

COMPORTAMENTO DE *Helminthosporium maydis* Nisikado & Miyake
RAÇA T, EM MILHO (*Zea mays* L.) CONTENDO DIFERENTES
CITOPLASMAS PARA ESTERILIDADE MASCULINA

OSWALDO ANTONIO PINTO PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Eric Balmer

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1976

Aos

meus pais,

esposa,

e filho

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

Apresento os mais sinceros agradecimentos:

- Ao Professor Dr. Eric Balmer, pela valiosa orientação, apoio e sugestões prestadas durante a realização do presente trabalho;
- Aos Professores Dr. Ferdinando Galli e Dr. Clélio Lima Salgado, pela prestimosa colaboração na revisão dos originais e sugestões;
- A Sementes Agrocere S/A., especialmente ao seu Diretor Técnico Dr. Gladstone A. Drummond, pelas facilidades oferecidas durante a participação no Curso de Pós-Graduação e realização deste trabalho;
- Ao Eng^o-Agr^o Walter Sérgio Pinto Pereira, pela imprescindível ajuda por ocasião dos trabalhos de campo e laboratório.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	3
3 - REVISÃO DA LITERATURA	5
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1 - Meios de Cultura Utilizados	10
4.2 - Isolamento e Reisolamento do Patógeno	11
4.3 - Manutenção de Culturas e Preparo do Inóculo	11
4.4 - Inoculação	12
4.5 - O Patógeno	13
4.6 - O Hospedeiro	14
4.7 - Obtenção das Plantas para Inoculação e Substrato Utilizado	15
4.8 - Ensaio Realizados	16
4.8.1 - Efeito da duração do período de permanência de <i>H. maydis</i> , raça T, em plantas de di- ferentes idades e de tipos de citoplasmas, sobre a capacidade de reisolamento do pató- geno. Ensaio 1	16
4.8.2 - Patogenicidade de isolados de <i>H. maydis</i> em três diferentes citoplasmas. Ensaio 2 e 3	19

4.8.3 - Efeito da passagem de isolados de <i>H. maydis</i> raça T , pelos citoplasmas C , N e T sobre a patogenicidade aos diferentes citoplasmas. Ensaio 4	19
4.8.4 - Efeito da interação genética-citoplasmática na manifestação do sintoma causado pela raça T de <i>H. maydis</i> . Ensaio 5	20
4.9 - Avaliação dos Ensaios	21
5 - RESULTADOS	22
5.1 - Efeito da duração do período de permanência de <i>H. maydis</i> , raça T , em plantas de diferentes idades e de tipos de citoplasmas, sobre a capacidade de reisolamento do patógeno. Ensaio 1	22
5.2 - Estudo comparativo para a patogenicidade de quatro isolados de <i>H. maydis</i> em três diferentes citoplasmas. Ensaio 2	29
5.3 - Estudo comparativo para a patogenicidade entre um isolado de <i>H. maydis</i> , raça T , e um isolado monospórico, obtido a partir do primeiro, sobre diferentes citoplasmas. Ensaio 3	32
5.4 - Efeito da passagem de isolados de <i>H. maydis</i> raça T , pelos citoplasmas C , N e T sobre a patogenicidade aos diferentes citoplasmas. Ensaio 4	34
5.5 - Efeito da interação genética-citoplasmática na manifestação do sintoma causado pela raça T de <i>H. maydis</i> . Ensaio 5	38

	Página
6 - DISCUSSÃO	40
7 - CONCLUSÕES	46
8 - SUMMARY	48
9 - LITERATURA CITADA	50
10 - APÊNDICE	54

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Isolados utilizados e sua origem	14
TABELA 2 - Constituição citoplasmática e gênica dos diferentes híbridos utilizados	15
TABELA 3 - Efeito da idade da planta, constituição citoplasmática e período de permanência do patógeno na planta sobre a capacidade de reisolamento de <i>H. maydis</i> , raça T	23
TABELA 4 - Tamanho médio, em milímetros, das lesões causadas por quatro diferentes isolados de <i>H. maydis</i> em três híbridos com diferentes citoplasmas	29
TABELA 5 - Tamanho médio, em milímetros, das lesões causadas por dois isolados de <i>H. maydis</i> em híbridos com diferentes citoplasmas	32
TABELA 6 - Tamanho médio de lesões, em milímetros, causadas por diferentes isolados de <i>H. maydis</i> , após a passagem por diferentes citoplasmas, sobre híbridos com citoplasmas C, N e T	35
TABELA 7 - Tamanho médio de lesões, em milímetros, causadas por <i>H. maydis</i> , raça T, em híbridos isogênicos e não isogênicos em citoplasmas N e C	39

LISTAS DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Esquema do Ensaio 1	18
FIGURA 2 - Efeito da idade das plantas ao serem inoculadas e período de permanência do patógeno nas folhas sobre a capacidade de reisolamento em diferentes híbridos	26
FIGURA 3 - Efeito da constituição citoplasmática e período de permanência do patógeno no hospedeiro sobre a capacidade de reisolamento em plantas com diferentes idades por ocasião da inoculação	27
FIGURA 4 - Efeito da constituição citoplasmática e idade das plantas ao serem inoculadas sobre a porcentagem de reisolamento de <i>H. maydis</i> , para diferentes períodos de permanência no hospedeiro	28
FIGURA 5 - Tamanho médio de lesões causadas por quatro diferentes isolados de <i>H. maydis</i> , raça T, em três híbridos possuidores de diferentes citoplasmas para esterilidade masculina	30
FIGURA 6 - Tamanho médio de lesões causadas por um isolado de <i>H. maydis</i> , raça T, e um isolado monospórico obtido deste em três híbridos possuidores de diferentes citoplasmas para macho esterilidade	33
FIGURA 7 - Tamanho médio de lesões causadas por quatro diferentes isolados de <i>H. maydis</i> com passagem por diferentes citoplasmas sobre três híbridos possuidores de diferentes citoplasmas	36

1 - RESUMO

O presente trabalho teve por finalidade conhecer o comportamento de diferentes citoplasmas para esterilidade masculina em milho em relação a raça T de *Helminthosporium maydis* ; estudar o efeito da duração do período de permanência do fungo em plantas de diferentes idades e de diferentes tipos de citoplasmas sobre a sua sobrevivência ; observar a patogenicidade de diferentes isolados da raça T do patógeno ; e verificar uma possível ocorrência de uma seleção direcional do fungo para maior patogenicidade a citoplasmas resistentes.

O trabalho revelou que tecidos novos de plantas jovens apresentaram uma maior porcentagem de reisolamento do fungo quando comparada com aquela obtida para tecidos novos em plantas mais velhas num período de uma semana de permanência do patógeno no hospedeiro. A partir da terceira semana de permanência, as diferenças nas porcentagens de reisolamento

to para as plantas de diferentes idades diminuem considerando-se, separadamente, os híbridos resistentes e o híbrido suscetível. A partir deste período, a capacidade de reisolamento foi inferior nos híbridos resistentes quando comparados com o suscetível.

Ocorreram diferenças quanto a patogenicidade dos diferentes isolados utilizados no trabalho, mas estes não mostraram seleção para maior patogenicidade ao hospedeiro do qual foram reisolados.

Os isolados mostraram-se mais patogênicos para o híbrido possuidor de citoplasma T para esterilidade masculina, enquanto o citoplasma C apresentou uma tendência para maior resistência quando comparado ao citoplasma N, sendo ambos considerados como resistentes ao patógeno.

2 - INTRODUÇÃO

Embora os principais fatores limitantes do rendimento do milho sejam os relativos ao ambiente no qual é realizada a cultura, esta espécie está sujeita a incidência de diversas doenças. No Brasil em muitos casos não se dispunha de dados sobre a ocorrência e importância das mesmas, e por isso esses problemas não vinham recebendo a atenção que mereciam.

Por volta de maio de 1970, surgiu nos Estados Unidos uma nova raça de *Helminthosporium maydis* que veio causar grandes prejuízos a cultura de milho. Em novembro do mesmo ano, a ocorrência da doença foi constatada no Brasil, e devido a sua importância, a partir desta data, as doenças de milho ganharam maiores atenções dos melhoristas brasileiros, que já estão incluindo em seus programas de melhoramento o aspecto fitossanitário da cultura.

O milho híbrido comercializado no Brasil é o híbrido duplo, obtido do cruzamento de dois híbridos simples que por sua vez são resultados do cruzamento de duas linhagens. Para produção de sementes de milho híbrido, em escala comercial, há necessidade do despendoamento das linhagens ou do híbrido simples que servirá como fêmea. Para facilitar o trabalho de cruzamento, os melhoristas introduziram nas plantas que servirão como fêmeas um fator citoplasmático que confere a esterilidade masculina, tornando-se então desnecessária a prática do despendoamento.

Diferentes citoplasmas podem provocar a esterilidade masculina em plantas de milho, mas o citoplasma Texas era largamente usado por apresentar uma série de vantagens. A nova raça de *Helminthosporium maydis*, denominada raça T, é específica a este tipo de citoplasma, vindo provocar um grande prejuízo nos campos semeados com sementes de milho híbrido obtido com o citoplasma Texas.

A presente pesquisa teve como finalidade conhecer o comportamento de diferentes citoplasmas para esterilidade masculina utilizadas no Brasil para a raça T do patógeno que ocorre no Brasil; conhecer o efeito que diferentes citoplasmas poderão ter sobre a sobrevivência da raça T e em que fase da doença atua o processo; verificar possíveis diferenças de patogenicidade entre isolados da raça T; como também ter noções sobre uma provável ocorrência de genes de patogenicidade a outros citoplasmas em isolados da raça T do patógeno.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

Helminthosporium maydis Nisikado e Miyake , agente causal de uma das doenças conhecidas por helminthosporiose e atualmente denominado por alguns autores de *Bipolaris maydis* (Nisikado) Shoemaker, apresenta a forma perfeita correspondente a *Cochliobolus heterostrophus* Drechs. HOOKER *et alii* (1970,b) relataram a ocorrência de duas raças do fungo, denominadas de raça T e raça O , sendo a primeira mais importante para a cultura do milho. A raça T é diferenciada da raça O pela sua alta especificidade à plantas de milho contendo o citoplasma Texas para esterilidade masculina, devido a maior severidade de doença que causa em toda a parte aérea da planta, pelos sintomas que são produzidos com maior rapidez após inoculação e pela alta capacidade de disseminação.

Embora a doença causada pela raça T tenha ocorrido de forma epidêmica somente a partir de 1970, NELSON *et alii* (1970) relataram que o patógeno existia desde 1958. Numa coleção de 165 isolados de *Helminthosporium maydis*, 150 pertenciam à raça T e 15 à raça O, tendo sido eles obtidos do Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Inglaterra, Grécia, Guatemala, África, Holanda, Itália, México, Perú, Escócia, Espanha, Tailândia e Estados Unidos, no período de 1958 a 1967. AALA (1964) relatou que desde 1964 a doença era fator limitante para o cultivo de milho possuidor de citoplasma T para esterilidade masculina nas Filipinas.

BECKETT (1971) classificou os citoplasmas que conferem esterilidade masculina em três grupos, sendo o grupo S composto pelos citoplasmas S, G, I, J, M, R, ML, VG, F, H, K, L, W, CA, EK, IA, MY, PS, SD e TA; o grupo C composto pelos citoplasmas C e RB; e o grupo T composto pelos citoplasmas T, Q, HA e P. SMITH *et alii* (1971) testaram estes citoplasmas classificados por BECKETT e concluíram que os grupos S e C são resistentes, enquanto que o grupo T é suscetível a raça T do patógeno. Os citoplasmas B, O e ME não foram enquadrados em nenhum destes grupos, mas são resistentes ao patógeno.

