

DESENVOLVIMENTO DOS SINTOMAS INTERNOS
EM COLMOS DE MILHO (*Zea mays* L.) INOCULADOS
COM *Diplodia maydis* (BERK) SACC.

GERSON PEREIRA RIOS
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Orientador : Prof. Dr. Clélio Lima Salgado

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
Junho, 1977

À

memória de minha mãe,
ao meu pai e meus irmãos
que muito contribuíram
para minha formação,

MEU RECONHECIMENTO

À

minha esposa Marta
e aos meus filhos
Ester
Miguel Augusto
Evandro,

D E D I C O .

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

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao Prof. CLÉLIO LIMA SALGADO, pela valiosa orientação e estímulo durante a realização deste trabalho.

À EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIA (EMBRAPA); e ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelos recursos e oportunidades concedidas, tornando possível a minha participação no Curso de Pós-Graduação.

Aos Professores ERIC BALMER e TASSO LÉO KRUGNER pelas sugestões, colaboração e revisão dos originais.

Ao colega HENRY EVEN BAJUNGU, pela versão do resumo para o Inglês.

Ao colega JUAN ANGEL ESPINAL AGUILLAR, pela prestimosa colaboração na execução dos trabalhos.

A SEMENTES AGROCERES S.A., através do colega OSWALDO ANTONIO PINTO PEREIRA, pelas sementes oferecidas.

Aos colegas de curso, aos funcionários da ESALQ e a todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. O Patógeno	7
3.2. Uso de Inoculação Artificial para Estudo de Podridões do Colmo Causadas por <u>Diplodia maydis</u>	8
3.2.1. Métodos de inoculação artificial	8
3.2.2. Local de inoculação	10
3.2.3. Época de inoculação	11
3.2.4. Época de avaliação dos resultados	12
3.2.5. Métodos de avaliação	12
3.3. Alguns Fatores que Influenciam o Desenvolvimento das Podridões Causadas por <u>Diplodia maydis</u>	15
3.3.1. Condições do tempo refletidas na umidade do solo e temperatura do ambiente	15
3.3.2. Fertilidade do solo	16
3.3.3. Precocidade das variedades	18
3.3.4. Produção	19
3.3.5. Danos em folhas e raízes	19
3.3.6. Resistência	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Origem dos Isolados e Meios de Cultura Utilizados	22
4.2. Reisolamentos e Preservação do Patógeno	23
4.3. Obtenção e Preparo do Inóculo	23
4.4. Inoculação	24
4.5. Avaliação dos Resultados	24
4.6. Instalação e Manutenção dos Experimentos	26
4.7. Condições do Tempo Durante a Realização dos Experimentos	27

	Página
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Sintomatologia Interna	28
5.2. Condições da Medula	41
6. CONCLUSÕES	50
7. SUMMARY	52
8. LITERATURA CITADA	54
9. APÊNDICE	61

1. RESUMO

O presente trabalho foi conduzido em condições de campo em duas épocas diferentes de plantio e teve como objetivos principais: verificar o desenvolvimento da sintomatologia interna causada por Diplodia maydis (Berk.) Sacc. em colmo de dois híbridos de milho (Zea mays, L.), respectivamente, suscetível e moderadamente resistente ao tombamento em campo devido a podridões; estudar os efeitos da inoculação do 1º e 4º internódios com Diplodia maydis (Berk.) Sacc. na percentagem de tecido morto no 2º e 3º internódios; estudar os efeitos do local de inoculação e da época de avaliação dos resultados no desenvolvimento da sintomatologia interna do colmo.

Os dois híbridos apresentaram resistência intermediária ao desenvolvimento dos sintomas internos, sendo que as reações dos mesmos foram influenciadas pela época de plantio.

A diferença de suscetibilidade entre o 1º e 4º internódios do colmo foi detectada a partir de duas semanas após inoculação, sendo que em todas as épocas, os sintomas foram mais severos no 4º internódio.

Para os diferentes tipos de inoculação, o período decorrido entre a inoculação e a leitura dos resultados teve um efeito linear sobre a manifestação dos sintomas internos.

A manifestação dos sintomas internos para os diferentes tipos de inoculação variou para os híbridos testados, sendo que a inoculação do 1º internódio com água provocou menor desenvolvimento da sintomatologia quando comparada com os demais.

A época de plantio tem influência nas condições da medula do 2º internódio para os híbridos testados.

O efeito da inoculação sobre as condições da medula em internódios próximos variou, sendo que as inoculações feitas no 1º internódio com D. maydis ou com água não diferiram entre si, tendo no entanto estas inoculações diferido dos efeitos provocados por inoculações feitas no 4º internódio.

2. INTRODUÇÃO

As podridões do colmo e das espigas, no milho, constituem doenças muito importantes, principalmente pelos prejuízos que causam. Perdas de 10 a 20% são consideradas comuns nos Estados Unidos podendo ser maiores em outros países (American Phyt. Soc. 1973). Embora não se tenha dados disponíveis quanto ao montante dos prejuízos que essas moléstias acarretam à cultura do milho no Brasil, sabe-se que eles são consideráveis.

As podridões do colmo são universalmente distribuídas podendo ocorrer, praticamente, em qualquer parte onde se cultiva o milho. Geralmente são causadas por um complexo de várias espécies de fungos e bactérias que infectam a planta assim que esta se aproxima da fase de maturação. A prevalência de um ou outro patógeno depende, entre outros fatores, das condições locais, do potencial de inóculo, e do estágio de desenvolvimento da planta.

Os fungos pertencentes aos gêneros Fusarium e Diplodia têm recebido maior atenção por parte dos pesquisadores, por serem, de um modo geral, os mais frequentes e que mais causam prejuízos, principalmente, na fase adulta da planta.

Diplodia maydis (Berk.) Sacc. constitui um dos patógenos mais comumente encontrados causando podridões do colmo e de outras partes da planta provocando doenças conhecidas como Podridões de Diplodia, Podridão Branca, ou Podridão Seca da Espiga. Também se encontra na semente, associado geralmente a outros patógenos dando origem a podridões da semente ao germinar, necroses ou podridões das raízes, murcha ou morte das plantinhas novas. Entre essas, talvez a doença mais generalizada no milho seja a Podridão do Colmo, sendo sua presença constatada e relatada nos Estados Unidos, oeste e sul da África, Austrália, Filipinas e Romênia (Paradela, 1972). No Brasil, foi mencionada sua presença nos Estados de São Paulo, Guanabara, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Galli et alii, 1968).

A infecção pode-se iniciar pelas raízes, nos pontos de intersecção destas com o colmo, ou no local onde a bainha da folha se une ao colmo. Pode ocorrer também através de ferimentos provocados por insetos, por nematóides ou por outros organismos que ferem raízes e colmos bem como injúrias originadas de tratos culturais.

A progressão da doença ocorre à medida que a planta envelhece já que o desenvolvimento do fungo é favorecido pela morte celular no colmo (Pappelis, 1963 e 1970). Os diversos fatores de ambiente, como distribuição de chuvas, temperatura, fertilidade do solo, que venham influir no vigor vegetativo da planta estão diretamente interferindo no aparecimento da podridão, antecedendo ou retardando o seu desenvolvimento, tornando a planta mais vulnerável ou menos vulnerável ao patógeno. Igualmente, ferimentos de qualquer natureza, nas raízes, folhas e caule, interferem na resistência da planta ao patógeno, por debilitar seus tecidos, tornando-os mais suscetíveis ao fungo.

Embora pouco se conheça sobre herança da resistência a podridões do colmo, sabe-se que há variedades de alta resistência, outras de baixa e outras ainda com resistência intermediária, não havendo imunidades (Smith et alii, 1938 e Andrew, 1954). Também já está suficientemente demonstrado que a resistência das linhagens contribuem para a resistência dos híbridos (Koehler, 1960). Os trabalhos desenvolvidos relacionam a natureza da resistência com teores de açúcares no colmo (Sayere et alii, 1931), presença de substâncias com propriedades antifúngicas (Whitney e Martimore, 1959 e 1960), conteúdo de nitrogênio no colmo (Zuber et alii, 1957), etc. No entanto, todos os trabalhos, visando estudar a natureza da resistência, sempre estão de acordo que a doença prevalece à medida que os tecidos da planta iniciam o período de senescência, independentemente da natureza da resistência ou do fator influente no processo.

Sendo a severidade das podridões do colmo influenciada por uma série de fatores externos, tornam-se necessários estudos sobre a metodologia normalmente utilizada para avaliação da severidade dos sintomas internos a fim de adaptá-la às condições do Brasil, visando a sua utilização nos trabalhos de seleção para obtenção de híbridos resistentes.

O presente trabalho tem como objetivos:

- verificar as reações de dois híbridos de milho moderadamente resistente e suscetível ao tombamento com relação ao desenvolvimento interno dos sintomas causados por Diplodia maydis, em condições de campo.

- estudar os efeitos do local de inoculação e da época de

avaliação dos resultados na extensão dos sintomas.

- estudar os efeitos do patógeno e da injúria, provocada pela inoculação, na morte do tecido nos internódios não inoculados da mesma planta.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O Patógeno

De acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, Diplodia maydis (Berk.) Sacc. e Diplodia zeae (Schw.) Lév. são sinônimos, devendo-se, por questão de prioridade, usar o primeiro nome (Shear, 1935). Seus esporos medem 24,0 - 33,0 μm x 5,0 - 6,0 μm com média de 23,8 x 5,3 μm (Roger, 1953).

Embora outras espécies de Diplodia como Diplodia macrospora Earle, Diplodia zeicola e Diplodia frumenti Ell & Ev. possam infectar o milho, Diplodia maydis (Berk.) Sacc. é a que mais tem sido estudada pelo fato de representar maiores problemas à cultura (Amer. Phyt. Soc. 1973 e Koehler, 1960). Estes problemas acontecem pelo fato do fungo infectar tanto seedlings como colmo e espigas de plantas adultas. No primeiro caso, os tecidos das plantas ainda novas não oferecem resistência à penetração e desenvolvimento do patógeno que se torna bastante agressivo. Nas plantas adultas, a penetração pode-se dar pelas raízes, pelo ponto de encontro destas com o colmo, pelo ponto de junção da bainha das folhas com o colmo e diretamente através da epiderme do colmo

ou através de ferimentos provocados por insetos e tratos culturais (Craig e Hooker, 1961; Koehler, 1960; McNew, 1960 e Ullstrup, 1943).

