,0 mm a 0,5 mm x 0,5 mm, e em certos casos, em número superior ao isolado "7L" produzindo coalescência das mesmas. A Tabela 23, do Apêndice, apresenta os resultados obtidos para o tamanho das lesões.

5.2.2. Teste de patogenicidade em progênies S3 de milho - Teste nº 3

Os resultados obtidos neste teste de patogenicidade, em progênies S3, envolvendo os dois isolados de H. carbonum, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Teste de patogenicidade em diferentes progênies S3 de milho para os isolados de H. carbonum, "7L" e "Jac".

Progênies S3	% de Plantas e Nível de Resistência Observado								
	Isolado "7L"			Isolado "Jac"					
	R	MR	S	R	MR	S	R	MR	S
21-1B-1	0,0	0,0	100,0	50,0	0,0	50,0	0,0	0,0	100,0
64-B-1	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
86-1A-1	0,0	0,0	100,0	66,7	0,0	33,3	0,0	0,0	100,0
313-B-1	0,0	11,1	89,9	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
316-B-1	0,0	0,0	100,0	0,0	60,0	40,0	0,0	0,0	100,0
378-1B-1	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
453-1B-1	12,5	0,0	87,5	22,2	44,4	33,3	0,0	0,0	100,0
688-B-1	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
929-B-1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
933-2B-1	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
3022-A-1	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0

Pelos resultados apresentados na Tabela 4, observa-se também um comportamento diferente para os isolados de H. carbonum quando inoculados nas mesmas progênies, evidenciando maior patogenicidade para o isolado "7L".

As progênies 64-B-1, 378-1B-1, 688-B-1, 933-2B-1 e 3022-A-1 revelaram uma reação diferencial para os dois isolados, sugerindo tratar-se de raças diferentes do mesmo patógeno, fato já evidenciado no item 5.2.1. embora as linhagens apresentassem segregação.

As progênies que apresentaram reação de resistência moderada exibiram um número muito reduzido de lesões de suscetibilidade e, também, a presença de pontos necrótico-cloróticos. Comparando a reação de suscetibilidade induzida pelo isolado "7L" com a induzida pelo isolado "Jac", observou-se diferença no aspecto geral das folhas afetadas. O isolado "7L" induziu lesões maiores e bem definidas em plantas suscetíveis. Já o isolado "Jac" induziu a formação de lesões menores, porém mais numerosas.

5.2.3. Teste de patogenicidade em progênies S3 de milho e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de H. carbonum - Teste nº 4

Os resultados obtidos neste teste de patogenicidade, envolvendo progênies de linhagens S3 e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de H. carbonum, são apresentados na Tabela 5.

As progênies 86-1A-1, 86-1A-2, 688-B-1 mostraram suscetibilidade ao isolado "7L" e certa resistência ao isolado "Jac". Com relação à progênie 64-B-1, foi observada uma reação suscetível e moderadamente resistente ao isolado "7L"; e reação de resistência ao isolado "Jac".

Comparando os resultados obtidos para as progênies e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de H. carbonum, pode-se observar que as progênies 70-2A-1, 313-B-1, 313-B-2, 313-B-3, 313-B-5, apresenta -

Tabela 5. Teste de patogenicidade em diferentes progênies S3 de milho e linhagens diferenciais para as raças 1 e 2 de H. carbonum

Linhagens	% de Plantas e Nível de Resistência Observado					
	Isolado "7L"			Isolado "Jac"		
	R	MR	S	R	MR	S
Progênies S3						
64-B-1	0,0	42,9	57,1	100,0	0,0	0,0
70-2A-1	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
86-1A-1	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
86-1A-2	0,0	0,0	100,0	55,6	44,4	0,0
313-B-1	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
313-B-2	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
313-B-3	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
313-B-4	0,0	50,0	50,0	100,0	0,0	0,0
313-B-5	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
316-B-1	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0
483-B-2	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
483-B-3	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
483-B-4	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
688-B-1	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
929-B-1	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0
929-B-2	0,0	0,0	100,0	0,0	55,6	44,4
929-B-3	0,0	0,0	100,0	0,0	37,5	62,5
929-B-4	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0
929-B-5	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
1534-A-1	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0
Linhagens Diferenciais						
K61	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
K61-1	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
Pr	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
Pr-1	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0

ram uma reação diferencial comparável às linhagens K61 e Pr. Por outro lado, as progênies 483-B-3 e 483-B-4 revelaram a mesma reação de resistência quando inoculadas com ambos os isolados. A progênie 483-B-2 apresentou reação de moderada resistência ao isolado "7L" e reação de resistência ao isolado "Jac" em 100% das plantas testadas. A linhagem 1534-A-1 mostrou uma reação de resistência ao isolado "7L" e moderada resistência ao isolado "Jac", em 100% das plantas testadas.

As progênies 929-B-1, 929-B-2, 929-B-3, 929-B-4 e 929-B-5 revelaram maior tendência para suscetibilidade ao isolado "7L" do que ao isolado "Jac". A manifestação da reação de suscetibilidade nestas progênies, induzida pelos isolados "7L" e "Jac" mostrou variação no tamanho e número de lesões, quando se fez comparação entre a reação induzida pelos dois isolados separadamente. Com relação ao isolado "Jac" houve predominância de lesões menores, em torno de 3 a 5 mm de comprimento, com tendência para coalescerem, em decorrência de um número bem maior daquelas.

Quanto às linhagens diferenciais, foi observada uma reação de suscetibilidade para as linhagens Pr e K61, quando inoculadas com o isolado "7L" e reação de resistência e moderada resistência, respectivamente, para as linhagens K61-1 e Pr-1, quando inoculadas com o mesmo isolado. Por outro lado, as linhagens K61-1 e Pr, quando inoculadas com o isolado "Jac", manifestaram reação de resistência, enquanto que as linhagens K61 e Pr-1 revelaram reação de moderada resistência, caracterizada pela presença de pequenos pontos necrótico-cloróticos.

5.2.4. Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho.
Teste nº 5

Os resultados obtidos neste teste de patogenicidade, envolvendo os dois isolados em estudo e linhagens S3, resultantes de autofecundação de plantas de milho, sem prévia seleção quanto à resistência e suscetibilidade, em casa-de-vegetação, bem como algumas progênies S3 de reação conhecida, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Teste de patogenicidade em linhagens S3 de milho, e algumas progênies S3 para os isolados de H. carbonum, "7L" e "Jac"

Linhagens	% de Plantas e Nível de Resistência Observado					
	Isolado "7L"			Isolado "Jac"		
	R	MR	S	R	MR	S
Linhagem S3						
19-A-2	0,0	0,0	100,0	80,0	20,0	0,0
20-A-2	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
31-A-1	42,9	57,1	0,0	62,5	37,5	0,0
48-A-1	40,0	50,0	10,0	100,0	0,0	0,0
64-2A-1	33,3	16,7	50,0	77,8	22,2	0,0
64-B-3	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
68-1A-1	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0
68-1A-2	30,0	50,0	20,0	100,0	0,0	0,0
70-2A-4	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
72-A-3	0,0	30,0	70,0	100,0	0,0	0,0
83-A-1	20,0	30,0	50,0	100,0	0,0	0,0
88-A-3	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
89-A-2	77,8	22,2	0,0	100,0	0,0	0,0
133-1A-2	50,0	50,0	0,0	33,3	0,0	66,7
139-2B-2	80,0	20,0	0,0	100,0	0,0	0,0
187-2B-5	90,0	10,0	0,0	100,0	0,0	0,0
231-B-4	20,0	0,0	80,0	66,7	33,3	0,0
255-B-1	16,7	83,3	0,0	100,0	0,0	0,0
260-1A-2	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0

continua ...