Com relação a especificidade das raças de *H. maydis* para diferentes citoplasmas, SCHEIFELE (1971); HOOKER *et alii* (1970,a) e BERGQUIST e PEVERLY (1972), além de outros autores verificaram que a raça T é específica à plantas de milho possuidoras de citoplasma Texas para esterilidade masculina. HOOKER *et alii* (1970,b); GOOD e SCHENCK (1973); GOOD e HORNER (1974); LAUGHNAN e GABAY (1973), além de outros observaram que a raça O não apresenta especificidade citoplasmática.

CRAIG e KALIO (1968) , baseados no tipo, número e tamanho das lesões e na esporulação do patógeno quando o tecido afetado é colocado em ambiente úmido, mostraram que existe resistência genética para a raça O , sendo que SMITH e HOOKER (1973) , baseados no tipo de lesões, verificaram que a resistência é controlada por um par de genes recessivos, não havendo diferença quanto a resistência entre plantas com citoplasma normal e citoplasma Texas quando portadoras do referido gene.

No tocante a avaliação dos citoplasmas em resistentes ou suscetíveis à raça T baseada no tipo de lesões, na capacidade de esporulação do patógeno em lesões quando colocadas em ambiente úmido, no crescimento da raiz principal e encharcamento de secções foliares na presença de toxina produzida pelo fungo, HOOKER *et alii* (1970,a) concluíram que os citoplasmas N , S e C para esterilidade masculina são resistentes à raça T , enquanto que os citoplasmas T e P se comportaram como suscetíveis. Trabalhando com tipos de lesões, graus de esporulação e dano na primeira folha das plântulas inoculadas, HILTY e JOSEPHSON (1971) classificaram o citoplasma J como resistente ao fungo. Realizando teste de patogenicidade em diferentes locais, MASO e ZUBER (1972) relatam como resistentes os citoplasmas ML , MY , RB , S , C , N e El Salvador e como suscetíveis os citoplasmas T , HA e Q .

Utilizando três linhagens com citoplasma T , possuidoras de diferentes níveis de resistência, sendo uma resistente, uma suscetível e outra intermediária, LIM (1974) realizou o cruzamento com outras três linhagens também possuidoras de um dos três diferentes níveis de resistência. Com a avaliação baseada no tamanho de lesões, o autor concluiu

que a resistência gênica foi parcialmente dominante em híbridos com citoplasma T para a esterilidade masculina.

Trabalhando com diferentes citoplasmas para esterilidade masculina, BERGQUIST e PEVERLY (1972) mostraram que houve uma interação entre o genótipo e o citoplasma para a manifestação da resistência ao patógeno, sendo a avaliação baseada no tipo das lesões e na capacidade de esporulação do patógeno em lesões quando colocadas em ambiente úmido. Vários híbridos contendo o mesmo citoplasma foram testados, sendo que para o citoplasma T foi observada uma variação de moderadamente resistente a suscetível ; nos citoplasmas normal e C as reações variaram de altamente resistente a resistente ; no citoplasma S de altamente resistente a moderadamente resistente ; enquanto que no citoplasma El Salvador não ocorreu variação, sendo ele classificado como altamente resistente.

LIM *et alii* (1974) relataram que todos os híbridos possuidores de citoplasma Texas apresentaram a doença, porém observaram uma influência da carga genética quando foi medida a produção, mostrando assim haver diferentes níveis de tolerância. Trabalhando com nove linhagens e 144 cruzamentos simples recíprocos de citoplasmas T e N , HALLAUER e MARTINSON (1975) realizaram observações quanto a produção, acamamento, tombamento, dias para florescimento, umidade do grão, número e tamanho de lesões causadas pelo fungo em casa de vegetação e em condições de campo. Os resultados obtidos revelaram que existem diferentes níveis de resistência ou suscetibilidade ao fungo, que são influenciadas pela carga genética, sendo que o efeito para cruzamentos simples foi maior que para linhagens.

Por outro lado, em estudo realizado com diferentes citoplasmas, SMITH *et alii* (1971) mostraram que todos se comportam uniformemente em todas as cargas genéticas, com exceção do citoplasma TC que variou de resistente a suscetível dependendo de seu genótipo.

Com objetivo de estudar a sobrevivência de *H. maydis* na fase parasítica, NELSON (1971) inoculou no centro de um campo cultivado com milho suscetível às duas raças do patógeno, uma mistura na mesma proporção de um isolado da raça T e um isolado da raça O. De um total de 910 isolados obtidos após a maturidade das plantas, 63% foram da raça T e 37% da raça O, sugerindo que a primeira tem uma maior capacidade de disseminação e sobrevivência na fase parasítica.

Ainda com relação a sobrevivência do patógeno, BLANCO e NELSON (1972) inocularam, no centro, uma população de milho com citoplasma normal, com 17 isolados da raça O e 15 isolados da raça T. Após ter decorrido um ciclo parasítico foi realizada a recuperação do patógeno em plantas não inoculadas artificialmente, sendo que a incidência de raça O foi de 95,2% e de raça T de 4,7%, mostrando assim que a sobrevivência da primeira é maior em milho com citoplasma normal para macho esterilidade.

GOOD e SCHENCK (1973) relataram que a raça T é a raça pre dominante nos campos da Flórida cultivados com milho possuidor de citoplasma T, embora 93% do milho plantado na região seja de citoplasma normal. A raça O predomina em milho com citoplasma normal, ocorrendo variação dependendo do genótipo do material.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Para o isolamento e reisolamento do patógeno foi utilizado o substrato agar-água (KELMAN, 1967) , contendo 20 g de agar-agar para 1.000 ml de água destilada.

Os isolados e reisolados obtidos foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio inclinado de lactose-caseína hidrolizada-agar (LCA) com a seguinte composição: 10 g de lactose , 10 g de caseína hidrolizada e 20 g de agar para 1.000 ml de água destilada.

Para o preparo do inóculo, foram utilizados os meios de cultura LCA e LCH (MALCA e ULLSTRUP, 1962) , este com a seguinte composição: 37,5 g de lactose , 3,0 g de caseína hidrolizada , 1,0 g de

KH_2PO_4 , 0,5 g de MgSO_4 , 2 ml de uma solução de micronutrientes (Fe , Zn , Mn) e 15,0 g de agar para 1.000 ml de água destilada, em pH 6,0 .

Os substratos, acima mencionados, foram esterilizados em autoclave a 120°C , durante quinze minutos.

4.2 - ISOLAMENTO E REISOLAMENTO DO PATÓGENO

Os isolados iniciais foram obtidos a partir de isolamentos feitos em folhas, colmos e grãos de milho, enquanto que aqueles obtidos por reisolamentos foram oriundos de folhas. As partes lesionadas contendo o patógeno foram desinfetadas superficialmente durante um minuto em solução de hipoclorito de sódio, obtida mediante a diluição de uma parte de QBoa, solução comercial de hipoclorito de sódio contendo 5% de cloro ativo, com três partes de água, sendo em seguida lavado em água estéril. Assepticamente, com auxílio de pinça flambada, as partes lesionadas foram transferidas para placas de petri contendo agar-água. Por ocasião do reisolamento do patógeno, as placas contendo os fragmentos de tecidos vegetais foram deixadas durante cinco dias em condições ambientais de laboratório.

4.3 - MANUTENÇÃO DE CULTURAS E PREPARO DO INÓCULO

Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio inclinado de LCA , sendo repicados, quando necessário, antes que

ocorresse o secamento total do meio.

Para o primeiro ensaio, envolvendo tanto a inoculação de plantas no campo como em casa de vegetação, o inóculo foi produzido em placas de petri com meio de cultura LCA . Para a cultura a ser testada, uma pequena porção do meio de cultura contendo estrutura do patógeno, fragmentos de micélio e esporos, foi transferida assepticamente do meio em que era feita a manutenção do isolado para placas de petri contendo o meio LCA . As placas, em seguida, foram mantidas à temperatura ambiental durante sete dias. Após este período, foi feita uma suspensão de conídios e micélio, usando-se 50 ml de água destilada por placa. A suspensão obtida foi, a seguir, passada por duas camadas de gaze, a fim de se obter uma suspensão de estruturas do patógeno livre de fragmentos do meio de cultura. Não foi feita determinação para a concentração dos esporos na suspensão.

Para os demais ensaios, o método de produção de inóculo foi semelhante ao acima mencionado, sendo no entanto, usado o meio LCH . A concentração de conídios na suspensão a ser usada como inóculo foi ajustada para $7,5 \times 10^3$ conídios/ml. Para um isolado que não produziu conídios, foi preparada uma suspensão de micélio, usando-se para isto 50 ml de água destilada por placa de petri.

4.4 - INOCULAÇÃO

Para o primeiro ensaio, realizado com plantas possuindo diferentes idades, a inoculação foi feita no final da tarde, colocando-se

a suspensão usada como inóculo no cartucho das plantas. Para plantas com 49 e 35 dias de idade, a quantidade de inóculo usada foi de 10 ml por planta, enquanto que para plantas com 21 e 14 dias a quantidade de inóculo usada foi de 1 ml da suspensão por planta.

Para os demais ensaios, também foi usado o método de inoculação no cartucho, usando-se 1 ml da suspensão do inóculo por planta, sendo as inoculações feitas por volta das vinte horas.

As plantas inoculadas foram deixadas em condições de casa de vegetação ou condições de campo, sem o uso de câmara úmida.

4.5 - O PATÓGENO

Os isolados de *Helminthosporium maydis*, raça T, utilizados no presente trabalho, foram obtidos de diferentes partes de plantas de milho híbrido coletadas em diferentes municípios, conforme é apresentado na Tabela 1.

Para se ter uma maior segurança em trabalhar com isolados representativos da raça T de *H. maydis*, os diferentes isolados foram passados, separadamente, duas vezes por plantas de milho contendo citoplasma T para esterilidade masculina antes de serem utilizados nos ensaios.

Todos os isolados utilizados apresentavam aspectos idênticos no tocante a morfologia dos conídios, excetuando-se o isolado 9 T que não apresentou esporulação.

TABELA 1 - Isolados utilizados e sua origem

Isolado	Parte da Planta	Município
2 T	folha	Alvorada (PR)
9 T	grãos	Guaraçai (SP)
11 T	colmo	São José do Rio Preto (SP)
14 T	folha	Cachoeira Dourada (MG)

4.6 - O HOSPEDEIRO

As plantas utilizadas foram plantas híbridas com diferentes citoplasmas, mas com germoplasmas bastante próximos, sendo os híbridos apresentados na Tabela 2 .

TABELA 2 - Constituição citoplasmática e gênica dos diferentes híbridos utilizados

Híbridos	Citoplasma	Germoplasma
Ag 25	Normal (N)	{A x (B x C ^{a/})} x (D ^{b/} x E)
Ag 28	Charrua (C)	{A x (B x F)} x (G x E)
HSF	Texas (T)	(D x E) x H
TGe	Normal (N)	G x E
CME	Charrua (C)	G x E

a/ Germoplasma bastante semelhante a F .

b/ Germoplasma bastante semelhante a G .

4.7 - OBTENÇÃO DAS PLANTAS PARA INOCULAÇÃO E SUBSTRATO UTILIZADO

Para obtenção de plantas no campo, foram semeadas dez sementes por metro, em fileiras de cinco metros de comprimento, sendo mais tarde realizado um desbaste reduzindo-se o número para quatro plantas por metro. O espaçamento entre linhas foi de um metro.

O substrato utilizado para obtenção das plantas, em condições de casa de vegetação, foi uma mistura de terra roxa, areia e esterco, respectivamente, na proporção aproximada de 8:6:1, que foi esterilizado em autoclave a temperatura de 110°C, 0,5 atmosfera de pressão, durante duas horas.