No caso das plantas novas, o patógeno após a penetração se estabelece nos tecidos e aí permanece relativamente inativo até a planta completar o seu período de crescimento (McNew, 1960).

Diplodia maydis tem sido encontrado apenas em milho e estudos levados a efeito com diferentes isolados mostraram diferenças quanto à patogenicidade (Calvert et alii, 1959; Kappelman et alii, 1961 e Koehler, 1960).

Trabalhos conduzidos por Durrell (1922 e 1925) mostraram que o fungo é capaz de destruir a celulose e teve um ótimo de crescimento em meio de cultura quando cultivado a 29-31°C não havendo crescimento a temperaturas maiores que 36°C ou menores que 1°C.

3.2. Uso de Inoculação Artificial para Estudo de Podridões do Colmo Causadas por Diplodia maydis.

3.2.1. Métodos de inoculação artificial

Heald et alii foram os primeiros a usar a inoculação artificial em colmo de milho com Diplodia (Koehler, 1960). A partir dessa experiência, vários métodos surgiram, visando melhorar a eficiência técnica, tais como: uso de seringa (Ivanoff, 1934; Kappelman e Thompson, 1966; Smith et alii, 1938), palitos de dentes (Happelman e Thompson, 1966; Young, 1943; Williams e Menon, 1957), limpador de cachimbos (Cappellini, 1959). Posteriormente, Grogan e Boling (1968) fizeram uso de

uma pistola de pressão. A prática de fazer uma perfuração no colmo antes da utilização da seringa foi feita por Smith et alii (1938), e Calvert e Zuber (1966) usaram uma perfuradora elétrica a fim de evitar rachaduras no colmo antes da utilização de palitos de dentes para inoculação.

Foley (1960) e Pappellis (1962) usaram um método onde os grãos de cereais impregnados do patógeno eram introduzidos no colmo, previamente perfurado.

Williams e Menon (1957), usando furador de rolhas e disco de ágar com o patógeno, acharam o método eficiente quando comparado com o de palito de dentes e seringa, devido à fácil preparação do inóculo e rápida inoculação, sendo muito prático para uso de inoculações em larga escala. Koehler (1960), ao comparar a eficiência quanto ao uso de seringa, palitos de dentes e limpador de cachimbo, não encontrou diferença significativa entre os mesmos. Este autor usou uma "bengala de inoculação" que permite avaliar a quantidade de esporos e volume de suspensão usados por planta e que pode ser utilizada com relativa facilidade em inoculações de grande número de plantas.

Como a severidade dos sintomas é influenciada pela concentração de esporos, torna-se importante a determinação desta. Koehler (1960) usou uma concentração de 8×10^6 conídios por mililitro da suspensão, enquanto Vanderweyen (1960) obteve resultados satisfatórios com uma concentração de $5,5 \times 10^6$ conídios por mililitro.

A "bengala de inoculação" descrita por Koehler (1960) permite uma vazão de aproximadamente 0,8 mililitros da suspensão, por planta, muito próximo do volume de inóculo (1 ml), usado por Williams e Menon (1957) e Vanderweyen (1960).

A eficácia de uma suspensão de esporos como inóculo pode influenciada pela idade da cultura a partir da qual é preparada ou pelo período de conservação da suspensão após sua preparação (Koehler, 1960).

3.2.2. Local de inoculação

De um modo geral, a resistência do colmo ao desenvolvimento de D. maydis não se manifesta de maneira uniforme entre os internódios de uma planta, havendo maior suscetibilidade nos internódios superiores que nos inferiores (Wysong e Hooker, 1966).

Hooker (1957), inoculando diferentes internódios de linhagens resistentes e suscetíveis, conseguiu detectar diferenças nos comportamentos das linhagens com relação ao fungo, somente quando os internódios basais foram inoculados. Inoculações feitas no 3º, no 4º e no 5º internódios, localizados acima do solo, originaram desenvolvimento progressivamente maior dos sintomas nos internódios inoculados, e as diferenças entre as linhagens foram menores. O 5º internódio foi totalmente envolvido pelo patógeno, independentemente se a linhagem era resistente ou suscetível.

O primeiro internódio acima do nível do solo de uma maneira geral é menor que os demais, sendo às vezes envolvido por raízes, fato este que dificulta o estudo das condições internas da medula. Neste caso, o 2º internódio é referido como o primeiro internódio alongado acima do solo ou o primeiro internódio acima da coroa principal de raízes (Koehler, 1960).

3.2.3. Época de inoculação

A suscetibilidade do colmo abrange um período de tempo mais ou menos extenso, iniciando algumas semanas antes da polinização e aumentando até o amadurecimento das sementes. Observações neste sentido foram registradas por Michaelson (1957), ao fazer inoculações em intervalos semanais e observar o desenvolvimento dos sintomas em três variedades de milho. As infecções resultantes das inoculações feitas mais cedo, antes da polinização, não foram tão extensas quanto aquelas provenientes de inoculações posteriores à polinização, apesar de haver um maior período para o desenvolvimento de podridões. Hooker (1967) usou 5 linhagens de milho e as inoculou com D. zeae, 1, 2, 3 e 4 semanas após a polinização e verificou desenvolvimento igual da doença para as diferentes épocas de inoculação, sendo que o desenvolvimento foi mais rápido durante os primeiros estágios do período de incubação, nas linhas suscetíveis. Nas linhas de resistência intermediária, a taxa de desenvolvimento da infecção foi constante durante todo o período e nas resistentes não ocorreu aumento a partir da 2ª semana após a inoculação. Estes resultados sugerem que o melhor procedimento seria inocular dentro de 1-3 semanas após a polinização.

O fato de existirem linhagens e híbridos com ciclos maiores ou menores torna importante que a época de inoculação não seja fixa para cultivares de ciclos diferentes, mas sim de acordo com o estágio de desenvolvimento de cada uma. Além disso, embora Koehler (1960) tenha encontrado que épocas mais próximas à antese sejam as mais indicadas para a inoculação, nos seus experimentos a taxa de desenvolvimento dos sintomas internos variaram entre as linhagens, para uma mesma época de inoculação. Assim, em inoculações feitas duas semanas após a polinização houve redução significativa na taxa de desenvolvimento de podri-

em 2 casos estudados e não foi detectada redução significativa para 5 outros casos.

3.2.4. Época de avaliação dos resultados

Embora Williams e Menon (1957) tenham medido os resultados de suas observações aos 12-14 dias após a inoculação, com resultados satisfatórios, e os dados de Michaelson (1957) tenham indicado que o colmo do milho é suscetível ao patógeno durante um longo período a partir de algumas semanas antes da polinização até o amadurecimento das espigas, Hooker (1957) afirma que o melhor período para se avaliar a se veridade da doença está entre 3-4 semanas após inoculação. Koehler (1960) admite que as observações não devem ser tomadas antes de 3-4 semanas após a inoculação e podem ser feitas após essa época contanto que se faça antes que as plantas comecem a morrer. Além disso, se é desejável medir os efeitos da inoculação artificial, as reações das plantas deverão ser observadas antes que as plantas testemunhas morram devido a infecções naturais.

3.2.5. Métodos de avaliação

Os métodos para avaliação dos resultados, no caso da inoculação artificial no colmo, têm-se baseado principalmente, ou no desenvolvimento da sintomatologia interna, ou na morte prematura de plantas.

No primeiro caso, o colmo do milho é aberto longitudinalmente a fim de permitir a avaliação dos sintomas internos. DeVay et alii (1957), trabalhando com Giberella zeae (Schw) Petc diferenciaram 4

classes as quais denominaram resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis e suscetíveis correspondendo, respectivamente, a menos de 1/4, 1/4 a 1/2, 1/2 a 3/4 e mais de 3/4 da área interna descolorida do internódio. Outros autores, como Hooker (1956), Michaelson (1957), Wyson e Hooker (1966) e Pappelis (1970), usaram um maior número de classes, incluindo a extensão da área descolorida nos internódios vizinhos.

Koehler (1960) descreveu um outro método no qual apresenta o número de internódios com sintomas com decimais para indicar a extensão dos sintomas dentro deles ou alcançando os internódios vizinhos.

A inoculação do colmo com D. zeae, segundo Koehler (1960), causa a morte prematura das plantas, e isto justifica, em parte, o uso de observações quanto à morte prematura de plantas para determinação da suscetibilidade. Os trabalhos de Craig e Hooker (1961) com D. zeae e de Littlefield e Wilcoxson (1962) com Fusarium graminearum (Schw.) indicaram que a obstrução dos vasos do colmo por hifas e substâncias resultantes da decomposição das paredes celulares e vasos podem resultar na morte prematura das plantas.

Inoculações múltiplas com D. zeae, no mesmo colmo, aceleram a seca prematura das plantas suscetíveis, sendo que, a morte prematura de plantas inoculadas é função do número de inoculações, segundo Koehler (1960). Para este autor, este tipo de avaliação só deve ser utilizado quando a podridão do colmo for considerada a única causa de morte da planta, não podendo ser usado quando houver ataque interno de pragas, doenças de folhas ou quando as plantas já estiverem mortas por haverem atingido a maturação.

Correlações significativas foram obtidas por Semeniuk

(1942) entre a morte prematura do milho, em decorrência de causas naturais, e o desenvolvimento de podridões resultantes de inoculações artificiais. Da mesma maneira, Koehler (1960) verificou uma correlação muito alta entre a morte prematura das plantas e número de internódios doentes por colmo, resultante de infecções naturais e a extensão das podridões ocasionadas pela inoculação artificial com Diplodia zeae e Gibberella zeae.

A quebra do colmo não constitui um bom critério para avaliação da resistência do milho à podridão, embora seja um caráter usado pelos melhoristas na seleção de cultivares, independentemente do fato da quebra ser consequência de podridões ou de outras causas (Wernham, 1959 e Koehler, 1960). Se por um lado Smith et alii (1938) encontraram correlações positivas entre a quebra e ocorrência de podridões do colmo, outros como Wernham (1959) e Zuber et alii (1957) não encontraram tal fato, havendo ainda os resultados obtidos por Koehler (1960) que se revelaram irregulares.