Tabela 6 - Continuação

Linhagens	% de Plantas e Nível de Resistência Observado					
	Isolado "7L"			Isolado "Jac"		
	R	MR	S	R	MR	S
319-1B-1	0,0	0,0	100,0	87,5	12,5	0,0
329-1B-1	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
388-B-1	30,0	70,0	0,0	75,0	25,0	0,0
397-1B-3	0,0	40,0	60,0	100,0	0,0	0,0
405-2A-1	0,0	25,0	75,0	83,3	16,7	0,0
453-1B-3	83,3	16,7	0,0	100,0	0,0	0,0
527-A-2	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	0,0
531-B-3	0,0	0,0	100,0	80,0	20,0	0,0
539-B-3	57,1	42,9	0,0	100,0	0,0	0,0
546-B-3	80,0	20,0	0,0	100,0	0,0	0,0
605-B-3	0,0	50,0	50,0	100,0	0,0	0,0
668-A-1	33,3	44,4	22,2	100,0	0,0	0,0
688-B-2	40,0	20,0	40,0	100,0	0,0	0,0
751-1B-2	80,0	20,0	0,0	80,0	10,0	10,0
780-B-1	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
909-A-1	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0
948-2B-1	0,0	0,0	100,0	62,5	0,0	37,5
948-2B-3	0,0	33,3	66,7	100,0	0,0	0,0
1078-B-1	0,0	0,0	100,0	88,9	11,1	0,0
1117-A-2	11,1	22,2	66,7	100,0	0,0	0,0
1224-A-2	0,0	70,0	30,0	90,0	10,0	0,0
1390-A-1	90,0	10,0	0,0	100,0	0,0	0,0
1534-A-2	0,0	0,0	100,0	50,0	37,5	12,5
Progenies S3						
316-B-1	0,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
86-1A-1	50,0	50,0	0,0	75,0	25,0	0,0
483-B-3	50,0	50,0	0,0	100,0	0,0	0,0
929-B-5	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0
313-B-1	14,3	28,6	57,1	30,0	70,0	0,0

Pelo exposto na Tabela 6, verifica-se um comportamento variável para as diferentes linhagens S3, quando inoculadas separadamente com ambos os isolados, sendo evidenciada em todos os testes realizados uma maior patogenicidade para o isolado "7L". De um modo geral, as plantas apresentaram uma reação caracterizada por pequenos pontos necróticos induzidos pelo isolado "Jac". Considerando o quadro geral dos resultados deste teste de patogenicidade, ressalta à vista a tendência para dominância da resistência, embora seja considerado que na geração S3 as plantas ainda apresentem variabilidade genética, podendo segregar na manifestação dos sintomas.

A linhagem 929-B-5 manifestou a mesma reação de suscetibilidade para os dois isolados, confirmando os resultados do teste anterior, item 5.2.3. Desta forma, passou a constituir a linhagem padrão para a suscetibilidade aos isolados "7L" e "Jac".

As Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 representam as reações induzidas pelos dois isolados nas linhagens testadas.

5.2.5. Teste de patogenicidade em linhagens e progênies S3 de milho para os reisolados obtidos de lesões de diferentes tamanhos formadas em material suscetível - Teste nº 6

Como em todas as reações apresentadas em material suscetível, ocorreu a formação de lesões grandes (8,0 mm a 10,0 mm de comprimento) e lesões pequenas (1,5 mm a 2,0 mm de comprimento), este teste foi desenvolvido para verificar a provável influência do tamanho da lesão na patogenicidade dos isolados oriundos desta. Os resultados obtidos neste teste são apresentados na Tabela 7.



Figura 2. Reação de resistência induzida pelos isolados "Jac" e "7L", respectivamente em 100% e 90% das plantas da linhagem 187-2B-5



Figura 3. Reação de suscetibilidade induzida pelos isolados "Jac" e "7L" em 100% das plantas da linhagem 929-B-5



Figura 4. Reação de resistência e suscetibilidade induzida pelos isolados "Jac" e "7L" em 100% das plantas da linhagem 260-1A-2.



Figura 5. Reação de suscetibilidade e moderada resistência induzida pelos isolados "Jac" e "7L", respectivamente em 66,7% e 50% das plantas da linhagem 133-1A-2



Figura 6. Reação de suscetibilidade e moderada resistência induzida pelos isolados "7L" e "Jac" respectivamente em 30% e 10% das plantas da linhagem 1224-A-2.

Tabela 7. Teste de patogenicidade em linhagens S3 de milho para os reisolados de H. carbonum obtidos de lesões grandes e pequenas apresentadas pela linhagem 929-B-5

Isolado Original	Reisolados de lesões de tecido foliar: 929-B-5	Linhagens S3 Inoculadas	% de Plantas e Nível de Resistência observada			
			R	MR	S	
"7L"	LP ^{a/}	20-A-2	100,0	0,0	0,0	
	LG ^{b/}		100,0	0,0	0,0	
	LP	88-A-3	100,0	0,0	0,0	
	LG		0,0	100,0	0,0	
	LP	187-2B-5	30,0	70,0	0,0	
	LG		0,0	100,0	0,0	
	LP	929-B-3	0,0	100,0	0,0	
	LG		0,0	0,0	100,0	
	"Jac"	LP	20-A-2	100,0	0,0	0,0
		LG		100,0	0,0	0,0
LP		88-A-3	100,0	0,0	0,0	
LG			71,4	28,6	0,0	
LP		187-2B-5	100,0	0,0	0,0	
LG			100,0	0,0	0,0	
LP		929-B-3	0,0	100,0	0,0	
LG			0,0	50,0	50,0	

a/ Reisolado de lesões pequenas

b/ Reisolado de lesões grandes

Os resultados expostos na Tabela 7 revelaram uma certa tendência para maior patogenicidade do isolado "7L" LG, originado de lesões grandes, às linhagens testadas, excetuando-se a linhagem 20-A-2. Com relação ao isolado "Jac", foi verificado que os isolados provenientes de lesões grandes induziram alguma reação de suscetibilidade e reação intermediária nas linhagens 929-B-3 e 88-A-3, o mesmo não ocorrendo nas linha-

gens 187-2B-5 e 20-A-2. Esta última mostrou resistência aos isolados "7L" e "Jac" provenientes tanto de lesões grandes, como de lesões pequenas.

Durante o período de duração deste teste de patogenicidade foram feitas observações sobre o aparecimento e desenvolvimento de algumas lesões, em linhagens resistentes e suscetíveis para os isolados do patógeno. Os resultados deste estudo são apresentados na Tabela 8.

O comportamento da linhagem 20-A-2 após inoculação com os isolados "7L" e "Jac" foi de resistência, mostrando, no entanto, uma diferença para os isolados "7L" provenientes de lesões grandes e de lesões pequenas, no que concerne ao tempo para o aparecimento de lesões mensuráveis, conforme poderá ser observado na Tabela 8. Assim sendo, o isolado "7L" LP induziu a formação de pequenas lesões num período de 6 dias após a inoculação, enquanto que o isolado "7L" LG induziu a formação de pequenas lesões 4 dias após a inoculação. Em ambos os casos, o aparecimento de lesões foi em número muito reduzido, com predominância de muitos pontos necrótico-cloróticos, característicos de reação de resistência. Com relação aos isolados "Jac" LP e "Jac" LG, para a mesma linhagem, foi observada 9 dias após a inoculação a presença somente de pontos cloróticos e necróticos em número reduzidíssimo.

Por outro lado, a linhagem 88-A-3, quando inoculada com o isolado "7L" LP, manifestou a presença de pequenas lesões 4 dias após a inoculação, embora em número muito reduzido, predominando a presença de pontos necróticos após 9 dias. Entretanto, o isolado "7L" LG induziu a formação de pequenas lesões 3 dias após a inoculação, revelando a presença de lesões maiores, com predominância de pontos necróticos e cloróticos na leitura correspondente ao período de 9 dias. Esta mesma linhagem,

Tabela 8. Aparecimento e desenvolvimento de lesões, medidas em milímetros, para linhagens S3 de milho resistentes e suscetíveis, quando inoculadas com os isolados de H. carbonum, "7L" e "Jac", obtidos de lesões grandes e pequenas apresentadas pela linhagem 929-B-5.