As sementes, em número de dez, foram semeadas em vaso de barro, com dezoito centímetros de diâmetro superior e desesseis centímetros de altura, contendo o substrato previamente citado. O número de plantas por vaso foi mais tarde reduzido para quatro. A inoculação foi realizada quando as plantas estavam num estágio de desenvolvimento correspondente ao de quatro a cinco folhas.

4.8 - ENSAIOS REALIZADOS

4.8.1 - Efeito da duração do período de permanência de *H. maydis*, raça T, em plantas de diferentes idades e de tipos de citoplasmas, sobre a capacidade de reisolamento do patógeno. Ensaio 1.

Sementes dos híbridos Ag 25, Ag 28 e HSF, possuidores respectivamente de citoplasmas N, C e T para a esterilidade masculina, foram plantadas no campo, em diferentes períodos, a fim de que por ocasião da inoculação as plantas tivessem 49, 35 e 21 dias de idade. Plantas dos mesmos híbridos com 14 dias de idade também foram usadas, sendo elas obtidas em vasos de barro em condições de casa-de-vegetação.

O efeito do período de permanência do patógeno nas plantas com diferentes idades e diferentes citoplasmas sobre a capacidade de reisolamento do fungo foi determinado mediante reisolamentos feitos 1, 3, 5 e 7 semanas após a inoculação. Para cada tratamento, combinação de idade da planta, tipo de citoplasma e período de permanência, foram coleta

das 27 lesões tomadas ao acaso. Estas foram, após desinfecção superficial, transferidas e mantidas separadamente em placas de petri contendo agar-água. As placas de petri foram deixadas em condições ambientais de laboratório. As lesões dos híbridos Ag 25 e Ag 28 eram pequenas possuindo centros necróticos com halos cloróticos, sendo as lesões do híbrido HSF maiores, encharcadas e sem halos cloróticos. Para plaqueamento foi tomada metade das lesões menores, incluindo parte do centro necrótico e do halo clorótico, enquanto das lesões maiores somente parte do bordo foi utilizada. Cinco dias após o plaqueamento do tecido foliar para o reisolamento do patógeno, foi feita a contagem do número de colônias obtidas a partir do tecido plaqueado, representando estas os casos nos quais o fungo foi capaz de sobreviver e ser reisolado. A avaliação dos efeitos para os diferentes tratamentos foi baseada na porcentagem dos casos em que foi possível reisolar o patógeno.

O esquema deste ensaio está representado na Figura 1 .

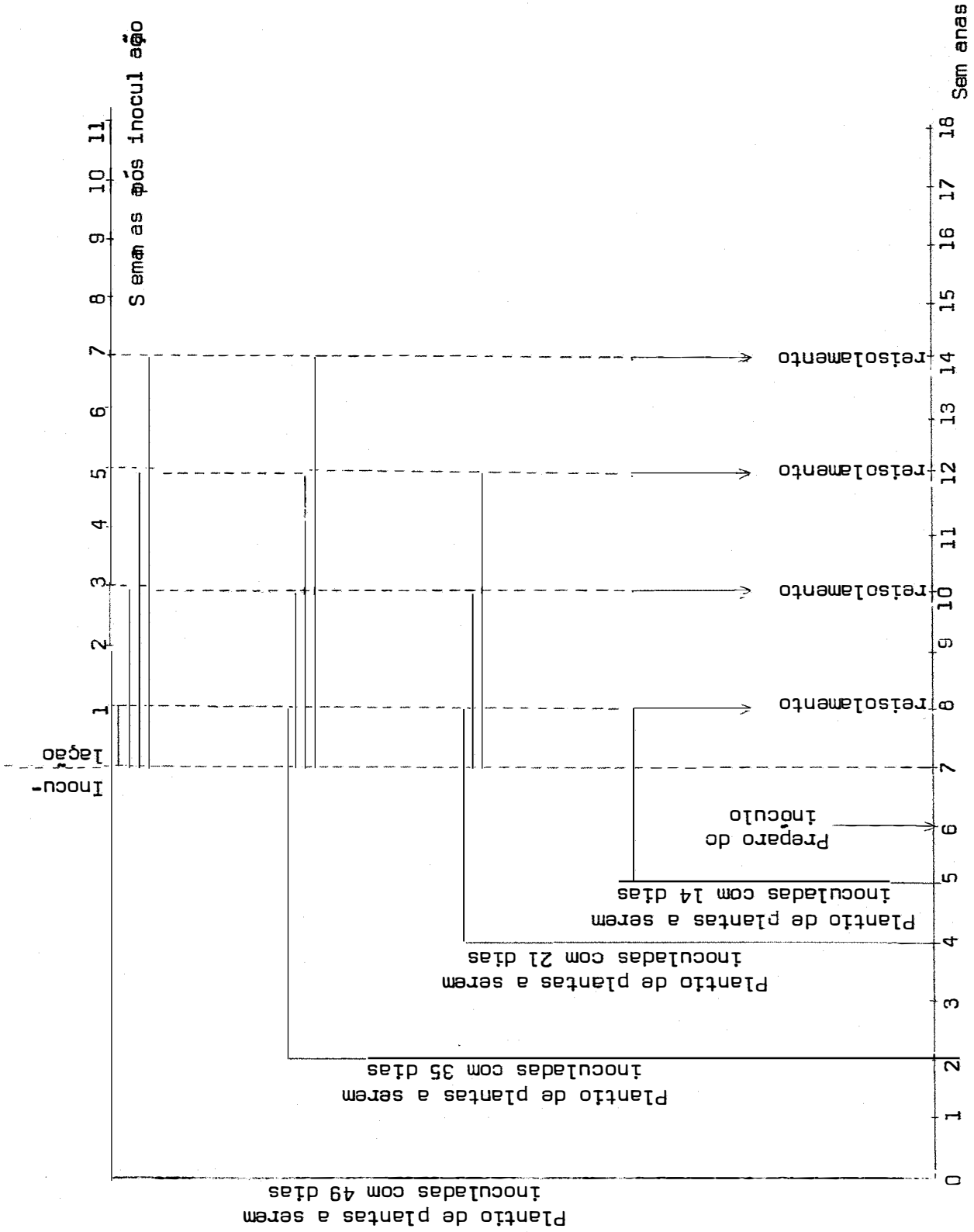


FIGURA 1 - Esquema do Ensaio 1

4.8.2 - Patogenicidade de isolados de *H. maydis* em três diferentes citoplasmas. Ensaio 2 e 3 .

Para estudar a patogenicidade de *H. maydis* , raça T , a diferentes citoplasmas, foram realizados dois ensaios. No primeiro ensaio, correspondente ao de número 2 , foram testados quatro isolados diferentes codificados como 2 T , 9 T , 11 T e 14 T e obtidos de diferentes partes de plantas cultivadas em diferentes regiões. No segundo ensaio , o de número 3 , foram comparados entre si os isolados 2 T e um monospórico obtido a partir deste, que recebeu o código 2 MT .

Os dois ensaios foram realizados com plântulas dos híbridos Ag 25 , Ag 28 e HSF no estágio de desenvolvimento de quatro a cinco fo-lhas e obtidos em condições de casa de vegetação. Nos dois ensaios a patogenicidade baseada no comprimento longitudinal das lesões, para cada tratamento em cada uma das três repetições foi determinada medindo-se seis lesões tomadas ao acaso. O delineamento experimental foi o de blo-cos casualizados.

4.8.3 - Efeito da passagem de isolados de *H. maydis* , raça T , pelos citoplasmas C , N e T sobre a patogenicidade aos diferentes citoplasmas. Ensaio 4 .

A ocorrência de uma possível alteração na patogenicidade da raça T aos citoplasmas C e N , devido a ocorrência de uma seleção dire - cional foi estudada para os quatro isolados utilizados no ensaio 2 . Cada isolado foi, separadamente, inoculado e reisolado de plantas dos híbri

dos Ag 25 , Ag 28 e HSF , possuidores, respectivamente, dos citoplasmas N , C e T . O período de permanência dos patógenos nas plantas foi de aproximadamente quinze dias, sendo ele em seguida reisolado e testado para a patogenicidade aos três citoplasmas citados. A avaliação da patogenicidade foi feita medindo-se o comprimento longitudinal de lesões tomadas ao acaso. Para cada tratamento, combinação entre reisolado e citoplasma, foram feitas três repetições, fazendo-se seis medições em cada uma delas. O delineamento seguido para o ensaio foi o de blocos casualizados.

4.8.4 - Efeito da interação genética-citoplasmática na manifestação do sintoma causado pela raça T de *H. maydis* . Ensaio 5 .

No ensaio 5 , foi comparado o comportamento de plântulas dos híbridos Ag 28 e Ag 25 , possuidores respectivamente do citoplasma C e N para a esterilidade masculina, com aquele apresentado por plântulas dos híbridos TGe e CME , possuidores, respectivamente, dos citoplasmas N e C , quando inoculados com o isolado 2 T de *H. maydis* . A avaliação foi feita baseada no tamanho das lesões, num experimento inteiramente casualizado com três repetições. Para cada tratamento, em cada uma das repetições, foram medidas dez lesões tomadas ao acaso.

4.9 - AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS

No primeiro ensaio, a avaliação para efeito do período de permanência do patógeno em diferentes citoplasmas sobre a capacidade de sobrevivência, foi feita baseando-se na porcentagem de recuperação do patógeno. Para isso, foram realizados para cada tratamento vinte e sete isolamentos em agar-água, sendo as lesões foliares escolhidas ao acaso.

Nos ensaios de patogenicidade, a avaliação para a capacidade de colonização foi determinada medindo-se, com auxílio de um paquímetro, o comprimento longitudinal de lesões, tomadas ao acaso, em plantas com aproximadamente noventa horas após inoculação.

5 - RESULTADOS

5.1 - EFEITO DA DURAÇÃO DO PERÍODO DE PERMANÊNCIA DE *H. maydis* RAÇA T , EM PLANTAS DE DIFERENTES IDADES E DE TIPOS DE CI-TOPLASMAS, SOBRE A CAPACIDADE DE REISOLAMENTO DO PATÓGENO. Ensaio 1 .

Os resultados obtidos para o efeito do período de permanência de *H. maydis* , raça T , em plantas, com diferentes idades e citoplasmas, e a capacidade de reisolamento do fungo são apresentados na Tabela 3 .

Os resultados revelaram que houve uma certa influência do tempo de permanência do patógeno na planta, da idade da planta ao ser inoculada e dos híbridos possuidores de diferentes citoplasmas para esterilidade masculina sobre a recuperação do fungo.

TABELA 3 - Efeito da idade da planta, constituição citoplasmática e período de permanência do patógeno na planta sobre a capacidade de reisolamento de *H. maydis*, raça T.

Idade da planta ao ser inoculada	Híbrido	Período de permanência na planta hospedeira			
		1 Semana	3 Semanas	5 Semanas	7 Semanas
7 Semanas	Ag 25	16,67 ^{a/}	24,96	64,26	79,20
	Ag 28	8,33	41,16	74,97	55,44
	H S F	41,67	95,68	92,82	100,00
5 Semanas	Ag 25	29,17	54,08	60,69	75,24
	Ag 28	45,83	66,56	49,98	67,32
	H S F	29,17	79,04	100,00	96,04
3 Semanas	Ag 25	87,50	54,08	74,97	
	Ag 28	79,17	41,60	78,54	
	H S F	75,00	100,00	100,00	
2 Semanas	Ag 25	91,67			
	Ag 28	86,96			
	H S F	79,17			

a/ Porcentagem, de um total de 27 lesões, em que foi possível reisolamento do patógeno.