O enfraquecimento do colmo, como resultante da atividade contínua de Diplodia zeae, eventualmente resultou na quebra e desintegração do caule nos trabalhos conduzidos por Foley (1960) e Calvert (1967), tendo o último autor verificado que a destruição da medula por Diplodia, inoculada em hospedeiro suscetível, reduziu 80% da resistência ao esmagamento.

Hunter (1937) aponta que, além de injúrias provocadas por insetos, um sistema radicular deficiente para sustentação, desajustes ecológicos e fisiológicos ou combinação dos dois, e colmos fracos decorrentes da própria estrutura anatômica, podem influenciar o tombamento ou quebra do milho.

Cloninger et alii (1970), visando determinar métodos para comparar a qualidade do colmo, verificaram que a resistência do mesmo à Diplodia pode ser usada para selecionar resistência ao acamamento, porém com limitações, já que alguns híbridos permitem o desenvolvimento de podridões e mantêm resistência satisfatória à quebra.

Hoffbeck (1963 e 1964), estudando a herança da resistência à quebra do colmo e à D. zeae e Gibberella zeae em milho, verificou que a ligação entre a resistência aos fungos e a quebra do colmo é de possibilidades desprezíveis. Afirma ainda que as pequenas relações encontradas por Foley (1960), entre os resultados de inoculações artificiais e as síndromes provocadas por infecções naturais, sugerem, igualmente, que a resistência do hospedeiro à quebra, pode não ter a mesma base genética que a resistência aos organismos da podridão.

3.3. Alguns Fatores que Influenciam o Desenvolvimento das Podridões Causadas por Diplodia maydis

3.3.1. Condições do tempo refletidas na umidade do solo e temperatura do ambiente

Muitos fatores ambientes têm sido relatados como sendo capazes de influenciar no desenvolvimento de podridões do colmo em milho, sendo as condições de umidade do solo e temperatura bastante mencionadas. Sumer (1968), conduzindo experimentos a fim de verificar porque podridões do colmo ocorriam com mais frequência nas áreas irrigadas de Nebraska (EUA) do que nas áreas mais secas daquele Estado, observou que a doença ocorria mais quando a umidade do solo foi mantida entre o ponto de saturação e a capacidade normal de umidade do solo. A

partir desses dados, sugere que a alta umidade do solo dá lugar a grandes produções de grãos e conseqüentemente exaure os nutrientes das raízes e colmo tornando esses órgãos mais suscetíveis aos patógenos. Alta umidade do solo pode também resultar na perda de oxigênio, excesso de CO₂, ou na produção de toxinas. Um ou mais desses fatores provavelmente podem afetar o crescimento da planta, a microflora do solo ou suas interações.

Também foi verificado por Michaelson (1957) que o desenvolvimento de Diplodia zeae e Gibberella zeae ocorreu melhor em colmo de plantas quando estas cresceram em solo não saturado que quando em solo saturado. Quanto à temperatura, o mesmo autor verificou maior severidade de podridões a temperaturas de 29,6°C que a 18,3°C tanto para Diplodia zeae como para Gibberella zeae. As variações anuais de tempo que refletem nas podridões do colmo não ocorrem apenas em infecções naturais, mas também naquelas resultantes de inoculações artificiais no colmo (Michaelson, 1957 e Zuber et alii, 1957).

3.3.2. Fertilidade do solo

De modo geral, os trabalhos mostram que altas concentrações de nitrogênio favorecem o desenvolvimento das podridões do colmo de milho, enquanto que altas concentrações de potássio e de fósforo diminuem. Abney et alii (1971), usando a resistência do colmo à quebra como meio de estimativa, verificaram que esta resistência foi maior nos canteiros que receberam potássio, quando se tratava de variedades resistentes à podridão. Quanto às condições da medula, outro fator importante no desenvolvimento da podridão, verificaram que esta foi favorecida nos canteiros tratados com nitrogênio e não naqueles tratados com

potássio. Relacionando os três critérios como dureza do colmo, podridões naturais e condições da medula, houve indicação de que a podridão do colmo foi inibida pela adição de potássio. Foley e Wernham (1957), usando como critério de avaliação a extensão da área necrosada, dureza do colmo e morte prematura das plantas, observaram que uma alta relação N:K (200:0) aumentou severidade da doença enquanto que numa relação mais baixa (0:200), houve redução. Resultados semelhantes foram encontrados por Otto e Everet (1956) quando inocularam Gibberella zeae e Fusarium fujikuroi, (Saw) Wr., mas, neste caso, nem todos os híbridos responderam à ação desses dois elementos num mesmo grau. A ação de N foi mais acentuada quando a cultura do milho seguiu uma outra de milho do que quando seguiu a uma de alfafa.

Embora Koehler (1960) não tenha encontrado influência apreciável do nitrogênio no desenvolvimento das podridões, os trabalhos de Josephson (1962) mostraram que havia diferenças no grau de senescência entre os híbridos dentro de um grau de maturação e que a quebra do colmo estava altamente relacionada com o grau de envelhecimento das plantas. A aplicação de potássio diminuía a taxa de envelhecimento, levando o autor citado a admitir que este seria um bom critério para avaliação do efeito do potássio. Admite a possibilidade do desenvolvimento de híbridos que possuam a habilidade de absorver uma grande quantidade de nutrientes e assim permanecerem com colmos verdes até a época da colheita.

Os resultados obtidos por Thayer e Williams (1960) mostraram que altas concentrações de fósforo reduziram o desenvolvimento de podridões do colmo, mas que os efeitos de N e K estavam interrelacionados, sendo o efeito de um dependente do efeito do outro.

3.3.3. Precocidade das variedades

Alguns trabalhos de campo associam precocidade das variedades com suscetibilidade a podridões do colmo. Entre os híbridos cultivados em New York (EUA), os precoces foram mais suscetíveis que os tardios (Boothroyd et alii, 1955). Resultados idênticos foram encontrados por Koehler (1960), afirmando este que a maior suscetibilidade observada nas variedades precoces se deve ao fato destas atingirem o estágio de suscetibilidade mais cedo. Este fato pode estar relacionado com as condições do tempo no qual as variedades precoces atingem o seu estágio de maturação fisiológica. Este mesmo argumento é usado por Pappellis e Boone (1966) para explicar as diferentes taxas de infecção natural que encontraram ao plantarem milho em épocas diferentes. Concluíram então que a suscetibilidade às podridões está altamente relacionada com a época de ocorrência da doença e o estado de senescência do tecido nodal.

Outros fatores estão relacionados com o fato de variedades mais precoces serem mais suscetíveis, como bem discutem Wall e Mortimore (1965). Eles verificaram que os híbridos resistentes às podridões do colmo, apresentaram uma taxa maior de crescimento, maior área foliar e densidade mais alta do colmo. Os suscetíveis foram caracterizados pela cessação do crescimento vegetativo por ocasião da polinização e rápida senescência das folhas e completando em um curto período após a maturação fisiológica. Por outro lado, as resistentes continuavam crescendo vegetativamente durante várias semanas após a polinização. Nestes, as diferenças nas condições da medula quando as plantas passavam do estágio de crescimento vegetativo para o reprodutivo era menos distinto, mostrando um pouco mais de vigor nos tecidos após a polinização.

3.3.4. Produção

A suscetibilidade do milho ao ataque de Diplodia maydis é influenciada pela produção. Quando Michaelson (1957) removeu as espigas das plantas, 2 semanas antes da inoculação, houve menor incidência de podridões no colmo do que nas plantas cujas espigas não foram removidas. Holbert et alii (1935) observaram que havia menos podridões em plantas sem espigas, que naquelas com espigas, enquanto Koehler (1960) mostrou que no desenvolvimento de podridões em híbridos, os primeiros colmos a morrer foram justamente aqueles que produziram 2 espigas. As plantas cujas espigas foram retiradas mais cedo, logo após a polinização, estavam relativamente livres de infecções naturais por Diplodia e Gibberella.

Essa relação entre desenvolvimento da moléstia e produção também se fundamenta em outros trabalhos feitos com Diplodia maydis nos quais foram observadas correlações entre o conteúdo de açúcares no colmo e suscetibilidade. Houve diminuição de açúcares no colmo, à medida que a planta amadurece (Craig e Hooker, 1961), sugerindo maior atividade de translocação desses açúcares do colmo para as espigas.

3.3.5. Danos em folhas e raízes

Holbert et alii (1935) e Koehler (1960) observaram que uma defolicação parcial aumenta o desenvolvimento de podridões do colmo causadas por Diplodia ou Gibberella zeae. Michaelson (1957) ao estudar diversos fatores que influenciam no aparecimento da doença, verificou que removendo as folhas antes da inoculação para simular o efeito de doenças foliares, houve um aumento na incidência de podridões. Se-

melhantemente, Pappellis (1963a, 1963b e 1970) relatou que injúrias nas folhas e raízes aumentaram a suscetibilidade das plantas. Neste caso, o efeito das injúrias nas raízes foi maior que os danos causados nas folhas. O aumento na taxa de morte de tecido celular no colmo foi resultado direto dos cortes nas raízes e da morte das folhas baixas em consequência dos danos sofridos, sendo que variedades resistentes revelaram capacidade para desenvolver novas raízes, quando as primeiras foram injuriadas (Pappellis, 1970).

Plantas com infecções severas de Helminthosporium nas folhas desenvolveram maior severidade de podridões no colmo do que aquelas com baixas taxas de infecções, segundo pesquisa desenvolvida por Fajemisin e Hooker (1974). Estes autores sugerem que as aparentes diferenças entre híbridos, quanto à predisposição, provavelmente indicam que fatores outros além da reação à mancha de Helminthosporium podem ser igualmente importantes, inclusive possíveis interações genéticas quanto a reações da planta a podridões do colmo e manchas da folha.

3.3.6. Resistência

A resistência e a suscetibilidade do milho à podridão do colmo são um caráter hereditário, havendo diferenças entre linhagens ou entre híbridos neste aspecto. Não há plantas imunes, sendo a resistência um caráter relativo e dominante (Smith et alii, 1938; Koehler, 1960). Nos trabalhos de Hoffbeck (1963), a resistência das linhagens variou de dominante a altamente dominante, sendo que Andrew (1964) relatou que a resistência não é de natureza monogênica para qualquer dos patógenos responsáveis por podridões do colmo e que as linhagens variaram de muito suscetíveis a resistentes, com gradações intermediárias.