Isolado Original	Reisolados de lesões Linhagens de tecido foliar:		Dias de Observação									
	929-B-5	S3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
"7L"	LP	a/ c/	+	+++	+++	+++	+++	+++	1,0x0,6	2,0x1,0	2,8x1,8	2,8x2,0
	LG	b/	+	+++	+++	+++	1,8x1,1	1,9x1,2	1,9x1,3	2,0x1,1	2,9x1,7	2,9x1,7
LP	LG	88-A-3	+	+++	+++	+++	1,3x0,8	2,3x1,2	3,1x1,8	3,6x1,8	3,7x1,8	3,7x1,9
		187-2B-5	+	+++	+++	+++	1,6x0,9	2,7x1,4	3,4x1,6	4,7x1,7	4,8x1,8	5,6x2,2
LP	LG	187-2B-5	+	+++	+++	+++	2,3x1,2	3,5x1,8	4,9x2,1	5,1x2,0	5,2x1,2	5,3x1,9
		929-B-3	+	+++	+++	+++	2,4x1,3	3,5x1,8	4,7x2,2	5,0x2,2	5,3x2,2	5,4x2,3
LP	LG	929-B-3	+	1,8x0,8	2,7x1,4	3,6x2,0	4,8x2,2	5,3x2,6	6,5x2,5	6,8x2,4	7,1x2,4	
		929-B-3	+	2,1x0,8	3,2x1,9	4,4x2,2	4,7x2,2	5,8x2,2	7,4x2,4	7,9x2,4	8,2x2,5	
"Jac"	LP	e/	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	LG	f/	-	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
LP	LG	88-A-3	+	+	++	++	0,7x0,5	1,2x0,6	1,9x1,1	2,3x1,3	2,9x1,3	3,0x1,3
		187-2B-5	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
LP	LG	187-2B-5	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		929-B-3	+	0,5x0,3	1,0x0,5	1,2x0,7	1,3x0,7	1,5x0,7	2,2x1,3	2,9x1,3	3,2x1,4	
LP	LG	929-B-3	+	0,6x0,3	1,6x0,3	2,0x0,4	2,4x0,5	2,5x0,6	3,2x1,4	4,3x1,4	5,1x2,0	

a/ Reisolado de lesões pequenas
b/ Reisolado de lesões grandes
c/ Pontos de penetração

d/ Pontos necróticos e pontos cloróticos
e/ Ausência
f/ Pontos cloróticos

quando inoculada com os isolados "Jac" LP e "Jac" LG separadamente, mostrou a formação de pequenas lesões 4 dias após a inoculação. O isolado "Jac" LG induziu a formação de lesões maiores que aquelas induzidas pelo isolado "Jac" LP, porém em menor número, predominando pontos necrótico-cloróticos nas extremidades das folhas.

A linhagem 187-2B-5, quando inoculada com os isolados "7L" LP e "7L" LG, deu início à formação de lesões 4 dias após a inoculação, porém em número reduzido para cada planta, predominando pontos necróticos e cloróticos, mesmo após 9 dias. Esta mesma linhagem, quando inoculada com os isolados "Jac" LP e "Jac" LG, deu início à formação de pequenas lesões 7 dias após a inoculação com predominância de muitos pontos necrótico-cloróticos e cloróticos apenas.

Com relação ao comportamento da linhagem 929-B-3, quando inoculada com os isolados "7L" LP e "7L" LG, foi observada uma formação de lesões mais rápida que aquela apresentada pelas demais linhagens. O mesmo foi observado para o isolado "Jac" LP e "Jac" LG. Entretanto, a comparação entre o tamanho das lesões induzidas pelos isolados "7L" e "Jac" mostrou a presença de lesões mais desenvolvidas para o isolado "7L" com a ocorrência de murcha dos bordos das folhas afetadas.

6. DISCUSSÃO

Em programas de melhoramento visando à seleção de plantas resistentes às doenças, como também em estudos sobre a natureza da resistência àquelas, necessário se faz o conhecimento de condições que possibilitem uma boa produção de inóculo para testar populações de plantas.

Os estudos aqui desenvolvidos e que se basearam em alguns aspectos da fisiologia do patógeno, mostraram que o crescimento dos isolados "7L" e "Jac" foi estimulado significativamente nos meios de LCH, CZA-PEK e BDA, quando comparado com o meio de NA. Entretanto, considerando-se a esporulação de ambos os isolados, o meio de LCH destacou-se dos demais meios de cultura, induzindo uma produção de conídios altamente significativa. Na literatura disponível, nada foi encontrado sobre o efeito de meios de cultura no crescimento e esporulação de H. carbonum, porém, MALCA & ULLSTRUP (1962) citam o meio contendo lactose e caseína hidrolizada para o crescimento e esporulação de H. turcicum e H. carbonum, consubstanciando assim os resultados obtidos com relação ao meio de LCH.

Os experimentos para determinação do crescimento linear e da esporulação revelaram que as exigências nutricionais para estes dois

processos são afetadas diferentemente pelos meios de cultura para o caso de um isolado de H. carbonum.

No que concerne à nutrição em nitrogênio, tendo como fonte de carbono a lactose, foi verificada uma variação na esporulação de H. carbonum isolado "7L", conforme a fonte de nitrogênio empregada. Desta forma, a esporulação foi significativamente maior nos meios contendo asparagina, nitrato de potássio e caseína como fonte de nitrogênio que no meio contendo sulfato de amônia. Com relação à asparagina, nitrato de potássio e sulfato de amônia, MALCA & ULLSTRUP (1962) observaram que as raças 1 e 2 de H. carbonum esporulavam melhor em meio contendo asparagina, quando lactose estava presente como fonte de carbono. Entretanto, quando a fonte de carbono foi substituída por galactose, as duas raças esporularam melhor em meio contendo nitrato de potássio do que em asparagina. Com relação ao sulfato de amônia, os autores observaram baixa esporulação para ambas as raças de H. carbonum, mesmo variando as fontes de carbono. Segundo COCHRANE (1958) e LILLY & BARNETT (1951), o sulfato de amônia baixa o pH do meio, reduzindo o crescimento de muitos fungos, uma vez que à medida que os íons de amônia vão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido. Entretanto, com relação aos sais de nitrato, à medida em que os íons de nitrato vão sendo consumidos, o meio torna-se mais alcalino. Embora no presente trabalho não tenham sido realizados estudos sobre o efeito do pH do meio na esporulação do isolado "7L", ficou evidenciada maior esporulação de H. carbonum em meio contendo nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, quando comparado com aquela obtida em sulfato de amônia, usando-se como fonte de carbono a lactose. Estes dados revelam a mesma tendência que aqueles relatados por MALCA & ULLSTRUP (1962).

A temperatura também exerceu influência na produção de conídios do isolado "7L", sendo a esporulação maior à temperatura de 23°C do

que a 28°C. Na literatura consultada, nada foi encontrado sobre o efeito de temperatura na esporulação de H. carbonum, a não ser uma citação feita por MALCA & ULLSTRUP (1962) sobre a incubação dos fungos H. carbonum e H. turcicum à temperatura de 22 - 24°C. É altamente interessante saber-se qual a melhor temperatura para a esporulação de um maior número de isolados. De um dado como este poder-se-ia inferir se H. carbonum, nas nossas condições, também ocorreria com maior frequência a temperaturas mais baixas, uma vez que a esporulação parece ter sido diminuída a temperatura mais alta.

O período de leitura também exerceu influência sobre a esporulação do isolado "7L", sendo observado que a produção de esporos no período de 21 dias, no meio contendo asparagina, foi superior àquela obtida nos períodos de 14 e 7 dias. Fato interessante foi observado com relação ao período de leitura na esporulação do isolado "7L", no meio de nitrato de potássio, revelando maior esporulação nos períodos de 7 e 21 dias. No 14º dia, ocorreu um decréscimo na produção de conídios, como consequência possível da germinação daqueles no referido meio. Com relação à caseína, a produção de conídios foi significativamente maior no período de 21 dias. Estas observações sugerem que a melhor época para se obterem conídios está relacionada com a fonte de nitrogênio no meio de cultura. Assim, provavelmente, o nitrogênio na forma de nitrato induz processos fisiológicos diferentes daqueles induzidos pelas formas orgânicas nos próprios conídios, fazendo com que estes germinem.

Dos estudos relacionados com a morfologia dos conídios para identificação do patógeno, foi verificada a ocorrência de variação no tamanho dos mesmos, de acordo com o substrato utilizado. Assim sendo, o maior comprimento dos conídios de H. carbonum foi observado no meio de LCH, e o menor comprimento no meio de NA. Considerando-se o comprimento

dos conídios produzidos em tecido foliar de milho, foi verificada também uma variação, quando comparado com os obtidos nos diferentes meios de cultura. Confrontando estes resultados com os encontrados na literatura para H. carbonum, observa-se também uma variação no tamanho dos conídios, conforme constataram diferentes pesquisadores (ULLSTRUP, 1944); (LUTRELL, 1951); (ROBLES, 1949); (HOOKER et alii, 1973); (NELSON et alii, 1973); (WALLIN & LOONAM, 1973).