O efeito de diferentes idades das plantas ao serem inoculadas e do período de permanência do patógeno nos tecidos do hospedeiro, para os diferentes híbridos, é apresentado na Figura 2 . Nas plantas com duas e três semanas de idade por ocasião da inoculação, a porcentagem de recuperação após a primeira semana, foi maior quando comparada com aquela obtida para plantas mais velhas, nos três híbridos estudados.

Considerando, para um mesmo híbrido, as diferentes idades das plantas ao serem inoculadas e os períodos de permanência do patógeno nas plantas, os dados revelam, que existe, durante o período de permanência de uma a sete semanas, uma tendência para a diminuição nas diferenças obtidas para as porcentagens de reisolamentos nos três híbridos estudados.

O efeito da constituição do citoplasma das plantas, para plantas inoculadas com uma mesma idade, e a duração do período de permanência do patógeno na planta sobre a capacidade de reisolamento do fungo é apresentado na Figura 3 .

Considerando, para uma mesma idade da planta ao ser inoculada, a porcentagem de reisolamentos obtidos para diferentes híbridos em diferentes períodos de permanência do patógeno nas plantas, foi observado que, para plantas inoculadas com três semanas de idade, nos híbridos resistentes houve uma redução na porcentagem de reisolamentos obtidos para o período de três semanas quando comparado com a porcentagem obtida para o híbrido suscetível. Para plantas com idade de cinco semanas ao serem inoculadas, os dados sugerem uma tendência para uma proporcionalidade direta entre o número de reisolamentos obtidos e o período de permanência na planta. Nas plantas com sete semanas de idade, houve uma cer

ta proporcionalidade entre o número de reisolamentos obtidos e o período de permanência do patógeno nas plantas.

A relação entre o efeito da constituição citoplasmática e a idade das plantas ao serem inoculadas sobre a capacidade de reisolamento do patógeno é apresentada na Figura 4 .

Considerando-se a frequência de reisolamento do patógeno de hospedeiros com diferentes citoplasmas para plantas inoculadas em diferentes idades, foi observado que para o tempo de permanência de uma semana houve uma semelhança nas tendências observadas nos três híbridos. Para os casos de permanência do patógeno nos tecidos do hospedeiro por períodos de três a sete semanas, foram observadas tendências diferentes quanto a capacidade de reisolamento do patógeno a partir dos três híbridos inoculados em diferentes idades. De modo geral, para estes casos, a porcentagem de reisolamentos obtidos dos híbridos resistentes foi menor quando comparada com aquela obtida para o híbrido suscetível.

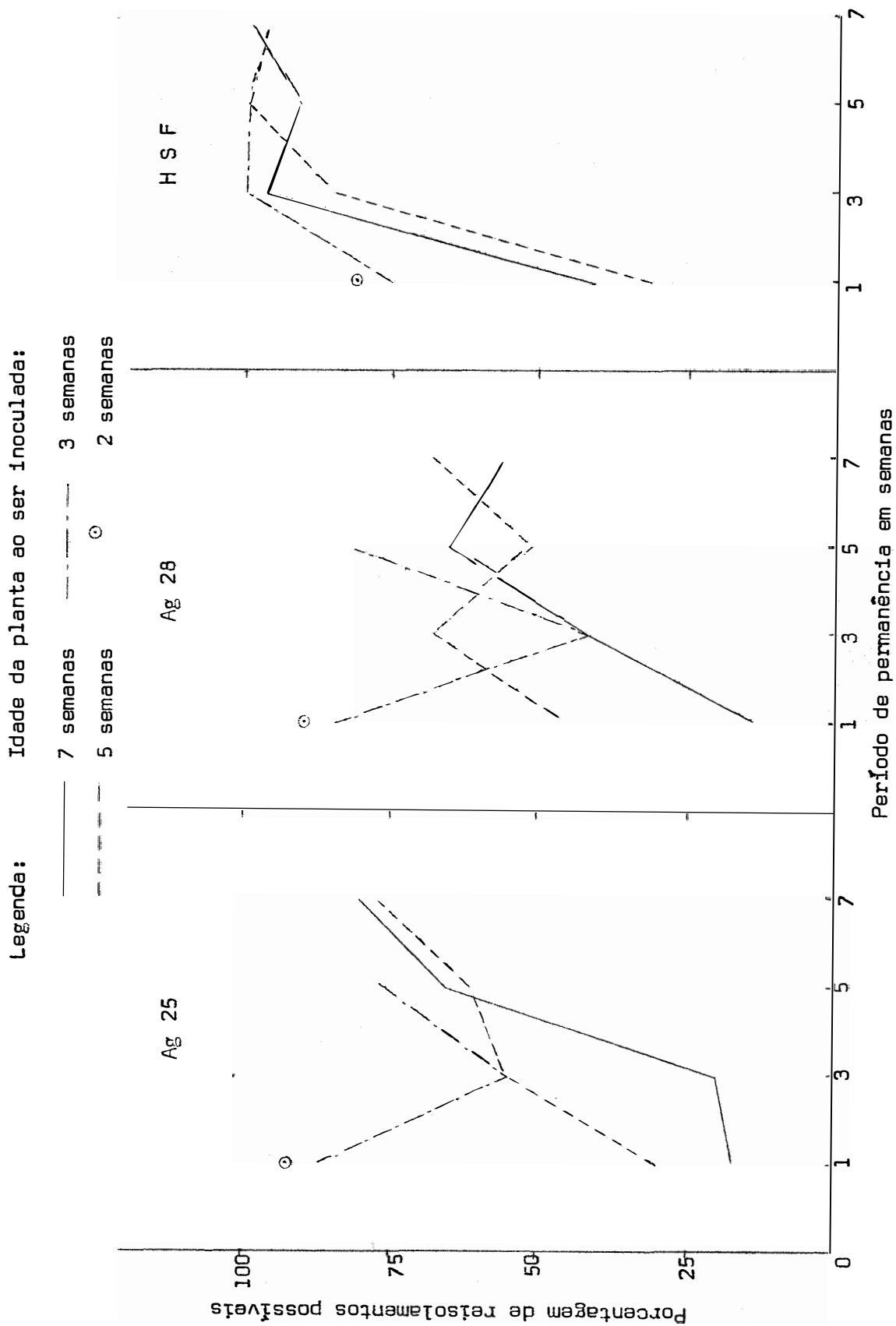


FIGURA 2 - Efeito da idade das plantas ao serem inoculadas e período de permanência do patógeno nas folhas sobre a capacidade de reisolamento em diferentes híbridos.

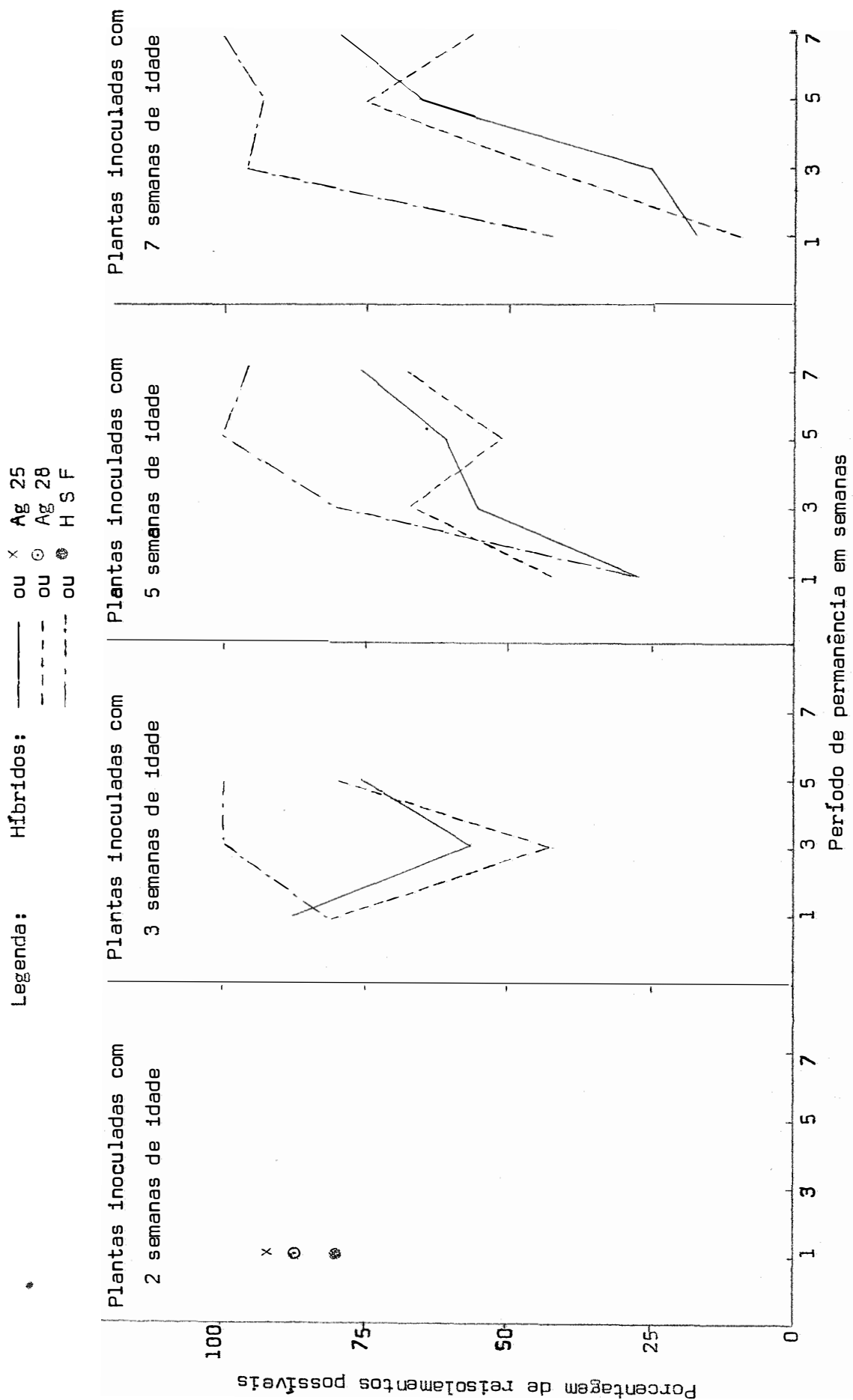


FIGURA 3 - Efeito da constituição citoplasmática e período de permanência do patógeno no hospedeiro sobre a capacidade de reisolamento em plantas com diferentes idades por ocasião da inoculação.