Kappelman (1966) e Banzal (1970) sugerem que os genes que governam resistência a D. maydis são de herança quantitativa e que a ação dos genes é predominantemente aditiva. Igualmente, El-Rouby (1966) concorda que haja predominância da ação gênica dominante para resistência e sugere que este caráter seja governado por muitos genes.

Quanto à natureza da resistência, a mesma foi associada ao teor de açúcares no colmo (Sayere, 1931; Van Reen e Singleton, 1952; Craig, 1961), conteúdos sólidos (Wysong, 1966), com teor de nitrogênio (Ray et alii, 1953; Zuber et alii, 1957), cinza e lignina (Zuber et alii 1957).

Os trabalhos de Helen e Dickson (1945), mostrando a existência em extrato do colmo de milho de uma substância capaz de inibir o crescimento do fungo D. zeae, sugerem um tipo de resistência fisiológica não necessariamente associada com dureza do colmo ou resistência mecânica.

A presença de substância com propriedades antifúngicas foi detectada em colmo de milho por Whitney e Mortimore (1969 e 1960) e posteriormente BeMiller e Pappellis (1964, 1965a e 1965b) relacionaram a resistência do colmo à penetração e desenvolvimento do patógeno com a presença de uma fração glicosídica presente no mesmo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Origem dos Isolados e Meios de Cultura Utilizados

Os isolados do patógeno D. maydis foram obtidos a partir de tecidos do colmo e de sementes, infectados, oriundos de Piracicaba .

Para obtenção dos isolados e reisolados do fungo foi utilizado o substrato Ágar-Água (AA) (Kelman, 1967). O meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (Kelman, 1967) foi utilizado para preservação e caracterização do patógeno e sementes de sorgo (Whitehead, 1957) para obtenção de inóculo.

Os meios AA e BDA foram esterilizados através de autoclavagem a 1,0 atmosfera, durante 30 minutos, enquanto o meio de sementes de sorgo foi esterilizado em dois períodos de 30 minutos cada. Após cada período de esterilização, os frascos contendo as sementes foram agitados a fim de promover a separação das mesmas e permitir melhor desenvolvimento do fungo.

4.2. Reisolamentos e Preservação do Patógeno

Os reisolamentos do fungo foram feitos a partir de fragmentos de tecidos do colmo inoculado, sendo os mesmos retirados nas margens das áreas necrosadas. Os tecidos, após sofrerem desinfecção superficial, foram transferidos para placas de Petri contendo meio Ágar-Água e conservadas em condições ambientes de laboratório. Após o desenvolvimento do fungo, fragmentos do substrato contendo estruturas do mesmo foram transferidas para placas e tubos de ensaio contendo o meio BDA, onde foram preservados os isolados.

4.3. Obtenção e Preparo do Inóculo

O fungo foi cultivado em erlenmeyers com capacidade para 1.000 ml, contendo cada um 250 ml de sementes de sorgo, acrescidos de 250 ml de água, autoclavados, sendo as culturas mantidas em condições ambientes de laboratório durante 20 dias.

A suspensão de conídios foi obtida adicionando-se a cada frasco 50 ml de água esterilizada. O conteúdo foi então agitado com auxílio de um bastão de vidro, a fim de fragmentar o meio e facilitar a liberação dos conídios. Em seguida, a suspensão foi passada através de uma peneira de malha fina, para separar as impurezas maiores e depois filtrada através de uma gase. A suspensão de conídios assim obtida foi ajustada para uma concentração de 5×10^6 conídios/ml.

4.4. Inoculação

No primeiro e no segundo experimento, as plantas foram inoculadas, respectivamente, aos 10 e aos 15 dias após o florescimento .

As inoculações foram feitas no 1º e no 4º internódio alongado acima da superfície do solo, usando-se a "bengala de inoculação" descrita por Koehler (1960). O volume da suspensão de inóculo gasto por cada planta foi de aproximadamente 0,8 ml.

4.5. Avaliação dos Resultados

No primeiro experimento, as avaliações foram feitas aos 15, 22 e 29 dias, enquanto que as do segundo, aos 15, 25 e 35 dias após a inoculação.

Para avaliação, tanto do desenvolvimento da sintomatologia interna da doença como da morte do tecido do colmo, as plantas foram cortadas abaixo do primeiro e acima do 5º internódio. Após serem libertados das folhas e bainhas, os internódios foram separados através de cortes transversais para em seguida serem cortados longitudinalmente, passando o corte no ponto de inoculação. As escalas de notas estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2 a seguir, e são baseadas, respectivamente, em Pappelis e Smith (1963) e Pappelis et alii (1973), com ligeiras modificações. Considerou-se tecido morto aquela parte fofa, branca, constituída de células mortas.

Tabela 1 - Escala de notas usada para avaliação da percentagem da área do internódio atingida pelos sintomas

Notas	% de Tecido com Sintomas
1	menos de 25% da área com sintomas
2	de 26 a 50% da área com sintomas
3	de 51 a 75% da área com sintomas
4	de 76 a 100% da área com sintomas
5	menos de 50% do internódio vizinho atingido pelos sintomas
6	mais de 50% do internódio vizinho atingido pelos sintomas

Tabela 2 - Escala de notas usada para avaliação da percentagem da área do internódio com tecido morto (Condições da medula).

Notas	% de Tecido Morto
0,0	sem tecido branco no internódio
0,1	até 1,0% de tecido branco
0,5	de 2 a 12% de tecido branco
1	de 13 a 25% de tecido branco
2	de 26 a 50% de tecido branco
3	de 51 a 75% de tecido branco
4	de 76 a 100% de tecido branco
5	internódio e nó em estado avançado de morte. Planta não totalmente morta.
6	Planta totalmente morta.

4.6. Instalação e Manutenção dos Experimentos

Os experimentos foram instalados em área do Departamento de Fitopatologia da ESALQ. O primeiro instalado no dia 13 de novembro de 1974 e o segundo, que se constituía numa repetição do primeiro, no dia 5 de setembro de 1975.

O delineamento utilizado foi de blocos ao acaso, com parcelas sub-subdivididas e com quatro repetições. Como parcelas, foram utilizados separadamente os dois híbridos de milho, DG e M-206, considerados respectivamente como suscetível e moderadamente resistente ao tombamento devido a podridões do colmo. Estes híbridos foram semeados em linhas contínuas e paralelas, havendo distâncias de 1,0 metro entre as mesmas. Cada parcela foi subdividida em três subparcelas que representaram as três épocas de avaliação dos resultados, segundo item 4.5. Cada tratamento de inoculação, ou sub-subparcela, foi constituído de uma fileira de 3 metros de comprimento, com 15 plantas espaçadas de 0,20 m. Os tratamentos de inoculação foram os seguintes:

- 1) Inoculação do primeiro internódio alongado acima do nível do solo.
- 2) Inoculação do 4º internódio alongado acima do nível do solo.
- 3) Testemunha - "Inoculação" do 1º internódio alongado acima do nível do solo com água estéril.
- 4) Testemunha - plantas sem inoculação.

4.7. Condições do Tempo Durante a Realização dos Experimentos

Os dois experimentos foram conduzidos em dois anos consecutivos, em épocas diferentes de plantio. Os dados relativos aos três índices pluviométricos mensais, médias mensais de temperatura e umidade relativa são apresentados na Tabela 1 do Apêndice.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Sintomatologia Interna

Quanto ao efeito de híbridos, as análises de variância revelaram um efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade (Tabelas 2 e 3 do Apêndice). As médias obtidas foram 2,31 e 2,66 para o híbrido DG e 1,98 e 2,96 para o híbrido M-206, respectivamente, no primeiro e no segundo experimentos.

Como pode ser observado, os híbridos apresentaram reações diferentes tanto no primeiro como no segundo experimento. O híbrido DG apresentou médias mais altas que o híbrido M-206 no primeiro, acontecendo o inverso no segundo.

Como os dois experimentos foram conduzidos em épocas diferentes de plantio, a observação de que o híbrido DG comportou-se mais suscetível do que M-206 no primeiro experimento e mais resistente no segundo, pode resultar do fato de os mesmos reagirem diferentemente quando as condições do meio são modificadas. Além da possibilidade da alteração fisiológica de cada híbrido ser de intensidade diferente para fatores tais como luz, calor, umidade ou interações entre dois ou mais deles, a flora microbiana do solo pode ser alterada em quantidade e qualidade para cada época de plantio. Neste caso, cada híbrido poderia reagir diferentemente a cada população microbiana, havendo maior ou menor predisposição ao desenvolvimento das podridões do colmo.

Para um efeito linear de épocas, no desenvolvimento dos sintomas internos em colmos inoculados, as análises de variância revelaram um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidades, sendo as

equações de regressão dadas pelas fórmulas $Y_i = 1,1820 + 0,1380X_i$ e $Y_i = 2,5059 + 0,0308X_i$ respectivamente para o primeiro e segundo experimento.

As médias das notas obtidas respectivamente para 1ª, 2ª e 3ª épocas foram 1,70; 2,08 e 2,66, no primeiro experimento e 2,66; 2,81 e 2,97 no segundo.

No primeiro experimento, pelo Testes de Tukey, com $\Delta = 0,34$, houve diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade entre a severidade dos sintomas internos na primeira época de avaliação e aqueles observados na 2ª e 3ª épocas. Igualmente houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os sintomas observados na 2ª época e os que foram observados na 3ª. No segundo experimento, com $\Delta = 0,26$, ao nível de 5% de probabilidade, houve diferença significativa apenas entre os sintomas internos observados na 1ª e 3ª épocas.

Estes resultados revelam que o desenvolvimento dos sintomas internos está relacionado com o tempo decorrido a partir da época de inoculação. Eles se tornam mais severos à medida que o tempo passa.

Hooker (1957) encontrou resultados semelhantes ao verificar que os sintomas provocados por Diplodia zeae em colmos de milho aumentaram durante quatro semanas após a inoculação. As plantas suscetíveis apresentaram uma taxa de progressão no desenvolvimento dos sintomas mais elevada durante as duas primeiras semanas, sendo que nas plantas de suscetibilidade intermediária a taxa foi mais ou menos constante durante as quatro semanas. Nas plantas resistentes foi verificado aumento na taxa de desenvolvimento dos sintomas apenas durante a primeira semana que seguiu a inoculação.