Elliott (1949) observou que o teor de açúcar do meio tem influência no tamanho de conídios produzidos por algumas espécies de Helminthosporium (H. sativum, H. oryzae, H. sigmoideum e H. turcicum). Também Sherbakoff, citado pelo mesmo autor, encontrou variação para o tamanho dos conídios de várias espécies de Fusarium.

Provavelmente, a carência de padronização de substrato para estudos de comparação morfológica, principalmente quando as espécies são separadas com base na morfologia dos conídios, tem contribuído para estas diferenças, o que, muitas vezes, dificulta a identificação de uma espécie. Assim, a determinação de características morfológicas deverá ser baseada num substrato o mais natural possível, o que sugere ser a lesão em folhas de milho o melhor substrato. Resta saber se as folhas de diferentes germoplasmas e ou citoplasmas podem influir consideravelmente sobre as características morfológicas.

Das observações efetuadas para o número de septos bem como para a coloração dos conídios foi evidenciada a presença de poucos septos para os conídios mais jovens, os quais apresentavam coloração clara. Já os conídios maduros apresentavam coloração marrom-escura. No que tange à cor dos conídios, HOOKER et alii (1973) referiram que esta pode ser influenciada pela idade dos mesmos.

Os testes de patogenicidade realizados em linhagem S2 e S3, envolvendo os dois isolados de H. carbonum, mostraram que os isolados "7L" e "Jac" são patogênicos a linhagens de milho, apresentando, no entanto, diferenças constantes quanto ao grau de patogenicidade. Desta forma, foi observada em todos os testes realizados, maior patogenicidade para o isolado "7L" em relação ao isolado "Jac", quando inoculados separadamente nas mesmas linhagens. Este fato levou à suposição da presença de raças nos isolados de H. carbonum, uma vez que há citação na literatura da existência de três raças do patógeno mencionado (ULLSTRUP, 1944 e NELSON et alii, 1973).

A reação de suscetibilidade apresentada pelas linhagens diferenciadas, K61 e Pr, quando inoculadas com o isolado "7L", revelou semelhança nos sintomas induzidos pela raça 1 de H. carbonum às mesmas, conforme ULLSTRUP (1944). Com relação às linhagens Pr-1 e K61-1, foi observada nessa última uma reação de resistência ao isolado "7L" concordante com o resultado obtido pelo mesmo autor, para a raça 1. Ocorreu, porém, uma reação de moderada resistência para a linhagem Pr-1, caracterizada pela presença de pequenas lesões, ao invés de uma reação de resistência caracterizada pela presença de pontos necróticos, como descrita por ULLSTRUP (1944). Esta pequena diferença no comportamento da linhagem Pr-1 pode ser atribuída às condições do ambiente, pois, segundo ALLARD (1971), para que um gene possa expressar fenotipicamente um caráter, há necessidade de que o ambiente seja adequado. Conforme WALKER (1965), muitos melhoristas reconhecem que a expressão de resistência pode ser alterada por condições do ambiente onde a população é exposta. Assim, ou a exteriorização das características da linhagem diferenciadora em questão foi influenciada pelas condições do ambiente, ou o isolado é diferente da raça 1 de H. carbonum. De qualquer maneira, é altamente desejável o desenvolvimento de linhagens diferenciadoras para as condições do Brasil.

Por sua vez, a reação apresentada pelas mesmas linhagens diferenciais ao isolado "Jac" não foi igual à induzida pela raça 2 de H. carbonum. De acordo com ULLSTRUP (1944), as linhagens K61, K61-1, Pr e Pr-1 são moderadamente suscetíveis à raça 2 do patógeno, sendo essa reação caracterizada pela presença de pontos necróticos. Nas linhagens K61 e Pr-1, foi detectada a presença de pontos necróticos e pequenas lesões. De acordo com o critério seguido na presente pesquisa para avaliação dos sintomas das plantas, esta reação foi considerada como de moderada resistência. Já para as linhagens K61-1 e Pr a reação manifestada foi caracterizada apenas pela presença de pontos cloróticos. Isto sugere ou a ocorrência de um outro biótipo de H. carbonum, diferente do assinalado como raça 2 por ULLSTRUP (1944), ou que as linhagens diferenciadoras, no ambiente em que foram testadas, não expressaram as suas características, da maneira como o fazem no local de origem.

Algumas linhagens S3 resultantes da autofecundação de plantas de linhagens S2, previamente selecionadas, em condições de casa-de-vegetação, quanto à resistência ou suscetibilidade ao isolado "7L", mostraram certa constância na reação apresentada em testes consecutivos de patogenicidade. Outras, no entanto, apresentaram uma variação na reação, comportando-se como suscetíveis num teste e, em teste subsequente, apresentaram segregantes para resistência e suscetibilidade. Esta variação no comportamento das linhagens de milho era de se esperar, visto não estarem envolvidas linhagens puras para resistência ou suscetibilidade. Desta forma, a variabilidade genética de cada linhagem, aliada às condições do ambiente, e, ainda, a própria variabilidade do patógeno, podem ter exercido influência na expressão fenotípica da reação à doença.

Assim sendo, foi observada uma reação de suscetibilidade ao isolado "7L" para as linhagens 929-B-1, 929-B-5, 316-B-1 e 688-B-1, em

100% das plantas testadas, mesmo sendo os testes realizados em épocas diferentes do ano. A progênie 483-B-4 manifestou reação de resistência em 100% das plantas. Já a 483-B-3 revelou reação de resistência num teste, e no teste seguinte apresentou reação para moderada resistência. Por sua vez, a 483-B-2 manifestou reação de moderada resistência em 100% das plantas testadas. Diante da ocorrência de plantas segregantes para moderada resistência, faz-se necessária a realização de algumas gerações de autopolinização, para se obter uma linhagem pura para resistência ao isolado "7L".

A linhagem 86-1A-1 apresentou reação de suscetibilidade ao isolado "7L" em dois testes seguidos e, em teste posterior, mostrou segregantes para resistência e moderada resistência. Fato semelhante foi observado com relação à linhagem 313-B-1 que em dois testes consecutivos manifestou reação de suscetibilidade e, em teste subsequente, mostrou segregantes para resistência e moderada resistência, embora contando ainda com 57,1% de plantas suscetíveis. Esta variação no comportamento destes hospedeiros pode ser devida às condições do ambiente, considerando-se que os testes foram realizados em épocas diferentes. Assim, torna-se interessante fazer especulações sobre o possível efeito de condições do ambiente interferindo na manifestação da suscetibilidade, considerando-se, no entanto, que juntamente com estas linhagens foram utilizadas outras que sempre se mostraram suscetíveis em todos os testes.

A reação de algumas linhagens S3 ao isolado "Jac" mostrou certa constância nos testes realizados, predominando uma reação de resistência para a maioria das linhagens testadas. Assim sendo, em dois experimentos envolvendo as linhagens 64-B-1 e 483-B-3 foi observada reação de resistência para 100% das plantas inoculadas. O contrário foi observado com a progênie 929-B-5 que revelou reação de suscetibilidade em dois tes-

tes consecutivos para 100% das plantas testadas. A progênie 929-B-1 mostrou-se suscetível em 100% das plantas num teste, sendo que no teste subsequente apresentou 50% de plantas suscetíveis e 50% de plantas com moderada resistência. Esta linhagem poderá representar o padrão suscetível também para o isolado "Jac", necessitando, no entanto, de algumas gerações de autofecundação para fixar os genes que controlam a suscetibilidade.