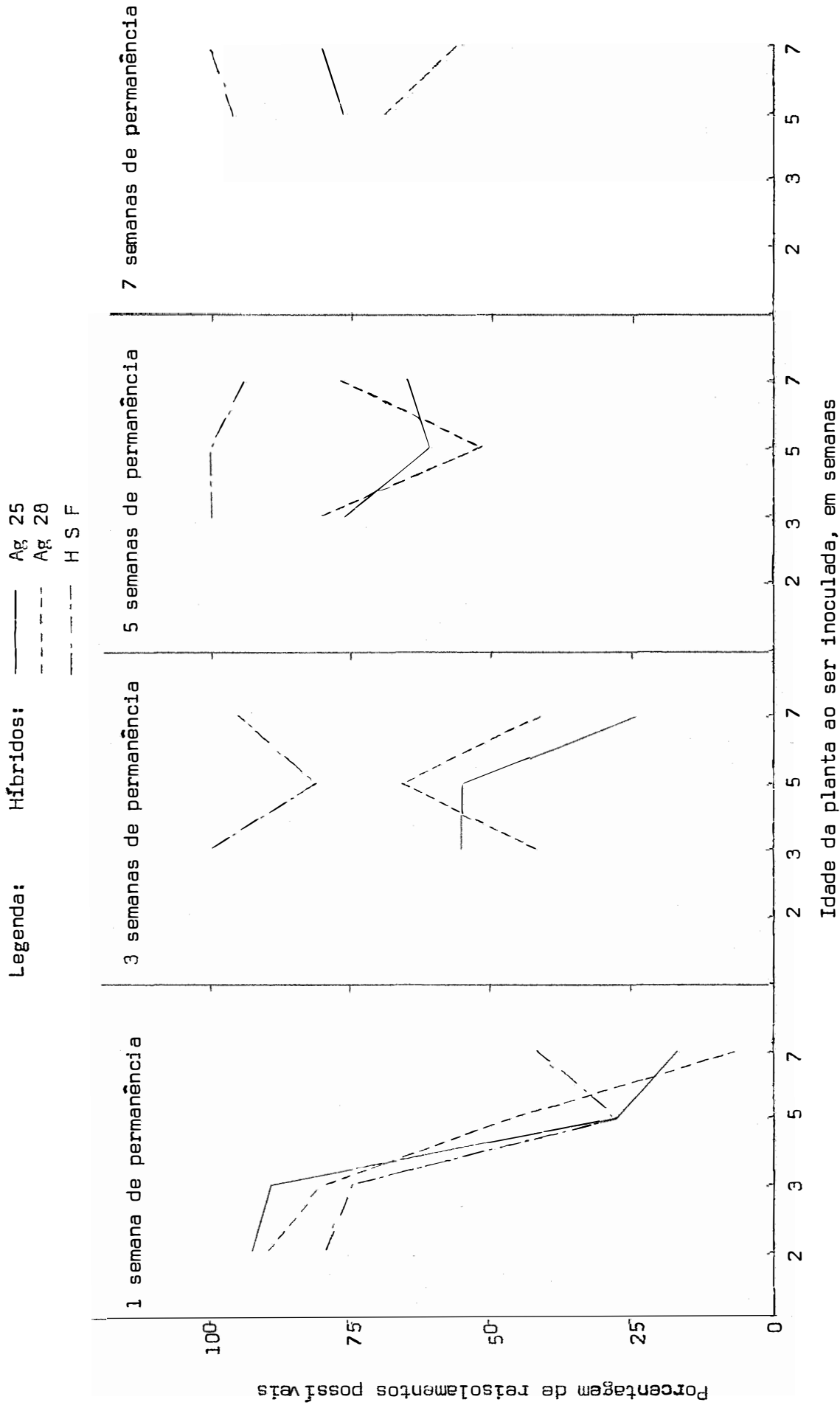


FIGURA 4 - Efeito da constituição citoplasmática e idade das plantas ao serem inoculadas sobre a porcentagem de reisolamento de *H. maydis*, para diferentes períodos de permanência no hospedeiro.

5.2 - ESTUDO COMPARATIVO PARA A PATOGENICIDADE DE QUATRO ISOLADOS DE *H. maydis* EM TRÊS DIFERENTES CITOPLASMAS. Ensaio 2

Os resultados obtidos para o tamanho médio das lesões nos diferentes tratamentos são apresentados na Tabela 4 e Figura 5 , enquanto que a análise da variância é apresentada na Tabela I do Apêndice.

TABELA 4 - Tamanho médio, em milímetros, das lesões causadas por quatro diferentes isolados de *H. maydis* em três híbridos com diferentes citoplasmas

Isolados	Híbridos		
	Ag 25	Ag 28	H S F
2 T	1,00 ^{a/}	0,96	1,67
9 T	1,04	0,87	1,41
11 T	1,04	0,99	1,87
14 T	0,96	0,95	1,85

a/ Média obtida para seis leituras em cada uma das três repetições.

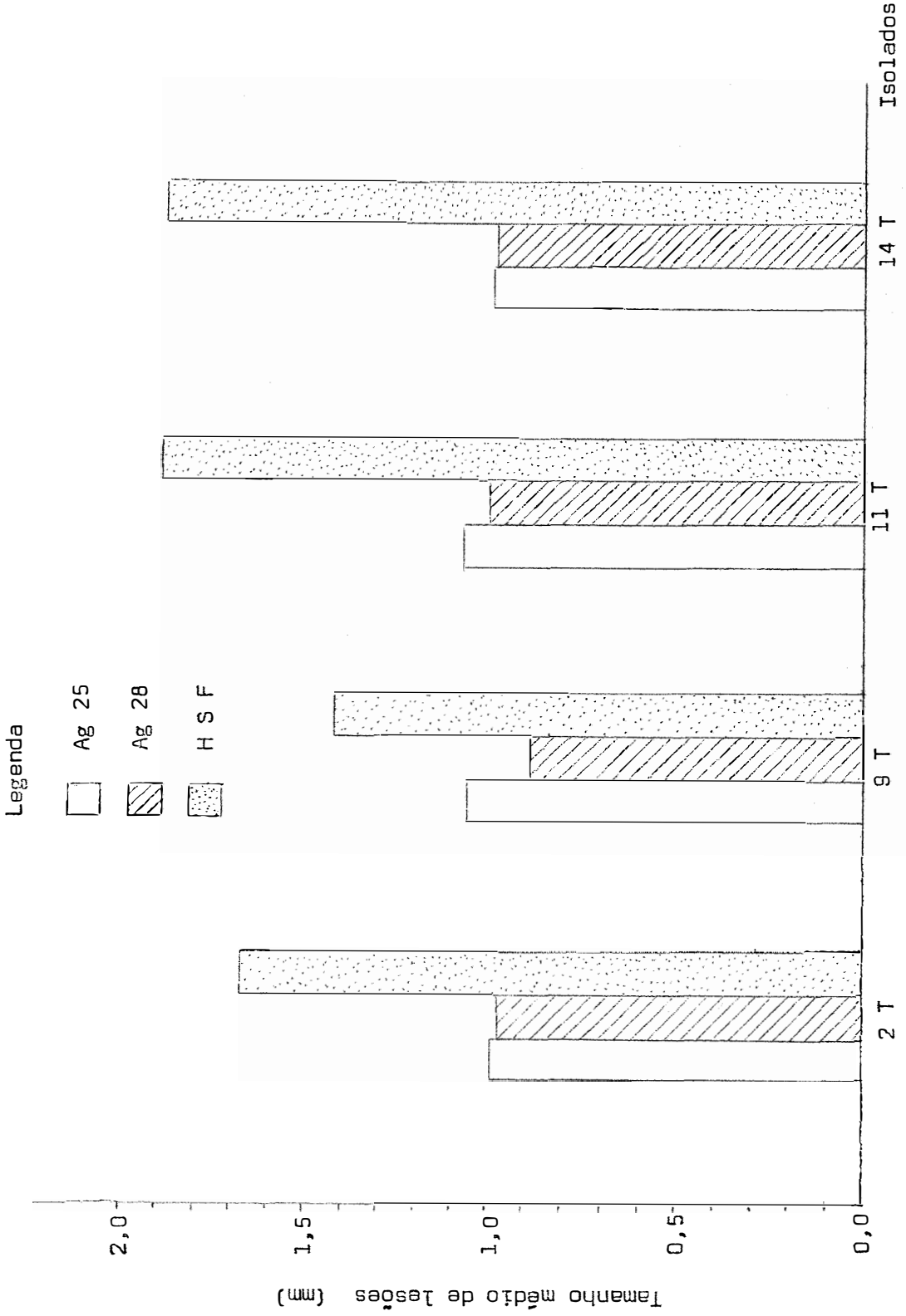


FIGURA 5 - Tamanho médio de lesões causadas por quatro diferentes isolados de *H. maydis*, raça T em três híbridos possuidores de diferentes citoplasmas para esterilidade masculina

A análise da variância revelou diferenças altamente significativas entre isolados, híbridos e interação isolados x híbridos.

As médias para os tamanhos de lesões causadas pelos isolados 11 T , 14 T , 2 T e 9 T nos diferentes híbridos foram, respectivamente, 1,30 , 1,25 , 1,21 e 1,10 . O teste de Tukey revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, sendo $\Delta = 0,13$, entre o tamanho das lesões causadas pelo isolado 9 T e aquele causado pelos isolados 14 T e 11 T , não tendo sido observadas diferenças significativas entre os dois últimos.

Para o estudo das diferenças entre híbridos com diferentes citoplasmas, foi feito o desdobramento dos graus de liberdade para a interação e híbridos, sendo a análise da variância para este desdobramento apresentada na Tabela II do Apêndice.

Considerando-se os contrastes para híbridos dentro de cada isolado, a análise da variância revelou diferenças altamente significativas para o contraste entre os híbridos resistentes e o híbrido suscetível para todos os isolados estudados. Embora o tamanho das lesões causadas pelo patógeno no híbrido Ag 25 fosse sempre maior em relação à aquelas causadas no híbrido Ag 28 , somente para o isolado 9 T é que foi detectada uma diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade , entre o tamanho de lesões causadas nos dois híbridos resistentes.

5.3 - ESTUDO COMPARATIVO PARA A PATOGENICIDADE ENTRE UM ISOLADO DE *H. maydis* , RAÇA T , E UM ISOLADO MONOSPÓRICO, OBTIDO A PARTIR DO PRIMEIRO, SOBRE DIFERENTES CITOPLASMAS.
Ensaio 3.

O tamanho médio das lesões causadas pelos dois isolados nos diferentes híbridos é apresentada na Tabela 5 e Figura 6 , enquanto a análise da variância é apresentada na Tabela III do Apêndice.

TABELA 5 - Tamanho médio, em milímetros, das lesões causadas por dois isolados de *H. maydis* em híbridos com diferentes citoplasmas

Isolados	Híbridos		
	Ag 25	Ag 28	H S F
2 T	1,19 ^{a/}	0,97	1,84
2 MT	1,19	1,06	1,86

a/ Média obtida para seis leituras em cada uma das três repetições.