Isso, provavelmente, pode resultar do fato de ser o patógeno um parasita facultativo. Assim, à medida que a planta envelhece, aumenta a percentagem de células mortas no tecido do colmo, facilitando o desenvolvimento do fungo nos mesmos. Esta possibilidade já foi citada por Pappellis e Smith (1960 e 1963), após fazerem estudos histológicos em plantas inoculadas verificando que o desenvolvimento do patógeno esteve confinado aos tecidos mortos do colmo.

A intensidade dos sintomas por ocasião da 1ª época no segundo experimento, já correspondia praticamente àquela observada por ocasião da 3ª época do primeiro experimento. Isto, provavelmente, reflete o fato de que os tecidos já haviam atingido um estágio mais avançado de suscetibilidade ao iniciar-se as avaliações para o segundo experimento. Disto resultou que a taxa de desenvolvimento dos sintomas neste experimento, a partir da 1ª época foi menor, não apresentando diferenças significativas, senão entre a 1ª e 3ª épocas.

Esses resultados revelam que o aumento na taxa de desenvolvimento dos sintomas internos, refletindo aumento na suscetibilidade dos tecidos, é influenciado pelo estado fisiológico da planta, e este pode ser diferente, dependendo da época de plantio, mesmo considerando igual espaço de tempo decorrido após o pendoamento.

Da mesma maneira os resultados deste trabalho sugerem a necessidade de estudos no sentido de serem determinadas épocas que são mais propícias ao desenvolvimento da doença e relacioná-las com aquelas que são melhores para o desenvolvimento do milho.

Com relação ao efeito híbridos x épocas, as análises de variância não revelaram qualquer efeito significativo mostrando que os

híbridos testados apresentaram as mesmas tendências quanto ao desenvolvimento dos sintomas internos para as diferentes épocas de avaliação. Isto se deve, provavelmente, ao fato dos dois híbridos apresentarem taxas de envelhecimento dos tecidos do colmo bem próximas.

Seriam interessantes estudos a fim de confirmar se híbridos com taxas de envelhecimento semelhantes apresentam idênticos graus de resistência ao patógeno. Neste caso poder-se-ia estudar se este comportamento é geral, visando a possibilidade de avaliar a resistência de híbridos à doença, em qualquer época do ano.

Os dois híbridos em estudo iniciaram o florescimento na mesma época e os períodos decorridos entre os pendoamentos e o amadurecimento das espigas, foram bem próximos para os mesmos. Além disso, como foi discutido atrás, os dois híbridos nos dois experimentos tiveram graus de resistência semelhantes. Nas três épocas de avaliação dos sintomas eles variaram de moderadamente resistentes a moderadamente suscetíveis, segundo Tabela apresentada por DeVay et alii (1957). As observações feitas por Wall e Mortimore (1965) segundo as quais variedades suscetíveis de um modo geral paralizam o crescimento vegetativo mais cedo, após a polinização, enquanto as resistentes apresentam crescimento vegetativo por algum tempo após o pendoamento, concordam com as que foram obtidas neste trabalho relacionadas com os dois híbridos estudados.

As análises da variância, apresentadas nas Tabelas 2 e 3 do Apêndice, também revelaram uma significância, ao nível de 1% de probabilidade, para os efeitos de inoculações dentro de híbridos, nos dois experimentos.

As médias obtidas para as inoculações no 1º e 4º internódios e aquela referente à "inoculação", no primeiro internódio, utilizada como testemunha, para os híbridos DG e M-206 são apresentados, para os dois experimentos, nos quadros 1 e 2 a seguir, e figuras 1 e 2.

Quadro 1. Extensão dos sintomas internos no 1º e no 4º internódio e testemunha com água nos híbridos DG e M-206. 1º experimento.

Híbridos	1º Internódio	4º Internódio	Testemunha c/Água
DG	1,85	3,83	1,27
M-206	1,65	3,08	1,21

Quadro 2. Extensão dos sintomas internos no 1º e no 4º internódio e testemunha com água nos híbridos DG e M-206. 2º experimento

Híbridos	1º Internódio	4º Internódio	Testemunha c/Água
DG	2,05	4,77	1,20
M-206	2,73	4,82	1,34

Para os dois híbridos, o teste de Tukey com $\Delta = 0,35$ e $0,42$ aos níveis de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente para o primeiro e segundo experimento revelou diferenças significativas entre a severidade dos sintomas internos observados para inoculações feitas no 4º internódio quando comparado com o 1º e com testemunha com água. Também foi detectada diferença significativa entre a severidade de sintomas observados no primeiro internódio inoculado e aquela obtida para o

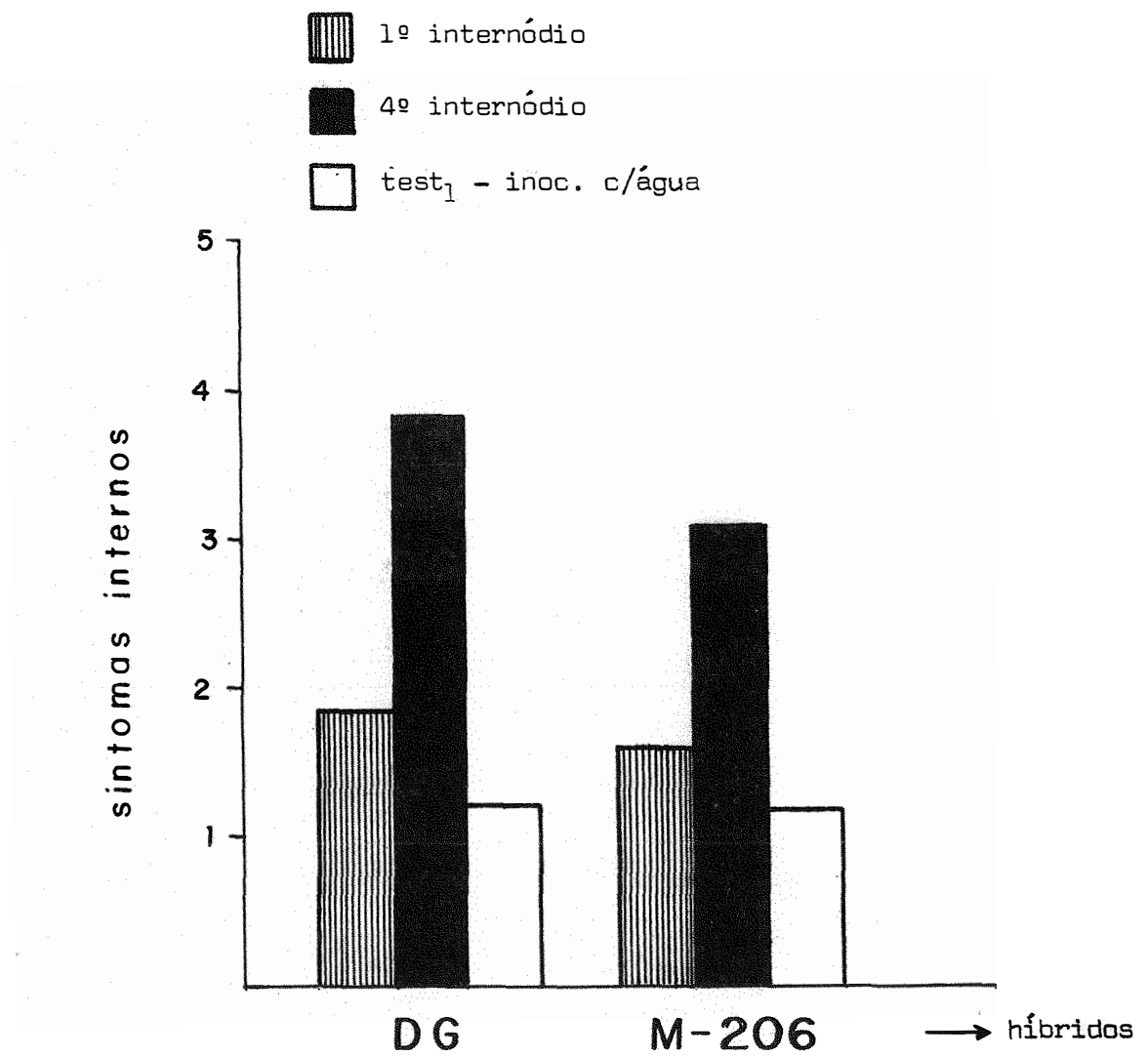


Fig. 1. Extensão dos sintomas internos no 1º e 4º internódios dos híbridos DG e M-206, - 1º experimento.