A linhagem 316-B-1 manifestou em dois testes seguidos reações de moderada resistência e suscetibilidade ao isolado "Jac", porém em teste posterior mostrou reação de moderada resistência em 100% das plantas. Do mesmo modo, a linhagem 86-1A-1 apresentou comportamento segregante para resistência e suscetibilidade num teste e reação de moderada resistência em 100% das plantas no teste seguinte. Finalmente, em teste posterior, apresentou reação de resistência e moderada resistência respectivamente para 75% e 25% das plantas. A linhagem 313-B-1 apresentou reação de moderada resistência num teste para 100% das plantas, sendo que no teste seguinte comportou-se como completamente resistente. Em teste posterior, porém, apresentou 30% de plantas resistentes e 70% de plantas com moderada resistência. Estas linhagens necessitam ser melhoradas no sentido desejado, a fim de serem tornadas puras.

Considerando-se todos os testes de patogenicidade, as linhagens S3, embora estudadas numa única vez, apresentaram uma reação que permite a separação em 6 grupos: a) linhagens que se comportaram como diferenciais, através da manifestação de reação de suscetibilidade ao isolado "7L" e reação de resistência ao isolado "Jac": 70-2A-1; 260-1A-2 ; 313-B-2; 313-B-3; 313-B-5; 378-1B-1; 933-2B-1, 3022-A-1; b) linhagens que se comportaram como resistentes aos dois isolados: 20-A-2; 88-A-3; 483-B-4 e 780-B-1; c) linhagem que se comportou como suscetível a

ambos os isolados: 64-B-3; d) linhagens que apresentaram comportamento suscetível ao isolado "7L" e comportamento segregante para moderada resistência e suscetibilidade ou para resistência e moderada resistência ao isolado "Jac": 19-A-2; 319-1B-1; 531-B-3; 929-B-2; 929-B-3; 929-B-4; 948-2B-1; 1078-B-1; 1534-A-2; e) linhagens que se comportaram como resistentes ao isolado "Jac" e apresentaram segregantes para resistência e suscetibilidade ou moderada resistência ou moderada resistência e suscetibilidade para o isolado "7L": 48-A-1; 68-1A-1; 72-A-3; 83-A-2; 139-2B-2; 187-2B-5; 255-B-1; 397-1B-3; 453-1B-3; 527-A-2; 539-B-3; 546-B-3; 605-B-3; 688-A-1; 688-B-2; 909-A-1; 948-2B-3; 1117-A-2; 1390-A-1; f) linhagens que apresentaram um comportamento segregante para resistência e suscetibilidade ou para resistência e moderada resistência para ambos os isolados: 31-A-1; 64-2A-1; 133-1A-2; 231-B-4; 388-B-1; 405-2A-1; 751-1B-2; 1224-A-2.

O agrupamento para caracterização das linhagens quanto à resistência e suscetibilidade aos 2 isolados revela o grande potencial disponível para a obtenção de linhagens diferenciadoras para raças do patógeno que ocorrem nas condições do Brasil.

ULLSTRUP (1941 b e 1954) constatou que a herança da resistência ao H. carbonum, raça 1, é governada por um par de genes dominantes. Caso a reação de resistência ao isolado "7L" seja futuramente demonstrada como sendo dominante, esta raça não deverá causar problemas, a não ser em linhagens e híbridos sem os devidos genes de resistência. Com as linhagens utilizadas neste trabalho, não foi possível demonstrar o tipo de herança. Segundo ALLARD (1971), no estudo da herança da resistência às doenças, mesmo com segregação monogênica, é difícil estabelecer herança da reação, sendo prática comum cultivar outras gerações além da F2, a fim de se obterem evidências mais concretas para análise das proporções de geração F2.

O tamanho das lesões apresentado pelas linhagens que se comportaram como suscetíveis ao patógeno foi variável. Esta variação ocorreu entre linhagens, dentro de uma mesma linhagem e também numa mesma folha, para cada isolado separadamente. Fato semelhante foi constatado por HOOKER et alii (1973) que consideraram as variações no tamanho e forma das lesões como sendo dependentes da idade da lesão e do genótipo do hospedeiro, tendo HOOKER (1974 a) observado não haver influência citoplasmática para o tamanho da lesão.

As plantas que se comportaram como resistentes, de um modo geral exibiram a presença de pontos cloróticos e pontos clorótico-necróticos, correspondentes à penetração do patógeno no tecido foliar. COMMS - TOCK & SCHEFFER (1973), em observações histológicas, constataram que a invasão do tecido do milho por H. carbonum ocorre facilmente em tecido suscetível, porém, em tecido resistente, o patógeno fica confinado a uma ou duas células, resultando assim na presença de pontos necróticos nos tecidos afetados.

As reações induzidas pelos reisolados "7L" e "Jac" oriundos de lesões pequenas mostraram uma tendência para formação de lesões menores na linhagem suscetível, quando comparados com aquelas induzidas pelos mesmos reisolados oriundos de lesões grandes. Outros estudos deverão ser realizados para verificação do fato, uma vez que nada foi encontrado na literatura sobre o assunto. É interessante especular sobre a possibilidade do tamanho variável das lesões de mesma idade, numa mesma folha, estar relacionada com a capacidade patogênica do fungo.

É interessante notar que não foi detectada, em todos os testes realizados, uma reação das plantas que indicasse total suscetibilidade ao isolado "Jac" e resistência ao isolado "7L". Isto mostra ser o

isolado "7L" mais patogênico do que o isolado "Jac", e que devem ser conduzidos trabalhos de melhoramento visando à resistência ao patógeno, uma vez que o presente trabalho permitiu identificar algumas fontes de resistência em linhagens S2 e S3.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir o que se segue:

1. os processos de crescimento e esporulação para H. carbonum são diferentemente afetados pelos meios de cultura;
2. o tamanho dos conídios de H. carbonum é uma característica influenciada pelo substrato onde se desenvolve o fungo;
3. o processo de esporulação para um isolado de H. carbonum é influenciado por fatores tais como fontes de nitrogênio, temperatura e período de leitura;
4. os isolados "7L" e "Jac" foram identificados como Helminthosporium carbonum Ullstrup, mostrando-se patogênicos em linhagens de milho, porém, variando quanto ao grau de patogenicidade;
5. com base na reação apresentada pelas linhagens diferenciais e outras progênies, o isolado "7L", provavelmente, represente a ra-

ça 1 do H. carbonum; e o isolado "Jac" um outro biótipo do patógeno mencionado;

6. As linhagens e progênies testadas variaram na reação induzida pelos dois isolados, podendo ser enquadradas num dos seguintes grupos: linhagens ou progênies que apresentaram reação diferencial; linhagens ou progênies que manifestaram reação de resistência aos isolados "7L" e "Jac"; linhagens ou progênies que mostraram reação de suscetibilidade aos dois isolados; e linhagens que apresentaram comportamento segregante em reação a ambos os isolados de H. carbonum.

8. SUMMARY

The present work has dealt with the identification of two fungus isolates of the genus Helminthosporium, through studies related to conidium morphology and pathogenicity to corn (Zea mays L.) lines.

The morphological studies, for both isolates, involved observations on length width, septation, color and shape of conidia produced on different substrates. A variation of conidium size was observed, for both isolates, according to the substrate utilized. However, similar morphological characteristics were observed when the isolates were compared. Considering the parameters indicated in the literature, the isolates were identified as Helminthosporium carbonum Ullstrup.

Pathogenicity tests conducted on corn S2 lines and S3 lines revealed that the reaction induced by the isolate from Sete Lagoas (MG) - "7L" was different from the one induced by the isolate from Inhumas (GO) - "Jac". The isolate "7L" proved to be more pathogenic than the isolate "Jac" when both were inoculated, separately, on the same corn lines.

The utilization of differential lines of corn for races 1

and 2 of H. carbonum, allowed the identification of the isolate "7L" as probably being race 1, whereas the isolate "Jac" was identified as another biotype different from race 2.

Among S2 lines and S3 lines utilized, some of them behaved as susceptible to both isolates, others as resistant to them, whereas others showed a segregating behavior.

Some aspects related to the physiology of the pathogen were also investigated, to determine the most favorable conditions for sporulation "in vitro". The medium lactose-hydrolyzed casein-agar stimulated sporulation of both isolates. All nitrogen sources utilized, except ammonium sulfate, stimulated sporulation of the isolate "7L". The temperature of 23°C favored a better sporulation of the pathogen, when compared to 28°C, although good sporulation was observed at the latter.

Spore countings conducted at different times showed that the amount of conidia obtained, at a given time, was influenced by the nitrogen source.