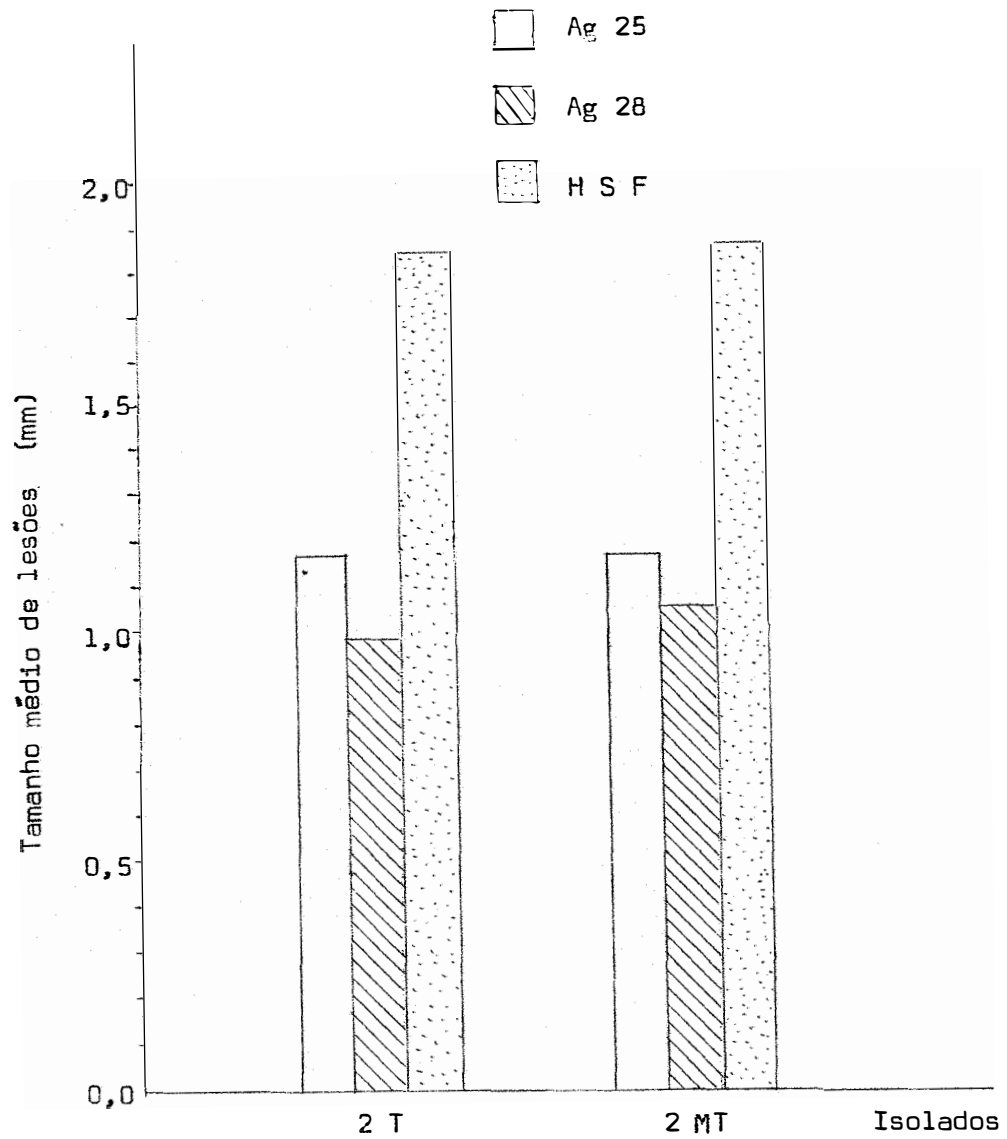


FIGURA 6 - Tamanho médio de lesões causadas por um isolado de *H. maydis*, raça T, e um isolado monospórico obtido deste em três híbridos possuidores de diferentes citoplasmas para macho esterilidade.

A análise da variância não revelou diferença significativa entre os isolados, mas apresentou uma diferença altamente significativa para o tamanho de lesões produzidas nos três híbridos. A análise da variância feita para o desdobramento dos graus de liberdade para híbridos e para interação é apresentada na Tabela IV do Apêndice. Para os dois isolados estudados, foram reveladas diferenças altamente significativas para o contraste entre os híbridos resistentes e o híbrido suscetível, sendo que para o isolado 2 T foi observada uma diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, para o contraste entre os dois híbridos considerados como resistentes.

5.4 - EFEITO DA PASSAGEM DE ISOLADOS DE *H. maydis*, RAÇA T, PELOS CITOPLASMAS C, N e T SOBRE A PATOGENICIDADE AOS DIFERENTES CITOPLASMAS. Ensaio 4.

Os resultados para a patogenicidade dos diferentes reisolados de *H. maydis*, obtidos após a passagem separada e simultânea de quatro isolados por diferentes citoplasmas, aos citoplasmas C, N e T são apresentados na Tabela 6 e na Figura 7.

TABELA 6 - Tamanho médio de lesões, em milímetros, causadas por diferentes isolados de *H. maydis*, após a passagem por diferentes citoplasmas, sobre híbridos com citoplasmas C, N e T.

Isolados	Híbridos		
	Ag 25	Ag 28	H S F
2 TT a/	1,25 d/	0,91	2,13
2 TN b/	1,25	0,99	2,17
2 TC c/	1,11	1,02	2,16
9 TT	1,58	1,07	3,00
9 TN	1,68	1,64	3,17
9 TC	1,49	1,41	3,10
11 TT	1,30	1,19	3,46
11 TN	1,42	1,30	3,51
11 TC	1,47	1,37	3,62
14 TT	1,12	0,94	2,69
14 TN	1,16	0,99	2,05
14 TC	1,19	0,95	2,48

- a/ Isolado de *H. maydis* raça T com uma passagem em citoplasma T
 b/ Isolado de *H. maydis* raça T com uma passagem em citoplasma N
 c/ Isolado de *H. maydis* raça T com uma passagem em citoplasma C
 d/ Tamanho médio de lesões baseado em seis observações feitas em cada uma das três repetições.

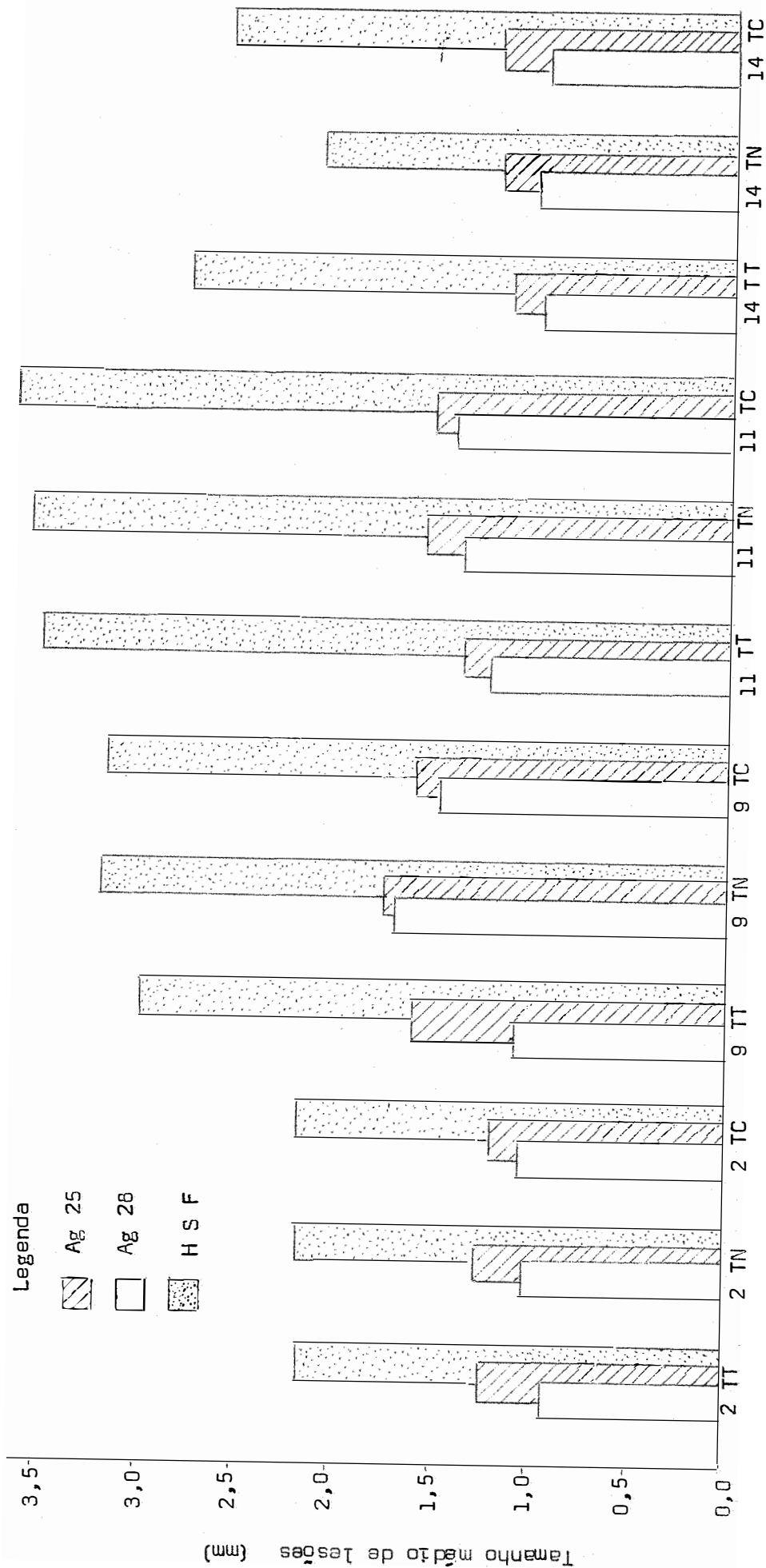


FIGURA 7 - Tamanho médio de lesões causadas por quatro diferentes isolados de *H. maydis* com passagem por diferentes citoplasmas sobre três híbridos possuidores de diferentes citoplasmas

A análise de variância, apresentada na Tabela V do Apêndice, revelou diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, para isolados, híbridos e a interação isolados x híbridos.

Considerando a comparação entre os reisolados, com uma passagem pelos diferentes citoplasmas, dentro de cada híbrido, o teste de Tukey, apresentado na Tabela VI do Apêndice, revelou uma diferença significativa para a patogenicidade ao citoplasma C entre o reisolado 9 TT, oriundo da passagem por citoplasma T e aqueles do isolado 9 T quando obtidos por passagens pelos citoplasmas N e C. Diferenças na patogenicidade ao citoplasma T também foram observadas entre o reisolado 14 TN e os reisolados 14 TT e 14 TC.

A análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade para interação e híbridos é apresentada na Tabela VII do Apêndice. Para todos isolados estudados, foi detectada uma diferença altamente significativa para o contraste entre o tamanho de lesões produzidas no híbrido possuidor de citoplasma T e aquele produzido nos híbridos possuidores de citoplasmas N e C quando considerados em conjunto. Diferenças significativas, ao nível de 1% de probabilidade, no tamanho de lesões para o contraste entre os híbridos possuidores de citoplasmas N e C foram reveladas para os reisolados 2 TT, 2 TN, 9 TT, 9 TC, 14 TT, 14 TN e 14 TC, enquanto que, ao nível de 5% de probabilidade, foram mostradas diferenças para os reisolados 11 TT e 11 TN.

5.5 - EFEITO DA INTERAÇÃO GENÉTICA-CITOPLASMÁTICA NA MANIFESTAÇÃO DO SINTOMA CAUSADO PELA RAÇA T DE *H. maydis* .

Ensaio 5 .

Nos ensaios anteriores, os valores obtidos para tamanho de lesões no híbrido Ag 28 foram sempre menores quando comparados com os do híbrido Ag 25 , embora nem sempre esta diferença foi estatisticamente significativa. Isto sugere maior resistência do citoplasma Charrua quando comparado com o citoplasma normal para a esterilidade masculina, dentro de um período de noventa horas, embora exista uma pequena diferença genética entre os híbridos, que também poderia influenciar no resultado. Neste ensaio, foram comparados os tamanhos de lesões que se desenvolveram nos híbridos Ag 25 e Ag 28 com aqueles observados em dois híbridos simples isogênicos, possuidores de citoplasmas N e C , quando inoculados com um isolado de *H. maydis* , raça T . As médias para os tamanhos de lesões produzidas nos diferentes híbridos são apresentadas na Tabela 7 .

A análise da variância, apresentada na Tabela VIII do Apêndice, revelou diferenças altamente significativas para os tamanhos de lesões observados nos diferentes híbridos.

O teste de Tukey, com $\Delta = 0,21$, revelou ao nível de 1% de probabilidade, diferenças significativas entre CME e os híbridos Ag 25 e Ag 28 , tendo o híbrido TGe ocupado uma posição intermediária , não diferindo de nenhum dos demais híbridos. Os híbridos Ag 25 e Ag 28 , e os híbridos TGe e CME não diferiram estatisticamente entre si,

mesmo a 5% de probabilidade, com $\Delta = 0,15$, mas os tamanhos de lesões para os dois híbridos possuidores de citoplasma C , foram menores em relação aos híbridos correspondentes possuidores de citoplasma N .

TABELA 7 - Tamanho médio de lesões, em milímetros, causadas por *H. maydis* , raça T , em híbridos isogênicos e não isogênicos em citoplasmas N e C .

Citoplasma Normal		Citoplasma Charrua	
Ag 25	TGe	Ag 28	CME
1,40 ^{a/}	1,29	1,34	1,18

a/ Média obtida para dez leituras em cada uma das três repetições.