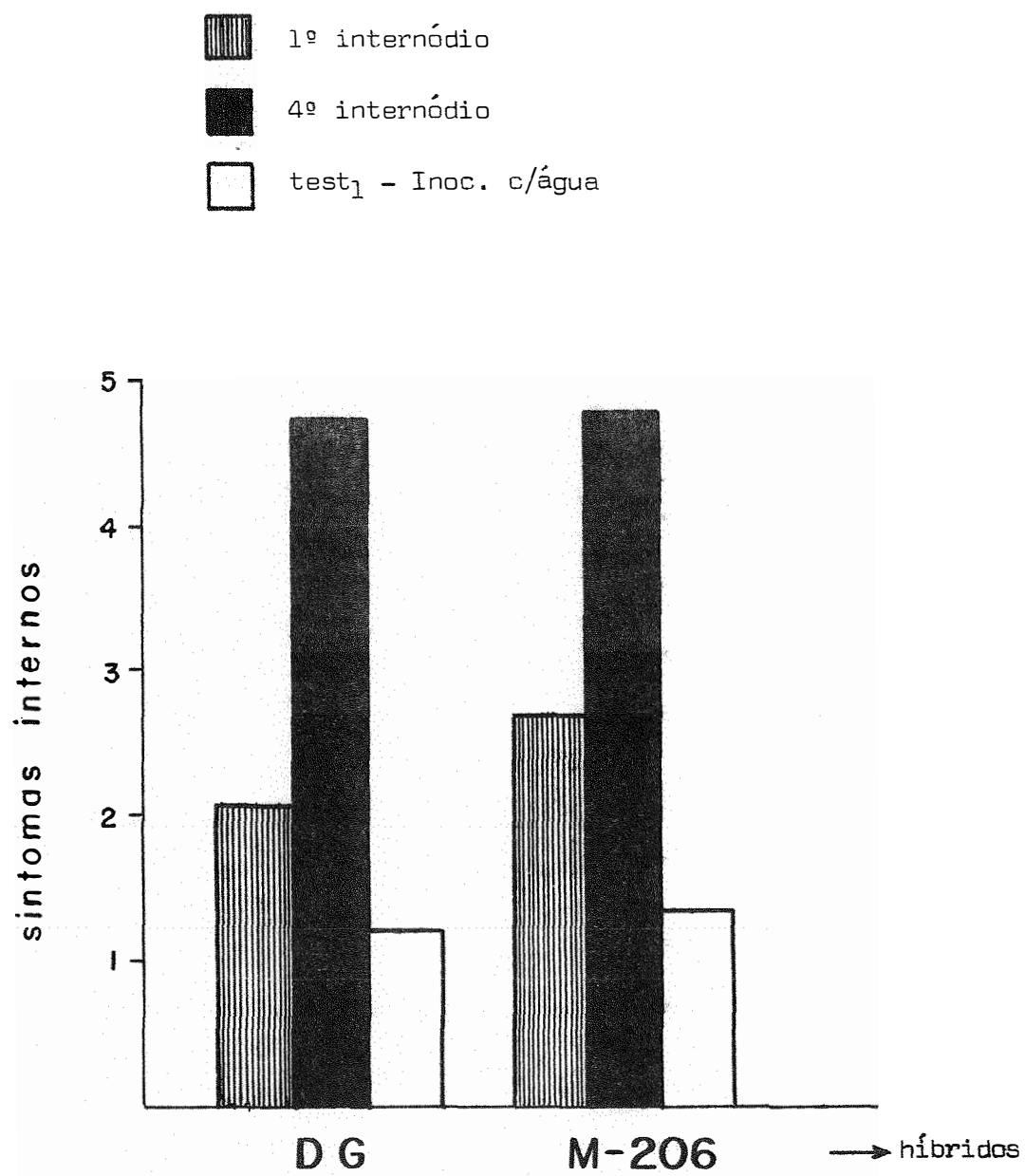


Fig. 2. Extensão dos sintomas internos no 1º e 4º internódios dos híbridos DG e M-206.- 2º experimento.

tratamento com testemunha com água.

A maior severidade dos sintomas internos para internódios que se encontram em posições mais elevadas já foi relatada por Hooker (1957), Pappelis e Smith (1963) e por Wysong et alii (1956). Inoculações feitas por Hooker (1957) no 3º, no 4º ou no 5º internódio, originaram desenvolvimento progressivamente maiores dos sintomas, à medida que se distanciava do 1º internódio sendo as diferenças entre as linhagens cada vez menores. Estes resultados concordam com os do presente trabalho onde o desenvolvimento dos sintomas foi bem maior no 4º internódio em comparação com os desenvolvidos no 1º, sugerindo que o patógeno encontrou melhores condições para seu desenvolvimento no 4º internódio que no primeiro.

Pappelis e Smith (1963) e Wysong et alii (1966) verificaram existir uma maior percentagem de tecido morto nos internódios superiores quando comparada com aquela observada nos internódios inferiores e estabeleceram correlações entre a percentagem de tecido morto e o desenvolvimento dos sintomas internos do colmo. Os dois primeiros autores citados determinaram que o desenvolvimento de D. maydis foi inibido por células vivas, explicando desta maneira o menor desenvolvimento dos sintomas nos internódios inferiores.

A presença de sintomas internos nos internódios inoculados com água, provavelmente deve representar efeitos de contaminações naturais ocorridas durante e após as inoculações.

Quanto ao efeito observado para inoculação dentro de épocas, detectado no 1º experimento, a análise da variância revelou um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade. O desdobramento

desta interação mostrou influências significativas, a níveis de 1% de probabilidade de inoculação dentro da 1ª, da 2ª e da 3ª época.

As médias obtidas para o desenvolvimento da sintomatologia interna no 1º e 4º internódios inoculados e aquelas referentes à "inoculação" utilizada como testemunha nas 3 épocas de avaliação, para o primeiro experimento, são apresentados a seguir, sendo sua representação gráfica vista na Figura 3.

Quadro 3. Extensão dos sintomas internos no 1º e 4º internódio e testemunha com água nas 3 épocas de avaliação. 1º experimento.

Épocas	1º Internódio	4º Internódio	Testemunha c/Água
1ª	1,44	2,59	1,08
2ª	1,71	3,39	1,14
3ª	2,10	4,40	1,50

O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e com $\Delta = 0,42$ revelou, para o primeiro experimento, diferenças significativas entre a sintomatologia interna observada para inoculações feitas no 4º internódio, quando comparada com aquelas observadas no 1º internódio ou com a testemunha com água para as 3 épocas de avaliação.

Por outro lado, foram observadas diferenças significativas entre a sintomatologia interna provocada pela inoculação no primeiro internódio e aquelas provocadas pela "inoculação" testemunha apenas na 2ª e 3ª épocas, não sendo significativa para a 1ª época de avaliação.

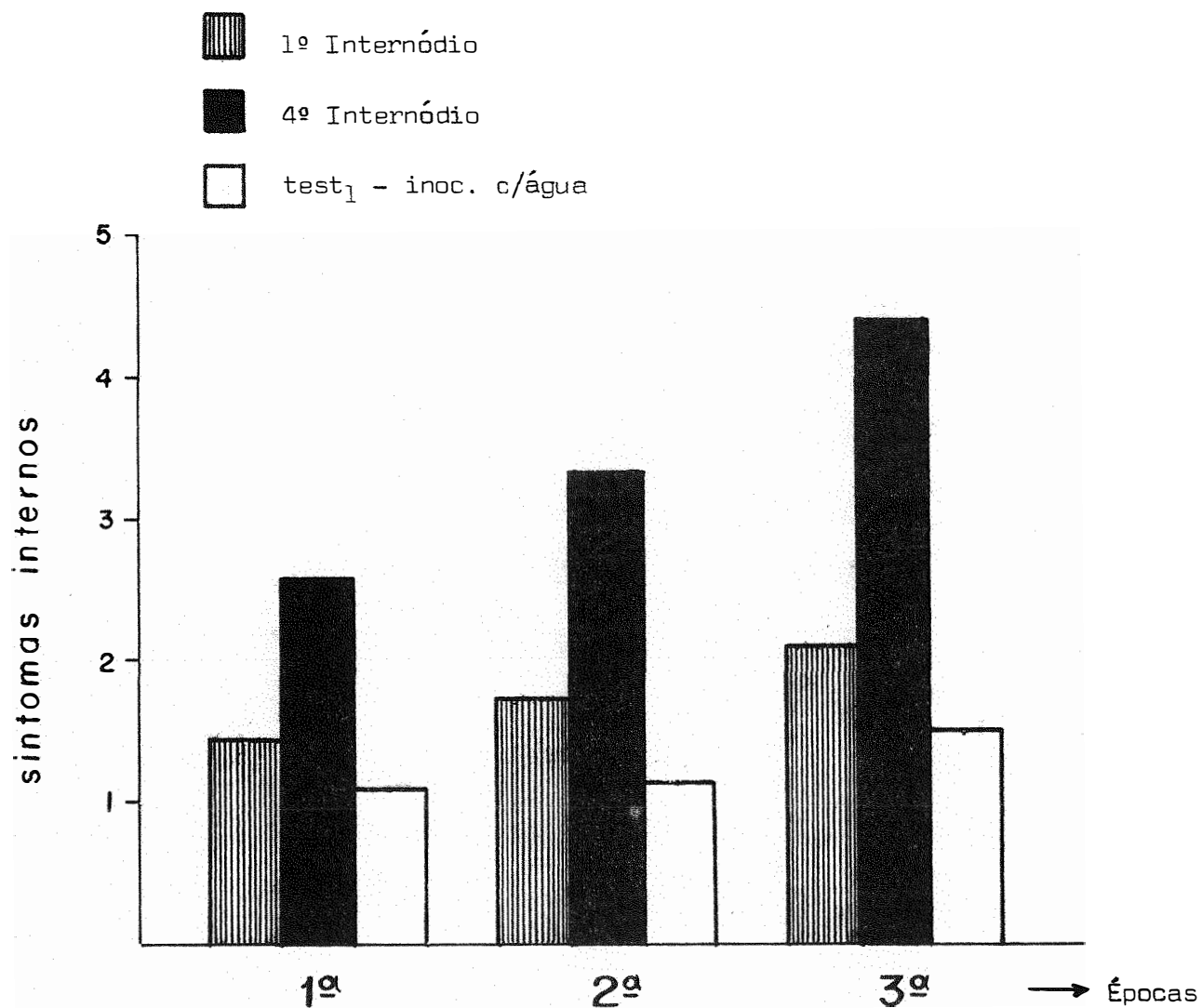


Fig. 3. Extensão dos sintomas internos no 1º e 4º internódios por ocasião das épocas de avaliação. 1º experimento.

Nas 3 épocas, os sintomas internos observados no 4º internódio foram mais severos do que aqueles correspondentes ao 1º internódio inoculado e aqueles detectados no primeiro internódio utilizado como testemunha. Semelhantemente, a severidade dos sintomas no 1º internódio inoculado foram maiores do que aqueles observados no 1º internódio "inoculado" utilizado como testemunha.

Estes resultados revelam que a expressão da sintomatologia interna no 4º internódio é maior do que no primeiro internódio inoculado e do que no 1º internódio quando utilizado como testemunha independentemente do tempo decorrido entre a inoculação e a época de avaliação. Da mesma maneira, os resultados revelam que a sintomatologia interna provocada pela inoculação do patógeno foi mais severa do que aquela decorrente da reação da planta à contaminação ou à injúria provocada pela "inoculação" com água em qualquer época de avaliação estudada.