9. LITERATURA CITADA

- ALLARD, R.W., 1971. Princípios do melhoramento genético das plantas. Edgard Blücher, 381 p.
- BAIS, B.S.; S.B. SINGH; D.V. SINGH, 1970. Effect of different carbon and nitrogen compounds on the growth and sporulation of Curvularia pallescens. Indian Phytopathology, 23:511-516.
- BLANCO, M.H. et alii, 1974. Racial composition of Helminthosporium maydis and H. carbonum on corn hybrids in normal cytoplasm in Pennsylvania in 1973. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 58:934-936.
- BRASIL. Fundação. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1975. Anuário Estatístico. Rio de Janeiro. 1015 p.
- CHENULU, V.V. e T.S. HORA, 1962. Studies of losses to Helminthosporium turcicum blight of maize. Indian Phytopathology, 15:235-237.
- COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of Fungi. John Wiley & Sons., Ins., London, Toppan Company Ltd., Tokyo, Japan. 524 p.
- COMSTOCK, J.C. e R.P. SCHEFFER, 1973. Role of host-selective toxin in colonization of corn leaves by Helminthosporium carbonum. Phytopath. St. Paul, Minnesota, 63:24-29.
- DRECHSLER, C., 1923. Some graminicolous species of Helminthosporium. Jour. Agric. Research, Washington, 24:641-739.

- ELLIOTT, E.S., 1949. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of Helminthosporium. Phytopathology, St. Paul, Minnesota 39:953-958.
- FISHER, D.E. et alii, 1976. Leaf infection and yield loss caused by four Helminthosporium leaf diseases of corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 66:942-944.
- GARRAWAY, M.O. e J.C. BILLOTTE, 1972. Sporulation in vitro by Helminthosporium maydis. Dept. Pl. Pathology, Ohio Agric. Res. and Development Center. Prog. Rep. Coop. State Res. Service, pag. 3-5.
- HALE, M.G. e C.W. ROANE, 1961. The nutrition of Helminthosporium carbonum race 1 in relation to parasitism of corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 51:235-240.
- HOOVER, A.L., 1974 a. Reaction of corn inbreds to Helminthosporium leaf spot in the greenhouse. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 58:399-400.
- HOOVER, A.L. 1974 b. Field reaction of corn inbreds to Helminthosporium leaf spot. Pl. Dis. Reporter. Beltsville, Maryland, 58:909-911.
- HOOVER, A.L. 1974 c. Seedling reactions of corn hybrids to Helminthosporium leaf spot. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 58:975-977.
- HOOVER, A.L., 1975. Field reaction of corn hybrids to Helminthosporium leaf spot. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 59:646-648.
- HOOVER, A.L.; D.R. SMITH; S.M. KIM e M.D. MUSSON, 1970. Physiological races of Helminthosporium maydis and disease resistance. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 54:1109-1110.
- HOOVER, A.L.; A. MESTERHAZY; D.R. SMITH e S.M. LIM, 1973. A new Helminthosporium leaf blight of corn in the northern Corn Belt. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 57:195-198.
- KELMAN, A., org., 1967. Sourcebook of laboratory exercises in plant pathology. San Francisco, Freeman, 387 p.
- KINSEY, J.G., 1971. Pathogenicity of Helminthosporium turcicum following serial passage through corn. University of Illinois, 34 p (Tese de M.S.)

- KRUG, C.A., 1966. O milho no mundo. In: Cultura e Adubação do milho, Inst. Bras. Potassa. S. Paulo, p. 11-19.
- LILLY, V.G. e H.L. BARNETT, 1951. Physiological of the fungi. McGraw-Hill Book Company Inc. New Jersey, Toronto and London, 464 p.
- LARSEN, P.O. e J. SAFFORD, 1973. Studies on nutritional factors affecting sporulation of H. maydis in vitro e in vivo. Dept. Pl. Path. Ohio Agric. Res. and Development Center. Prog. Rep. Coop. State Res. Serv. pag. 6-8.
- LIM, S.M., 1974. Reaction in corn inbreds and hybrids to Helminthosporium maydis race T. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 58:811-813
- LUTTRELL, E.S., 1951. A key to species of Helminthosporium reported on grasses in the United States. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland. Suppl. 201:59-67.
- LUTTRELL, E.S., 1963. Taxonomic criteria in Helminthosporium. Mycologia, Lancaster, Pennsylvania, 55:643-674.
- MALCA, I. e A.J. ULLSTRUP, 1962. Effects of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of Helminthosporium Bull. Torrey Bot. Club, Lancaster, Pennsylvania, 89:240-249.
- NELSON, R.R., 1959. Cochliobolus carbonum, the perfect stage of Helminthosporium carbonum. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 49:807-810.
- NELSON, R.R., 1960. The genetics of compatibility in Cochliobolus carbonum. Phytopathology, 50:158-160.
- NELSON, R.R.; M. BLANCO; S. DALMACIO e B.S. MOORE, 1973. A new race of Helminthosporium carbonum on corn. Pl. Dis. Reporter, Beltsville. Maryland, 57:822-823.
- PATEL, B.N. e D.C. BAIN, 1973. Reactions of five species of gramineae to races O and T of Helminthosporium maydis and race 2 of H. carbonum Pl. Dis. Reporter, Beltsville, 57:507-508.

- PEREIRA, O.A.P., 1976. Comportamento de Helminthosporium maydis Nisikado & Miyake Raça T, em milho (Zea mays L.) contendo diferentes citoplasmas para esterilidade masculina. Piracicaba, ESALQ-USP, 64 p. (Tese de Mestrado).
- ROBERT, A.L., 1962. New hosts for three Helminthosporium species from corn. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 46:321-324.
- ROBERT, A.L. e G.F. SPRANGUE, 1960. Adaptation of corn leaf blight fungus to a resistant and susceptible corn host. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 50:261-263.
- ROBLES, L.H., 1949... The patogenicity of species of Helminthosporium on corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 39:1020-1028.
- SHURTLEFF, M.C. et alii, 1973. A compendium of Corn Diseases. The Cooperative Extension Service. University of Illinois and Extension Service. United States Department of Agriculture Cooperating. 64 p.
- SMITH, D.R.; A.L. HOOKER e S.M. LIM, 1970. Physiological races of Helminthosporium maydis. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 54: 819-822.
- TUITE, J., 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 239 p.
- ULLSTRUP, A.J., 1941 a. Two physiologic races of Helminthosporium maydis in the Corn Belt. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 31:508 - 521.
- ULLSTRUP, A.J., 1941 b. Inheritance of susceptibility to infection by Helminthosporium maydis race 1 in maize. Jour. Agric. Research, Washington, 63:331-334.
- ULLSTRUP, A.J., 1944. Further studies on a species of Helminthosporium parasitizing corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 34 214-22
- ULLSTRUP, A.J. 1954 a Variation within species of Helminthosporium, Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland. Suppl. 228:116-117.
- ULLSTRUP, A.J. 1954 b. Helminthosporium diseases on corn. Pl. Dis. Reporter. Beltsville, Maryland. Suppl. 228:118-119.

- ULLSTRUP, A.J., 1970. History of southern corn leaf blight. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 54:1100-1102.
- ULLSTRUP, A.J. e A.M. BRUNSON, 1947. Linkage relationships of a gene in corn determining suscetibility to a Helminthosporium leaf spot. Jour. Amer. Soc. Agronomy, 39:606-609.
- ULLSTRUP, A.J. e S.R. MILES, 1957. The effects of some leaf blights of corn on grain yield. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 47:331 - 336.
- WALKER, J.C., 1965. Use of environmental factors in screening for disease resistance. Ann. Rev. Phytopathology, Palo Alto, California, 3: 197-208.
- WALLIN, J.R. e D.V. LOONAN, 1973. A different Helminthosporium disease of corn in the corn Belt. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 57:780-784.