6 - DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que houve influência do tempo de permanência do patógeno na planta, da idade da planta ao ser inoculada e dos híbridos possuidores de diferentes citoplasmas para esterilidade masculina sobre a recuperação do fungo dos tecidos lesionados.

Para os três híbridos, tecidos novos de plantas mais novas apresentaram uma maior porcentagem de reisolamento do fungo quando comparada com aquela obtida para tecidos novos em plantas mais velhas num período de uma semana de permanência do patógeno no hospedeiro. Considerando que a inoculação foi feita no cartucho, sendo portanto os tecidos igualmente jovens para plantas com diferentes idades, os resultados sugerem que com uma semana de permanência do fungo na planta, os tecidos jo-

vens nos três híbridos testados comportaram-se diferentemente dos tecidos jovens de plantas mais velhas. Este fato merece estudos futuros, pois reflete a importância de se separar os efeitos da idade dos tecidos e mecanismos de resistência operando simultaneamente numa planta.

Considerando, para um mesmo híbrido, as diferentes idades das plantas ao serem inoculadas e os períodos de permanência do patógeno nas plantas, os dados revelaram que existe uma diminuição drástica no número de isolados obtidos a partir de tecidos novos de plantas resistentes, com três semanas de idade por ocasião da inoculação, para o período de permanência de três semanas. Este fato sugere, que para plantas inoculadas com três semanas de idade, os efeitos de um mecanismo de resistência induzido pelo patógeno possam ser detectados num período entre uma a três semanas após a inoculação. BALMER (1976) observou tendências diferentes para concentração de fenóis totais em tecidos de plantas jovens, resistentes e suscetíveis, quando tecidos inoculados com a raça T foram coletados num período compreendido entre a retirada das plantas da câmara úmida e as setenta e duas horas seguintes.

O aumento na porcentagem de reisolamento obtidos de plantas resistentes mais velhas sugere que após o confinamento do patógeno, o efeito fungistático resultante do mecanismo de resistência é diluído a medida que as folhas envelhecem até cinco ou sete semanas após a inoculação. Assim, é interessante especular sobre a provável ocorrência de fitoalexinas envolvidas num mecanismo de resistência ao patógeno condicionado pelo citoplasma.

Para o híbrido HSF, foi observado uma tendência para aumento nas porcentagens de recuperação do patógeno para todas as idades

de plantas por ocasião da inoculação, sendo que a partir da terceira semana de permanência estas porcentagens tornam-se praticamente iguais. Isto sugere que qualquer efeito adverso que tecidos novos possam ter sobre o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro suscetível desaparece entre o período de uma a três semanas de permanência do patógeno no hospedeiro. Assim, para evitar possíveis confusões sobre o efeito da idade do tecido e mecanismos de resistência, os dados sugerem que para a pesquisa da natureza da resistência dados interessantes podem ser obtidos entre uma e três semanas após a inoculação do patógeno.

Considerando a frequência de reisolamento do patógeno, para diferentes períodos de permanência, a partir de hospedeiros com diferentes citoplasmas e inoculados em diferentes idades, foi observado que diferenças entre os híbridos resistentes e o suscetível, em plantas jovens inoculadas com três semanas, só pode ser notada a partir da terceira semana de permanência do patógeno no hospedeiro. De modo geral, existe um efeito específico devido aos citoplasmas que influi na capacidade de reisolamento do patógeno, havendo uma redução na capacidade de reisolamentos em plantas resistentes quando comparada com plantas suscetíveis.

O estudo do efeito do período de permanência do patógeno em plantas inoculadas em idades diferentes revelou, de modo geral, que o reisolamento do patógeno após um período de uma semana é muito mais difícil em plantas mais velhas quer sejam elas resistentes ou suscetíveis. Isto sugere que para plantas suscetíveis os tecidos novos de plantas mais velhas são menos suscetíveis que os tecidos jovens de plantas mais novas, para um período de permanência de uma semana.

Os dados ainda revelam que para plantas com diferentes idades por ocasião da inoculação, diferenças entre os híbridos resistentes e o suscetível só podem ser notadas a partir da terceira semana de permanência do patógeno no hospedeiro. Isto sugere que os efeitos de um mecanismo de resistência possam ser detectados num período entre uma a três semanas após a inoculação.

Os efeitos observados para sobrevivência da raça T em citoplasma normal relatados por BLANCO e NELSON (1972) parecem ser em parte devidos ao fato da capacidade de sobrevivência do patógeno nos tecidos de hospedeiros resistentes, que se reflete na capacidade de reisolamento do patógeno.

Estudando a patogenicidade de diferentes isolados em três diferentes citoplasmas, foram realizadas comparações entre quatro isolados da raça T de *H. maydis* oriundos de diferentes municípios. Os dados mostraram que os isolados de uma mesma raça diferiram entre sí quanto a patogenicidade. Estas diferenças de patogenicidade foram mostradas noventa horas após a inoculação, o que não elimina a possibilidade dos diferentes isolados apresentarem a mesma patogenicidade em avaliações realizadas em estágio mais adiantado da doença.

Com relação a constituição dos isolados, existe a possibilidade da ocorrência de uma mistura de linhagens do patógeno em cada isolado, de modo a levar todos os isolados a um mesmo resultado final. Os dados obtidos no presente trabalho revelaram que um isolado monospórico comportou-se semelhantemente ao isolado do qual teve origem.

Numa população de um determinado microrganismo é comum ocorrer variabilidade genética, e segundo VAN DER PLANK (1968) podem ocorrer raças virulentas ou raças agressivas. Raças virulentas são aquelas que apresentam uma interação diferencial com as variedades do hospedeiro, enquanto que as raças agressivas não apresentam a referida interação. Numa população de um patógeno, as diferentes raças não se apresentam com a mesma frequência, variando com a composição genética do hospedeiro. Se o hospedeiro é substituído por outro de carga genética diferente, após vários ciclos de cultivo, a população do patógeno pode sofrer uma seleção direcional e nova raça poderá ser a predominante. Provavelmente esta seleção direcional ocorreu em *H. maydis* nos anos que antecederam o ano de 1970 pois a raça T já existia, segundo NELSON *et alii* (1970), antes da epidemia, uma vez que o uso da esterilidade citoplasmática Texas tinha sido intensificado na produção de milho híbrido. A seleção direcional poderá ocorrer novamente para outra fonte citoplasmática de esterilidade, motivando estudos que visam o aspecto básico de doenças no campo da Fitopatologia.

O efeito de uma possível ocorrência da seleção direcional na raça T de *H. maydis* durante o período de quinze dias em diferentes hospedeiros foi estudada para quatro isolados. Os resultados mostraram diferenças altamente significativas entre isolados, porém para comparações, em um mesmo híbrido, entre os isolados passados por diferentes citoplasmas, não foi possível demonstrar a ocorrência de uma seleção para maior patogenicidade ao hospedeiro do qual foi reisolado. Isto não exclui a possibilidade da ocorrência de uma seleção direcional em condi-

ções naturais quando forem realizadas várias passagens seriadas por um único citoplasma e por tempo prolongado, mas indica que a quebra da resistência não é tão fácil de ocorrer.

HOOKER *et alii* (1970,a) ; BERGQUIST e PEVERLY (1972) e SMITH *et alii* (1971) relataram os citoplasmas N e C para a macho esterilidade como sendo resistentes ao fungo, porém não revelaram diferentes níveis de resistência entre os dois citoplasmas. As avaliações, baseadas no tamanho longitudinal de lesões foliares, realizadas noventa horas após inoculação, mostraram que o híbrido possuidor do citoplasma C apresentou maior grau de resistência ao patógeno quando comparado com o híbrido possuidor do citoplasma N, conforme comparações estatísticas realizadas nos diferentes ensaios.

SMITH *et alii* (1971) mostraram que os dois citoplasmas se comportaram uniformemente em todas as cargas genéticas, enquanto LIM (1974) ; MARTINSON e HALLAWER (1975) e LIM *et alii* (1974) relataram a influência da carga gênica no grau de resistência dos diferentes citoplasmas. Os híbridos Ag 25 e Ag 28, possuidores, respectivamente, de citoplasmas N e C são bastante próximos geneticamente, existindo no entanto uma pequena variação entre ambos. Por esta razão foram comparados os dois híbridos usados com os híbridos simples isogênicos que diferem entre si somente na constituição citoplasmática. A superioridade do citoplasma C não foi confirmada estatisticamente, embora o tamanho de lesões tenha sido menor para as condições em que foi realizado o teste.

7 - CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir o que segue.

- 1 - Tecidos novos de plantas mais novas apresentaram uma maior porcentagem de reisolamento do fungo quando comparada com aquela obtida para tecidos novos em plantas mais velhas num período de uma semana de permanência do patógeno no hospedeiro. A partir da terceira semana de permanência, as diferenças nas porcentagens de reisolamento para as plantas de diferentes idades diminuem considerando-se, separadamente os híbridos resistentes e o híbrido suscetível.
- 2 - Para plantas de diferentes idades a partir da terceira semana de permanência do patógeno no hospedeiro, a capacidade de reisolamen-

to, de modo geral, foi inferior nos híbridos resistentes quando comparados com o suscetível.

- 3 - Ocorreu diferenças quanto a patogenicidade dos diferentes isolados de *H. maydis* aos diferentes citoplasmas C , N e T , considerando-se o tamanho de lesões foliares medidas noventa horas após inoculação do patógeno.
- 4 - Passagem do patógeno sobre diferentes citoplasmas durante o período de quinze dias não revelou a ocorrência de uma seleção para maior patogenicidade ao hospedeiro do qual foi reisolado.
- 5 - Os tamanhos das lesões nos citoplasmas N e C não diferiram estatisticamente em todas as comparações feitas nos diferentes ensaios, mas o segundo sempre apresentou menor tamanho de lesões, mostrando uma tendência para maior resistência ao patógeno.

8 - SUMMARY.

The present work was projected to: know the behavior of different inducing male sterility cytoplasm in corn when *Helminthosporium maydis*, race T, was inoculated; study the effect of duration of the period of permanence of the fungus on plants of different ages and of different types of cytoplasm on its survival; observe the pathogenicity of different isolates of T race of the fungus; and observe if there was any directional selection for greater pathogenicity in the plants with resistant cytoplasm.

The work showed that new tissues of younger plants presented greater percentage of re-isolation of the fungus when compared with the percentage of re-isolation in new tissues of older plants, if

there was a permanence of a week of the pathogen in the host. After the permanence of three weeks, the differences in percentages of reisolations for the different hybrids decreased. After three weeks an ability of reisolation was inferior in the resistant hybrids.

There were differences of pathogenicity of the different isolates used, but there was no selection for greater pathogenicity to the host from which the reisolation was made.

The isolates showed greater pathogenicity to the hybrid with T cytoplasm for male sterility. The C cytoplasm showed greater resistance, based in lesion size, than the N cytoplasm, being both resistant to the pathogen.

9 - LITERATURA CITADA

- AALA, F. T., 1964. The corn leaf blight disease: a problem in the production of hybrid corn seed involving cytoplasmic male sterility. Philippine Journal of Plant Industry. Manila, 29: 115-122.
- BALMER, E., 1976. Relações fisiológicas entre *Helminthosporium maydis* Nisikado & Miyake, Raça T, e plantas hospedeiras com diferentes citoplasmas. Piracicaba, ESALQ/USP. 96 p. (Tese para Concurso de Livre-Docência).
- BECKETT, J. B., 1971. Classification of male-sterile cytoplasm in maize (*Zea mays* L.). Crop Science. Madison, 11: 724-727.
- BERGQUIST, R. R. e G. PERVERLY, 1972. Reaction of corn inbreds and hybrids with different cytoplasm and genotypes to *Helminthosporium maydis*, Race T. Plant Disease Reporter. Beltsville, 56: 112-114.