Na literatura, as recomendações indicam a utilização do primeiro internódio alongado acima do nível do solo, para inoculações, e no mínimo, a terceira semana após a inoculação para avaliação dos resultados (Hooker, 1967 e Koehler, 1960). Através dos resultados apresentados nos Quadros 1 e 2 do Apêndice e tomando como base a Tabela de DeVay et alii (1957), verifica-se que no 1º experimento os dois híbridos, quando estudados através dos sintomas internos do 1º internódio inoculado, apresentaram um mesmo grau de resistência, isto é, moderadamente resistentes, na 1ª e 2ª épocas, respectivamente 2 e 3 semanas após a inoculação. Na 3ª época, ou seja, 4 semanas após a inoculação, o híbrido DG mostrou-se como moderadamente suscetível enquanto que M-206 comportou-se como moderadamente resistente.

Quando os dois híbridos DG e M-206 são comparados através

da sintomatologia interna observada no 4º internódio inoculado observa-se que somente na 1ª época, os mesmos tiveram graus de resistência distintos, respectivamente, moderadamente suscetível e resistente. Na 2ª e 3ª épocas apresentaram graus de resistência iguais ou seja, moderadamente suscetíveis na 2ª e suscetíveis na 3ª época.

Analisando desta feita os resultados do segundo experimento e tomando como referência a Tabela de DeVay et alii (1957) para comparar as reações dos dois híbridos através da sintomatologia interna do primeiro internódio, observa-se que na 1ª época (2 semanas após a inoculação) o híbrido DG mostrou-se moderadamente resistente e M-206 moderadamente suscetível. Na 2ª época, 25 dias após inoculação, ambos mostraram-se moderadamente suscetíveis e na 3ª época, ou seja, 5 semanas após inoculação, ambos mostraram-se suscetíveis.

Considerando novamente Hooker (1967), o mesmo afirma que a melhor época para avaliação dos resultados seria no mínimo três semanas após a inoculação, podendo esta época se prolongar por mais tempo, contanto que haja plantas vivas em número suficiente na ocasião, para avaliação dos resultados. Por outro lado, Fernandes (1975) encontrou que a avaliação da resistência para patógenos do colmo com base na sintomatologia interna, não deve ser feita antes de decorridas 4 semanas após as inoculações, quando estas são realizadas até uma semana após 50% das plantas apresentarem pendão.

Analisando o comportamento dos dois híbridos no primeiro experimento através da sintomatologia interna do primeiro internódio, verificamos que foi possível detectar diferentes graus de resistência entre os dois híbridos, apenas na 3ª época. Já para o segundo experimento, de acordo ainda com a Tabela de DeVay et alii (1957), somente na 1ª

época, isto é, duas semanas após a inoculação houve diferença de comportamento dos dois híbridos.

O estudo dos resultados obtidos através da sintomatologia interna desenvolvida no 4º internódio, mostrou um desenvolvimento muito severo dos sintomas já na primeira época de avaliação, mostrando que o 4º internódio não é um bom local de inoculação com o objetivo de estudar comportamento dos híbridos quanto à resistência a podridões do colmo.

Estes resultados estão de acordo com os de Hooker (1957), o qual conseguiu separar diferentes graus de suscetibilidade à Diplodia entre linhagens de milho, somente quando inoculou internódios basais. Inoculações de internódios superiores originaram lesões sempre maiores, sendo menores as diferenças entre os sintomas apresentados pelas linhagens.

Os híbridos DG e M-206 comportam-se respectivamente como suscetível e moderadamente resistente às podridões do colmo em condições de campo, quando avaliados através da resistência ao tombamento (Pereira, 1977). Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, segundo os quais os dois híbridos apresentaram resistência intermediária ao desenvolvimento interno dos sintomas, pôde-se concluir que a resistência ao tombamento, em condições de campo, não constitui um bom critério para avaliar resistência das plantas ao desenvolvimento dos sintomas internos, representando uma resistência do tipo fisiológico, provocados por D. maydis. Outros fatores, além de resistência ao desenvolvimento fisiológico do fungo, devem, provavelmente, estar relacionados com a resistência das plantas ao tombamento.

De maneira semelhante, Foley (1960) observou que o enfraquecimento do colmo em consequência da atividade contínua de D. zeae, eventualmente resultou na quebra e desintegração do colmo. Além disso, Cloninger et alii (1970) verificaram que a resistência do colmo a Diplodia pode ser usada para selecionar resistência ao acamamento, porém com limitações, já que alguns híbridos permitem o desenvolvimento de podridões e mantêm resistência satisfatória à quebra.

5.2. Condições da Medula

As análises de variância mostraram efeitos significativos para híbridos, ao nível de 1% de probabilidade, para o primeiro experimento, não havendo para o segundo (Tabelas 4 e 5 do Apêndice).

As médias obtidas para os híbridos DG e M-206 foram respectivamente 2,29 e 1,78 no primeiro experimento e 2,28 e 2,34 no segundo experimento.

No primeiro experimento, os híbridos se comportaram de maneira diferente quanto à porcentagem de tecido morto no 2º internódio, não acontecendo da mesma maneira no segundo experimento.

Os resultados sugerem que os híbridos em estudo quando inoculados pode apresentar condições de medula diferentes um do outro, dependendo da época de plantio. Assim sendo, as condições de tempo para cada época de plantio, poderiam influenciar no desenvolvimento fisiológico de diferentes híbridos, podendo desta maneira interferir no processo doença.

Ao comparar-se as médias para a severidade dos sintomas internos no primeiro internódio para os dois híbridos com aqueles referentes às condições da medula no 2º internódio dos mesmos, para os dois experimentos, foi verificada uma correspondência entre percentagem de tecido morto (condições da medula) e desenvolvimento dos sintomas internos.

Quanto ao efeito linear de épocas nas condições da medula, as análises de variância não apresentaram diferenças significativas. No entanto, o efeito quadrático de épocas nas condições da medula foram significativos, ao nível de 1% de probabilidade, nos dois experimentos. As equações de regressão são dadas pelas fórmulas $Y_i = 1,0313 - 0,0565X_i + 0,0048X_i^2$ e $Y_i = 2,6563 + 0,1110X_i - 0,0056X_i^2$ respectivamente para o primeiro e no segundo experimentos.

As médias obtidas para 1ª, 2ª e 3ª épocas foram respectivamente 2,03; 1,88 e 2,20 no primeiro experimento e 2,18; 2,55 e 2,21 no segundo.

Apesar do efeito quadrático de épocas devido aos resultados da 2ª época no primeiro experimento e 3ª época no segundo, observam-se que nos dois casos, houve uma tendência de aumentar a percentagem de tecido morto na medula, quando comparada à 1ª época com a 3ª.

As análises de variância revelaram significância, ao nível de 1% de probabilidade, para os efeitos de inoculação nas condições da medula do 2º internódio, nos dois experimentos, como são vistos nas Tabelas 4 e 5 do Apêndice.

As médias para condições da medula do 2º internódio foram

2,40; 1,51; 2,38 e 1,85 no primeiro experimento e 2,63; 2,18; 2,48 e 1,97 no segundo, quando as plantas foram inoculadas, respectivamente, no 1º internódio, no 4º internódio, "inoculadas" com água no 1º internódio e quando conservados sem ferimento, como testemunhas.

De acordo com o teste de Tukey para os dois experimentos, houve diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade e com $\Delta = 0,22$ entre as condições da medula no 2º internódio para os efeitos das inoculações feitas no 4º quando comparado com inoculação no 1º e testemunha com água sendo detectada diferença significativa entre as condições da medula no 2º internódio para efeitos de inoculação no 4º e testemunha sem ferimento, apenas no primeiro experimento. Foram também detectadas, nos dois experimentos, diferenças significativas entre as condições da medula no 2º internódio para efeitos de inoculações no 1º e testemunha sem ferimento, como também entre os efeitos de "inoculação" com água no 1º internódio e testemunha sem ferimento. Não houve diferença significativa entre as condições da medula no 2º internódio para efeitos de inoculação no primeiro e "inoculação" com água no 1º internódio.

Nos dois experimentos, as condições da medula no 2º internódio foram representadas por maior percentagem de tecido morto quando as plantas foram inoculadas no 1º internódio do que quando foram inoculadas no 4º, ou quando foram usadas como testemunhas, sem ferimento. Também apresentaram maior percentagem de tecido morto que aquelas "inoculadas" com água, embora neste caso as diferenças não tenham sido significativas. Igualmente, nos 2 experimentos, as plantas testemunhas "inoculadas" no 1º internódio com água apresentavam maior percentagem de tecido morto no 2º internódio que aquelas sem ferimento, utilizadas como testemunha, e do que aquelas que foram inoculadas no 4º internódio.

No primeiro experimento, as plantas sem ferimento, utilizadas como testemunha, apresentaram maior percentagem de tecido morto no 2º internódio, que aquelas inoculadas, no 4º internódio, sendo que, no 2º experimento apresentaram em menor percentagem, embora neste último caso, a diferença não tenha sido significativa.

Estes resultados indicam que a inoculação das plantas no 1º internódio provoca um aumento na percentagem de tecido morto no segundo internódio. O fato da diferença entre os efeitos da inoculação no 1º internódio e aqueles da "inoculação" do 1º internódio com água não ser significativa, sugere que, nas condições dos experimentos, o patógeno teve uma influência menor que outros fatores introduzidos pela inoculação.

O fato de no primeiro experimento a inoculação do 4º internódio mostrar menor percentagem de tecido morto no 2º internódio que as plantas sem ferimento utilizadas como testemunha, não foi confirmado no segundo. No entanto, Pappelis (1973), ao inocular espigas com Diplodia maydis verificou que o desenvolvimento do patógeno nos tecidos deste órgão resultou numa menor quantidade de tecido morto no primeiro e no terceiro internódios da planta inoculada. Afirma que o mecanismo segundo o qual a inoculação das espigas resultou em menor quantidade de células mortas nos internódios inferiores pode ser, possivelmente semelhante àquele observado quando removeu espigas das plantas antes da inoculação (Pappelis e Katsanos, 1969). Neste último caso também, houve redução de tecido morto nos internódios inferiores e nos casos acima mencionados a morte de tecido esteve relacionada com o desenvolvimento do sintomas provocados por Diplodia maydis. Estes autores sugerem que estes fatos fornecem bons subsídios para estudos do mecanismo da resistência das plantas ao patógeno.