A P Ê N D I C E

Tabela 1. Influência do meio de cultura no crescimento linear, medido em milímetros, para os isolados de H. carbonum, "7L" e "Jac"

Meios de Cultura	Isolados	Horas de Observação				
		24	48	72	96	120
BDA	"7L"	16,66 ^{a/}	39,33	57,66	77,33	90,00
	"Jac"	18,66	44,00	60,00	76,00	86,00
CZAPEK	"7L"	15,66	38,33	56,00	76,33	88,33
	"Jac"	15,33	38,66	56,66	84,00	90,00
LCH	"7L"	12,33	36,66	55,00	76,33	90,00
	"Jac"	14,66	36,33	55,00	73,33	90,00
N.A	"7L"	15,33	34,00	49,66	60,33	74,33
	"Jac"	15,33	33,33	46,33	59,66	66,33

a/ Médias de 3 repetições

Tabela 2. Análise de variância para o efeito dos diferentes meios de cultura no crescimento linear dos isolados "7L" e "Jac" medidos a pós 120 horas

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios de cultura	3	1589,458252	529,819424	13,4131**
Isolados	1	40,041626	40,041626	1,0137
Meios x isolados	3	84,125122	28,041707	0,7099
Tratamentos	7	1713,625000	244,803571	6,1975**
Resíduo	16	632,000000	39,500000	
Total	23	2345,625000		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C.V. = 7,45%

Tabela 3. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação meios x isolados mais aqueles devidos a meios de cultura

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios d. "7L"	3	519,333313	173,111104	4,3825*
Meios d. "Jác"	3	1154,250000	384,750000	9,7405**
Resíduo	16	632,000061	39,500000	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 4. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação isolados x meios mais aqueles devidos a isolados

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados d. BDA	1	24,000000	24,000000	0,6075
Isolados d. CZAPEK	1	4,166656	4,166656	0,1054
Isolados d. LCH	1	0,000000	0,000000	0,0000
Isolados d. NA	1	96,000000	96,000000	2,4303
Resíduo	16	632,000000	39,500000	

Tabela 5. Influência do meio de cultura na esporulação, dos isolados de H. carbonum, conídios por mililitro ($\times 10^4$).

Meios de Cultura	Isolados	Repetições			Média
		I	II	III	
BDA	"7L"	205,0	210,0	190,0	201,6
	"Jac"	191,0	194,0	190,0	191,6
CZAPEK	"7L"	250,0	238,0	237,0	241,6
	"Jac"	210,0	207,0	201,0	206,0
LCH	"7L"	380,0	320,0	350,0	350,0
	"Jac"	450,0	408,0	399,0	419,0
N.A	"7L"	115,0	122,0	99,0	112,0
	"Jac"	90,0	98,0	106,0	98,0

Tabela 6. Análise de variância para o efeito dos diferentes meios de cultura na esporulação dos isolados de H. carbonum, "7L" e "Jac".

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios de cultura	3	243716,334106	81238,778015	320,1528**
Isolados	1	32,666015	32,666015	0,1287**
Meios x isolados	3	9461,000007	3153,666670	12,4282
Tratamentos	7	253210,000183	36172,857162	142,5531**
Resíduo	16	4060,000000	253,750000	
Total	23	257270,000183		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

C.V. = 7,00%

Tabela 7. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação meios x isolados mais aqueles devidos a meios de cultura

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios d. "7L"	3	87627,334075	29209,111343	115,1097**
Meios d. "Jac"	3	165550,000671	55183,333526	217,4712**
Resíduo	16	4060,000001	253,750000	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 8. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, isolados x meios, mais aqueles devidos a isolados

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados d. BDA	1	150,000000	150,000000	0,5911*
Isolados d. CZAPEK	1	1908,166749	1908,166749	7,5198**
Isolados d. LCH	1	7141,500003	7141,500003	28,1438
Isolados d. NA	1	294,000000	294,000000	1,1586
Resíduo	16	4060,000001	253,750000	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 9. Influência da fonte de nitrogênio, temperatura e período de leitura na esporulação de H. carbo num, isolado "7L", contidos por mililitro ($\times 10^4$)

Fontes de Nitrogênio	Temp. °C	Períodos Leitura	R E P E T I Ç Õ E S					Médias
			I	II	III	IV	V	
KNO ₃	28	7	61,25 ^{a/}	114,00	151,50	85,25	130,50	108,50
		14	44,50	38,75	39,25	28,75	40,00	38,25
	23	7	127,25	197,75	165,25	122,50	80,50	138,65
		14	82,50	226,00	235,00	119,50	141,25	160,85
		21	42,50	47,00	53,25	38,75	58,25	48,75
		21	214,75	190,50	246,25	81,50	128,25	172,25
ASPARAGINA	28	7	34,75	32,75	22,75	25,25	44,25	31,95
		14	28,00	139,25	66,00	75,50	51,50	72,05
	23	21	298,25	110,50	257,00	155,00	120,75	188,30
		7	70,00	95,00	78,75	32,75	78,25	70,95
		14	98,75	156,00	94,75	124,75	178,75	130,60
		21	136,50	210,00	273,00	199,75	225,00	208,65
(NH ₄) ₂ SO ₄	28	7	37,75	37,75	67,00	68,25	147,50	71,65
		14	52,00	36,50	24,00	30,00	33,00	35,10
	23	21	49,00	35,75	71,75	54,75	54,00	53,05
		7	25,75	38,00	74,50	47,25	46,25	46,35
		14	56,25	49,00	49,00	46,50	43,50	48,85
		21	49,00	35,75	71,75	54,75	54,00	53,03
CASEÍNA	28	7	65,25	81,50	33,50	107,75	73,50	72,30
		14	95,00	138,00	25,25	34,50	28,00	64,15
	23	21	126,25	160,20	83,00	164,00	76,75	122,04
		7	60,75	32,25	48,50	54,00	64,25	51,95
		14	92,00	92,25	121,25	68,50	91,25	93,05
		21	114,50	275,25	171,50	250,00	97,00	181,65

a/ Média de duas contagens

Tabela 10. Análise de variância para o efeito da fonte de nitrogênio, temperatura e período de leitura na esporulação do isolado "7L". Dados transformados em \sqrt{x}

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fontes de N	3	195,349281	65,116427	19,3232**
Temperatura	1	41,758811	41,758811	12,3918**
Período de leitura	2	287,787140	143,893570	42,7002**
Fontes de N x Temp.	3	23,181839	7,727279	2,2930**
Fontes de N x Período	6	249,447128	41,574521	12,3371
Temperatura x Período	2	7,582115	3,791057	1,1249
Fonte de N. x Temp. x Período	6	27,760589	4,626764	1,3729
Tratamentos	23	832,866903	36,211563	10,7457**
Resíduo	96	323,504772	3,369851	
Total	119	1156,371675		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade
C.V. = 19,96%

Tabela 11. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, fontes de nitrogênio x períodos de leitura, mais aqueles devidos a fontes de nitrogênio

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fontes de N d. 7 dias	3	122,265089	40,755029	12,0940**
Fontes de N d. 14 dias	3	79,022100	26,340700	7,8165**
Fontes de N d. 21 dias	3	243,509224	81,169741	24,0870**
Resíduo	96	323,504768	3,369851	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 12. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, período de leitura x fontes de nitrogênio, mais aqueles devidos a períodos de leituras

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Períodos d. Nitrato K	2	192,210600	96,105300	28,5191**
Períodos d. Asparagina	2	235,051166	117,525583	34,8755**
Períodos d. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	5,750781	2,875390	0,8532**
Períodos d. Caseína	2	104,221706	52,110853	15,4638
Resíduo	96	323,504787	3,369851	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 13. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, fontes de nitrogênio x temperaturas, mais aqueles devidos a fontes de nitrogênio

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fontes de N d. 28°C	3	47,080120	15,693373	4,6569**
Fontes de N d. 23°C	3	171,450992	57,150330	16,9593**
Resíduo	96	323,504780	3,369851	

** Significativo ao nível de probabilidade

Tabela 14. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, temperaturas x fontes de nitrogênio, mais aqueles devidos à temperatura

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Temperatura d. KNO_3	1	16,035316	16,035316	4,7584*
Temp. d. Asparagina	1	40,476173	40,476173	12,0112**
Temp. d. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	0,107033	0,107033	0,0317
Temp. d. Caseína	1	8,322128	8,322128	2,4695
Resíduo	96	323,504772	3,369851	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 15. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, período de leitura x temperaturas, mais aqueles devidos a períodos de leitura.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Períodos d. 28°C	2	151,862407	75,931203	22,5325**
Períodos d. 23°C	2	143,506851	71,753425	21,2927**
Resíduo	96	323,504769	3,369851	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 16. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, temperatura x períodos de leituras, mais aquele devido a temperaturas

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Temperaturas d. 7 dias	1	2,973020	2,973020	0,8822 ^{**}
Temperaturas d. 14 dias	1	31,499582	31,499582	9,3474 [*]
Temperaturas d. 21 dias	1	14,868347	14,868347	4,4121
Resíduo	96	323,504749	3,369851	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 17. Comprimento, largura medidos em micra, e septação dos conídios de H. carbonum, produzidos em diferentes meios de cultura.