- BLANCO, M. H. e R. R. NELSON, 1972. Relative survival of populations of race O and race T of *Helminthosporium maydis* on a corn hybrid in normal cytoplasm. Plant. Disease Reporter. Beltsville, 56: 889-891.
- CRAIG, J. e L. A. DANIEL-KALIO, 1968. Chlorotic lesion resistance to *Helminthosporium maydis* in maize. Plant Disease Reporter. Beltsville, 52: 134-136.
- GOOD, R. L. e E. S. HORNER, 1974. Effect of normal cytoplasm on resistance to Southern Leaf Blight on other traits of maize. Crop Science. Madison, 14: 368-370.
- GOOD, R. L. e N. C. SCHENCK, 1973. Incidence of race O and T of *Helminthosporium maydis* on maize with normal and Texas male sterile cytoplasm at Gainesville, Florida 1971-1972. Plant Disease Reporter. Beltsville, 57: 981-983.
- HALLAUER, A. R. e C. A. MARTINSON, 1975. Reaction of maize hybrids and inbreds to southern corn blight. Agronomy Journal. Madison, 67: 497-501.
- HILTY, J. M. e J. M. JOSEPHSON, 1971. Reaction of corn inbreds with different cytoplasm to *Helminthosporium maydis*. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 195-198.
- HOOKE, A. L. ; D. R. SMITH ; S. M. LIM e J. B. BECKETT, 1970. Reaction of corn seedlings with male-sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis*. Plant Disease Reporter. Beltsville, 54: 708-712.
- HOOKE, A. L. ; D. R. SMITH ; S. M. LIM e M. D. MUSSON, 1970. Physiological races of *Helminthosporium maydis* and disease resistance. Plant Disease Reporter. Beltsville, 54: 1109-1110.

- KELMAN, A., 1967. Sourcebook of laboratory exercises in plant pathology. San Francisco, Freeman. 387 p.
- LAUGHNAN, J. R. e S. J. GABAY, 1973. Reaction of germinating maize pollen to *Helminthosporium maydis* pathotoxins. Crop Science. Madison, 13: 681-684.
- LIM, S. M., 1974. Reaction in corn inbreds and hybrids to *Helminthosporium maydis* race T. Plant Disease Reporter. Beltsville 58: 811-813.
- LIM, S. M. ; A. L. HOOKER ; J. G. KINSEY e D. R. SMITH, 1974. Comparative grain yields of corn hybrid in normal and in Texas male-sterile cytoplasm (cms-T) infected with *Helminthosporium maydis*, race T and disease components of cms-T corn hybrids. Crop Science. Madison, 14: 190-195.
- MALCA, J. e A. J. ULLSTRUP, 1962. Effects of carbon and nitrogen on growth and sporulation of two species of *Helminthosporium*. Bull. Torrey Botan. Club. Lancaster, 89: 240-249.
- MASON, L. e M. S. ZUBER, 1972. 1971 results of interregional and regional corn leaf blight ratings. Plant Disease Reporter. Beltsville, 56: 485-489.
- NELSON, R. R., 1971. Studies and observations on the overwintering and survival of isolates of *Helminthosporium maydis* on corn. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 99-103.
- NELSON, R. R. ; J. E. AYRES ; H. COLE e D. H. PETERSEN, 1970. Studies and observations on the past occurrence and geographical distribution of isolates of race T of *Helminthosporium maydis*. Plant Disease Reporter, Beltsville, 54: 1123-1126.

- SCHEIFELE, G. L., 1971. Geographical distribution of *Helminthosporium maydis* race T for 1969 and 1970. Plant Disease Reporter. Beltsville, 55: 302-306.
- SMITH, D. R. e A. L. HOOKER, 1973. Monogenic chlorotic-lesion resistance in corn to *Helminthosporium maydis* . Crop Science. Madison, 13: 330-331.
- SMITH, D. R. ; A. L. HOOKER ; S. M. LIM e J. B. BECKETT, 1971. Disease reaction of thirty sources of cytoplasmic male-sterile corn to *Helminthosporium maydis* race T . Crop Science. Madison, 11: 772-773.
- VAN DER PLANK, J. E., 1968. Disease Resistance in Plants. New York and London, Academic Press. 206 p.

10 - APENDICE

TABELA I - Análise da variância para a patogenicidade de quatro isolados de *H. maydis* em três citoplasmas diferentes.

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Repetições	2	0,008		
Tratamentos	11			
Isolados	3	0,193	0,0643	9,59 **
Híbridos	2	4,194	2,0970	312,28 **
Isolados x Híbridos	6	0,255	0,0425	6,34 **
Resíduo	22	0,149	0,0067	
Total	35	4,799		

(**) Significância ao nível de 1% de probabilidade

C. V. = 6,71%

TABELA II - Análise de variância para o desdobramento dos Graus de Liberdade para Interação e Híbridos, da Tabela I

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Híbridos dentro de 2 T	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	0,9610	0,9610	143,43 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,0028	0,0028	0,41 ns
Híbridos dentro de 9 T	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	0,4110	0,4110	61,34 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,0417	0,0417	6,22 *
Híbridos dentro de 11 T	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	1,4500	1,4500	216,42 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,0037	0,0037	0,55 ns
Híbridos dentro de 14 T	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	1,5780	1,5780	235,52 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,0006	0,0006	0,09 ns
Resíduo	22	0,1490	0,0067	

(*) Significância ao nível de 5% de probabilidade

(**) Significância ao nível de 1% de probabilidade

ns Não significante

TABELA III - Análise da variância para patogenicidade de um isolado de *H. maydis* e um isolado monospórico obtido deste em três citoplasmas diferentes

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Repetições	2	0,020		
Tratamentos	5			
Isolados	1	0,005	0,0050	0,55 ns
Híbridos	2	2,313	1,1565	127,09 **
Isolados x Híbridos	2	0,011	0,0055	0,60 ns
Resíduo	10	0,091	0,0091	
Total	17	2,440		

(**) Significância ao nível de 1% de probabilidade

ns Não significante

C. V. = 7,04%

TABELA IV - Análise de variância para o desdobramento dos Graus de Liberdade para Interação e Híbridos, da Tabela III

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Híbridos dentro de 2 T	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	1,155	1,155	126,92 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,074	0,074	8,13 *
Híbridos dentro de 2 MT	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	1,070	1,070	117,58 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,023	0,023	2,52 ns
Resíduo	10	0,091	0,009	

(*) Significância ao nível de 5% de probabilidade

(**) Significância ao nível de 1% de probabilidade

ns Não significante

TABELA V - Análise da variância para a patogenicidade de reisolados de *H. maydis*, oriundos de citoplasma N, T e C, em três citoplasmas diferentes

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Repetições	2	0,1023		
Tratamentos	35			
Isolados	11	9,4408	0,85825	99,10 **
Híbridos	2	58,5307	29,26536	3.379,37 **
Isolados x Híbridos	22	4,9536	0,22516	26,00 **
Resíduo	70	0,6062	0,00866	
Total	107	73,6337		

(**) Significância ao nível de 1% de probabilidade

C. V. = 5,28%

TABELA VI - Teste de Tukey para comparação entre isolados passados pelos diferentes citoplasmas, dentro de cada híbrido separadamente, sendo que para os níveis de 5% e 1% de probabilidade os valores de Δ são, respectivamente, 0,25 e 0,29 .

Isolados Originais	Híbridos	Reisolados	Tamanho das Lesões	Teste de Tukey
2 T	Ag 25	2 TT	1,25 ^{a/}	a
		2 TN	1,25	a
		2 TC	1,11	a
	Ag 28	2 TC	1,02	a
		2 TN	0,99	a
		2 TT	0,91	a
	H S F	2 TN	2,17	a
		2 TC	2,16	a
		2 TT	2,13	a
9 T	Ag 25	9 TN	1,68	a
		9 TT	1,59	a
		9 TC	1,49	a
	Ag 28	9 TN	1,64	a
		9 TC	1,40	a
		9 TT	1,07	b
	H S F	9 TN	3,17	a
		9 TC	3,10	a
		9 TT	3,00	a

Continua ...

TABELA VI - Continuação

Isolados Originais	Híbridos	Reisolados	Tamanho das Lesões	Teste de Tukey
11 T	Ag 25	11 TC	1,47	a
		11 TN	1,42	a
		11 TT	1,30	a
	Ag 28	11 TC	1,37	a
		11 TN	1,30	a
		11 TT	1,17	a
	H S F	11 TC	3,62	a
		11 TN	3,51	a
		11 TT	3,46	a

14 T	Ag 25	14 TC	1,19	a
		14 TN	1,16	a
		14 TT	1,12	a
	Ag 28	14 TN	0,99	a
		14 TC	0,95	a
		14 TT	0,94	a
	H S F	14 TT	2,69	a
		14 TC	2,48	a
		14 TN	2,05	b

a/ Tamanho médio das lesões, em milímetros, obtidos de seis medidas em cada uma das três repetições.

TABELA VII - Análise de Variância para o desdobramento dos Graus de Liberdade para Interação e Híbridos, da Tabela V

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F	
Híbridos dentro de 2 TT	2				
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	2,19808	2,19808	253,81	**
Ag 25 x Ag 28	1	0,17686	0,17686	20,42	**
Híbridos dentro de 2 TN	2				
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	2,20499	2,20499	254,61	**
Ag 25 x Ag 28	1	0,10667	0,10667	12,31	**
Híbridos dentro de 2 TC	2				
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	2,39083	2,39083	276,07	**
Ag 25 x Ag 28	1	0,01306	0,01306	1,50	ns
Híbridos dentro de 9 TT	2				
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	5,55556	5,55556	641,51	**
Ag 25 x Ag 28	1	0,39533	0,39533	45,65	**
Híbridos dentro de 9 TN	2				
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	4,54016	4,54016	524,26	**
Ag 25 x Ag 28	1	0,00173	0,00173	0,19	ns
Híbridos dentro de 9 TC	2				
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	5,50014	5,50014	635,12	**
Ag 25 x Ag 28	1	0,01043	0,01043	1,20	ns
Híbridos dentro de 11 TT	2				
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	9,87163	9,87163	1.139,91	**
Ag 25 x Ag 28	1	0,01820	0,01820	2,10	*

Continua ...

TABELA VII - Continuação

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Híbridos dentro de 11 TN	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	9,24500	9,24500	1.067,55 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,02160	0,02160	2,49 *
Híbridos dentro de 11 TC	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	9,65076	9,65076	1.114,40 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,01313	0,01313	1,51 ns
Híbridos dentro de 14 TT	2			
(Ag 25 x Ag 28) x HSF	1	5,50020	5,50020	635,12 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,05043	0,05043	5,82 **
Híbridos dentro de 14 TN	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	1,91428	1,91428	221,04 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,04340	0,04340	5,01 **
Híbridos dentro de 14 TC	2			
(Ag 25 + Ag 28) x HSF	1	3,97620	3,97620	459,14 **
Ag 25 x Ag 28	1	0,08640	0,08640	9,97 **
Resíduo	70	0,60620	0,00866	

(*) Significância ao nível de 5% de probabilidade
 (**) Significância ao nível de 1% de probabilidade
 ns Não significante.

TABELA VIII - Análise de variância para patogenicidade de um isolado de *H. maydis* sobre híbridos isogênicos e não isogênicos em citoplasma N e C

Causa da Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamentos	3	0,0832	0,0277	7,28 *
Resíduo	8	0,0306	0,0038	
Total	11	0,1138		

(*) Significância ao nível de 5% de probabilidade

C. V. = 4,68%