Meio de Cultura	Variação do Comprimento	Média	Variação da Largura	Média	Variação no nº de Septos	Média
Isolado "7"						
BDA	40,0-80,0	66,84 ^{a/}	12,0-20,0	15,85 ^{a/}	4-11	7,70 ^{a/}
CZAPEK	47,0-71,0	56,88	12,0-18,0	15,55	3-10	7,18
LCH	55,0-95,0	74,57	12,0-20,0	16,63	7-12	8,89
N.A.	24,0-79,0	56,63	12,0-20,0	15,89	2-10	7,11
Isolado "Jac"						
BDA	40,0-87,0	67,23	12,0-20,0	16,42	3-11	8,08
CZAPEK	32,0-79,0	65,97	12,0-20,0	14,53	3-10	7,97
LCH	40,0-95,0	75,37	12,0-20,0	14,76	4-11	8,06
N.A.	32,0-79,0	57,99	12,0-20,0	15,25	2-9	6,60

a/ Médias correspondentes a medições feitas em 100 conídios para cada meio de cultura.

Tabela 18. Comprimento em micra, dos conídios de H. carbonum, isolados "7L" e "Jac", produzidos em diferentes meios de cultura:

Meios de Cultura	Isolados	R E P E T I Ç Õ E S ^{a/}					Média
		I	II	III	IV	V	
BDA	"7L"	60,04	62,02	71,59	68,80	71,75	66,84
	"Jac"	63,20	67,93	69,53	66,76	68,73	67,23
CZAPEK	"7L"	58,06	57,67	53,72	57,28	57,67	56,88
	"Jac"	60,83	61,18	66,36	67,55	69,91	65,17
LCH	"7L"	76,24	76,63	76,63	74,60	68,73	74,57
	"Jac"	72,68	75,84	75,05	78,21	75,05	75,37
N.A.	"7L"	56,90	55,99	58,46	53,33	58,46	56,63
	"Jac"	58,46	59,65	54,91	60,44	56,49	57,99

a/ Média de 20 medições para cada repetição

Tabela 19. Análise de variância para o comprimento dos conídios dos isolados "7L" e "Jac" produzidos em diferentes meios de cultura.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios de cultura	3	1784,028443	594,676147	59,1973 ^{**}
Isolados	1	73,414794	73,414794	7,3081 [*]
Meios x Isolados	3	104,847656	34,949218	3,4790 [*]
Tratamentos	7	1962,290893	280,327270	27,9053 ^{**}
Resíduo	32	321,461181	10,045661	
Total	39	2283,752074		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

C.V. = 4,87%

Tabela 20. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, meios de cultura x isolados, mais aqueles devidos a meios de cultura

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios d. "7L"	3	1122,259522	374,086507	37,2386**
Meios d. "Jac"	3	766,615845	255,538615	25,4377**
Resíduo	32	321,461181	10,045661	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 21. Análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação, isolados x meios de cultura, mais aqueles devidos a isolados

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados d. BDA	1	0,380279	0,380279	0,0378**
Isolados d. CZAPEK	1	171,644500	171,644500	17,0864**
Isolados d. LCH	1	1,600006	1,600006	0,1592
Isolados d. NA	1	4,637603	4,637603	0,4616
Resíduo	32	321,461181	10,045661	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 22. Comprimento, largura, medidos em micra, e septação de conídios de H. carbonum produzidos em tecido foliar de milho

Nº de Amostra	Variação do Comprimento	Média	Variação da Largura	Média	Variação no nº de Septos	Média
Isolado "7L"						
1 ^{a/}	39,0-89,0	70,70	10,0-17,0	13,33	4-10	7,4
2	41,0-94,0	71,67	15,0-20,0	17,43	2-9	6,4
3	51,0-86,0	66,23	12,0-17,0	14,39	4-9	7,6
4	45,0-86,0	73,03	10,0-20,0	13,53	5-10	8,2
5	30,0-100,0	61,49	9,0-17,0	13,42	5-11	7,8
6	53,0-89,0	69,61	12,0-16,0	13,60	6-12	8,1
7	28,0-89,0	66,93	11,0-14,0	12,28	3-10	7,6
8	48,0-88,0	67,98	11,0-14,0	12,55	6-11	8,3
9	32,0-90,0	70,27	9,0-16,0	11,93	4-11	8,5
10	48,0-89,0	72,72	9,0-16,0	12,98	4-10	8,2
Média total		69,06		13,54		7,81
Isolado "Jac"						
1	25,0-96,0	65,79	11,0-19,0	14,03	3-10	7,8
2	42,0-94,0	74,39	11,0-18,0	13,42	4-11	8,8
3	48,0-92,0	78,50	8,0-18,0	12,98	4-12	8,8
4	39,0-92,0	72,89	12,0-15,0	13,25	7-11	8,9
5	39,0-93,0	68,77	8,0-17,0	13,51	4-10	7,4
6	61,0-93,0	80,26	11,0-16,0	14,21	7-11	8,8
7	36,0-96,0	65,53	9,0-18,0	13,60	7-12	9,2
8	48,0-98,0	73,25	11,0-17,0	13,60	5-12	8,4
9	36,0-96,0	70,53	10,0-18,0	12,37	4-12	7,9
10	39,0-90,0	70,62	11,0-18,0	13,87	5-10	8,5
Média total		72,05		13,48		8,45

a/ Cada amostra consistiu da média de 10 conídios

Tabela 23. Tamanho da lesão, em milímetros, apresentado por linhagens S2 de milho, após 12 dias à inoculação com os isolados de H. car
bonum, "7L" e "Jac".

Linhagens	I S O L A D O S			
	"7L"		"Jac"	
	Variação	Média ^{a/}	Variação	Média ^{a/}
Composto A:				
70-2	6,0x2,5 - 1,5x1,0	3,5x1,5	3,0x1,0 - 1,5x0,5	2,2x0,8
133-1	8,0x2,5 - 3,5x2,0	5,5x2,2	5,0x2,0 - 1,5x1,0	3,2x1,5
527	3,5x1,5 - 1,5x0,5	2,5x1,0	2,5x2,0 - 2,0x0,5	2,2x1,3
668	8,5x2,0 - 2,5x1,5	5,2x1,7	2,5x1,5 - 1,0x1,0	1,7x1,2
1117	4,0x2,0 - 1,5x1,5	2,5x1,5	2,5x1,0 - 0,5x0,5	1,3x0,5
Composto B:				
21-1	6,5x2,5 - 1,5x1,0	3,8x1,8	4,0x2,5 - 1,5x1,0	2,7x1,7
64	8,5x2,5 - 3,0x2,0	5,8x2,3	5,5x2,0 - 2,5x1,0	3,8x1,5
255	8,5x2,5 - 4,5x1,5	6,5x2,0	1,0x1,0 - 0,5x0,5	0,8x0,5
397-1	9,0x2,5 - 3,5x1,5	6,7x2,3	3,5x1,5 - 1,5x1,5	2,5x1,5
453-1	6,0x2,5 - 3,0x1,5	4,7x2,2	2,5x1,0 - 1,5x1,0	2,0x1,2
605	3,5x2,0 - 1,5x0,5	2,7x1,5	1,0x1,0 - 0,5x0,5	0,8x0,7
688	10,0x2,5 - 4,5x2,0	7,0x2,2	4,5x2,0 - 2,0x1,5	3,3x1,7
948-2	5,5x2,0 - 2,0x1,0	4,0x1,7	1,0x1,0 - 0,5x0,5	0,8x0,7

a/ Média de 6 lesões