Estas observações podem igualmente ser confrontadas com aquelas encontradas por Sayere et alii (1931) quando verificaram que impedindo plantas de milho de frutificarem provocaram um acúmulo de açúcares e outros nutrientes no colmo. Assim, o desenvolvimento do fungo nas espigas antes do completo desenvolvimento dos grãos, ou nos tecidos do colmo causando a destruição dos tecidos dos vasos poderiam inibir a translocação dos nutrientes para a formação dos grãos e, consequentemente, resultar na preservação dos tecidos situados em posições inferiores.

O fato de por ocasião do segundo experimento não haver sido observada influência da inoculação do 4º internódio na morte celular do 2º pode resultar do fato das plantas se encontrarem num estágio mais avançado de senescência por ocasião das observações dos resultados.

Com referência ao efeito de híbridos as análises de variância mostraram que não houve efeito significativo para as condições da medula no 3º internódio (Tabelas 6 e 7 do Apêndice). As médias obtidas foram 3,20 e 3,48 para o híbrido DG, 3,10 e 3,55 para o híbrido M-206, respectivamente, no primeiro e no segundo experimento.

Observa-se que os dois híbridos se comportaram da mesma maneira quanto às condições da medula do 3º internódio, tanto no primeiro como no segundo experimento, isto é, o híbrido que se apresentou com maior percentagem de tecido morto no 3º internódio por ocasião do primeiro experimento, também o fez para o segundo. Observa-se, nos dois casos, que houve mais células mortas no terceiro internódio que no 2º sugerindo um aumento progressivo na percentagem de tecido morto nos internódios superiores, independentemente na inoculação de outros internódios da mesma planta.

Quanto ao efeito de épocas de avaliação nas condições da medula do 3º internódio, as análises de variância revelam que não houve diferença significativa entre os tratamentos para qualquer dos dois experimentos (Tabelas 6 e 7 do Apêndice). As médias obtidas para a 1ª, 2ª e 3ª épocas foram respectivamente, 3,14; 3,16; 3,15 no primeiro experimento e 3,49; 3,58 e 3,48 no segundo.

Estes resultados mostram que durante as três épocas de avaliação não houve alteração progressiva nas condições da medula, havendo já uma grande percentagem de tecido morto na primeira época, tanto para o primeiro como para o segundo experimento. Sendo o desenvolvimento do patógeno condicionado à presença de células mortas, estes resultados indicam que o terceiro internódio não seria um bom local para inoculação visando estudo do desenvolvimento da sintomatologia interna provocada pelo patógeno, semelhantemente ao que ocorreu para o 4º internódio.

Quanto ao efeito de inoculação nas condições da medula do 3º internódio, as análises de variância mostram efeito significativo apenas para inoculação dentro do híbrido M-206, no primeiro experimento. Nos demais casos, não houve diferenças significativas para qualquer dos dois experimentos. As médias obtidas quanto às condições da medula no 3º internódio para os dois híbridos nos 2 experimentos são apresentadas a seguir, sendo os resultados do segundo experimento ilustrados na Figura 4.

Observa-se que as médias para condições da medula no 3º internódio foram relativamente elevadas, não havendo indicação de um efeito de inoculação no 1º ou no 4º internódio na percentagem de tecido morto do 3º.

Quadro 4. Condições da medula no 3º internódio condicionado à inoculação no 1º ou 4º internódio nos híbridos DG e M-206. 1º experimento

Híbridos	1º Internódio	4º Internódio	Test. c/água	Test. s/fer.
DG	3,24	3,12	3,19	3,24
M-206	3,28	2,89	3,21	3,03

Quadro 5. Condições da medula no 3º internódio condicionado à inoculação no 1º ou no 4º internódio. 2º experimento

Híbridos	1º Internódio	4º Internódio	Test.c/água	Test. s/fer.
DG	3,56	3,48	3,58	3,31
M-206	3,61	3,65	3,43	3,51

Se se comparar as condições da medula do 3º internódio com aquelas observadas no 2º para os dois híbridos, e nos dois experimentos verifica-se que no 3º internódio as médias foram mais altas, indicando maior percentagem de tecido morto no 3º internódio que no 2º. Possivelmente, a morte de células no 3º internódio ocorre rapidamente após o pendramento. Não havendo possibilidade de sofrer influência dos tratamentos feitos no 1º ou no 4º.

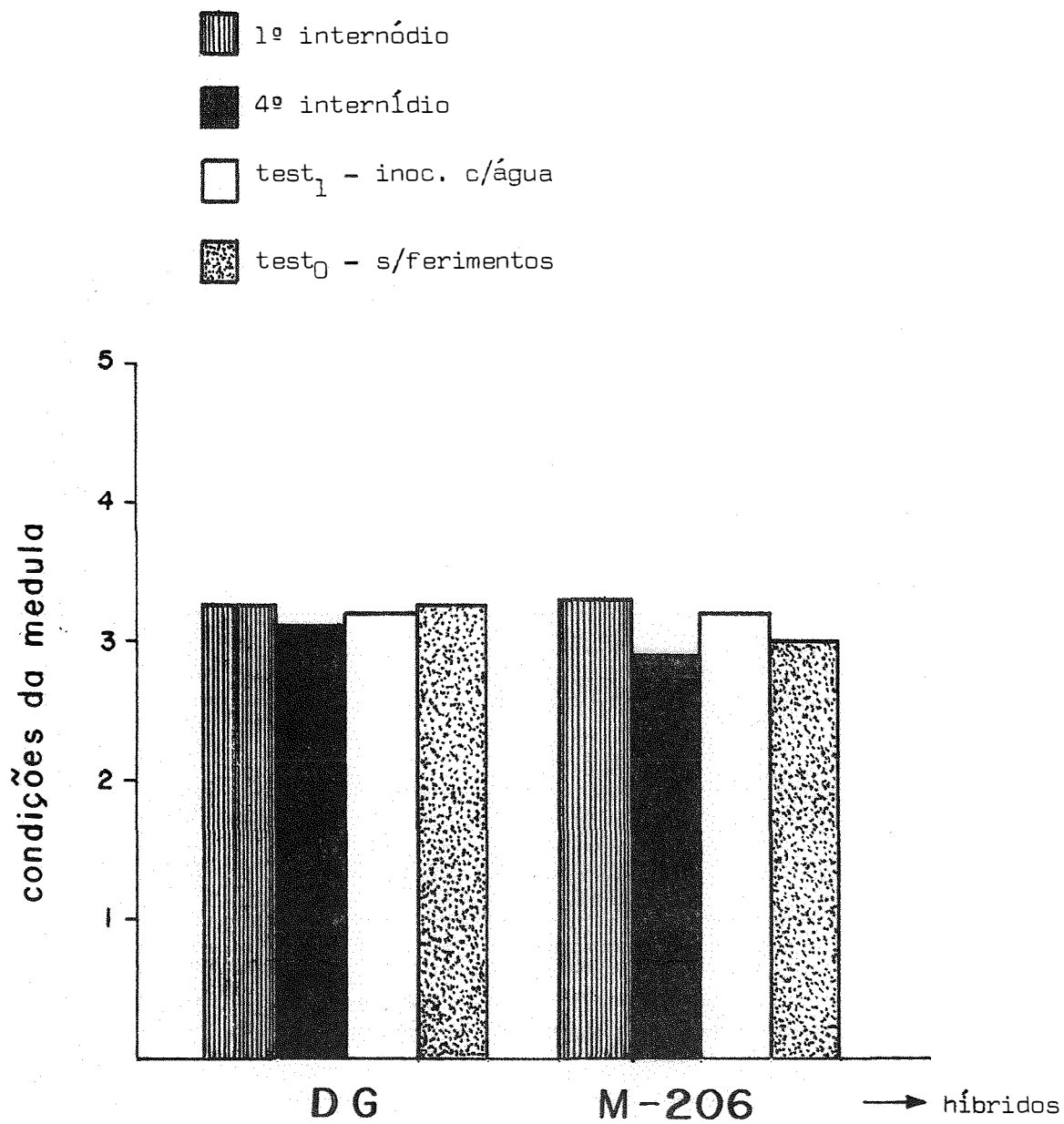


Fig. 4. Condições da medula no 3º internódio condicionado à inoculação do 1º ou 4º internódio dos híbridos DG e M-206. 1º experimento.

O estudo dos efeitos das inoculações nas condições da medula no 2º e no 3º internódios, sugerem que além do patógeno, também ferimentos podem alterar a % de tecido morto nos internódios vizinhos. Sendo Diplodia maydis um patógeno do tipo parasita facultativo, inoculações ou ferimentos, feitos em condições semelhantes às existentes durante os experimentos, podem alterar os estudos relativos ao desenvolvimento da ~~sintoma~~ sintomatologia interna, provocada por este fungo, nos internódios próximos aos ferimentos. Estas observações sugerem existirem possibilidades de que em experimentos, visando estudos de resistência, a ocorrência de injúrias provocadas por insetos ou outros agentes, tanto em internódios superiores como inferiores àqueles que estão sendo estudados, podem interferir na expressão da sintomatologia.

Uma outra possibilidade a ser estudada se refere ao fato de que uma seleção de plantas resistentes a podridões, baseada na sintomatologia interna nos internódios inferiores possa representar resistência das mesmas a podridões das raízes.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1. Os híbridos tiveram um comportamento variável quanto à expressão da sintomatologia interna, dependendo da época de plantio.
2. Para diferentes tipos de inoculação de D. maydis em colmos de milho, o efeito do período decorrido entre a inoculação e a leitura dos sintomas teve um efeito linear sobre a manifestação dos sintomas in ternos.
3. A manifestação dos sintomas internos para os diferentes tipos de inoculação variou para os diferentes híbridos testados, sendo que no caso da inoculação do 1º internódio com água, as reações quanto à sintomatologia interna foi a menor, quando comparada com os demais.
4. Conforme a época de plantio podem ocorrer interações entre a época de leitura e o tipo de inoculação utilizado.
5. A diferença de suscetibilidade entre o 1º e 4º internódios do colmo

de milho foi detectada a partir de duas semanas após a inoculação , sendo que em todas as épocas, os sintomas foram mais severos no 4º internódio.

6. A época de plantio teve efeito nas condições da medula no 2º internódio para os híbridos testados.
7. O efeito da inoculação sobre condições da medula em internódios próximos variou, sendo que inoculações feitas no 1º internódio com D. maydis e a testemunha com água não diferiram entre si, tendo no entanto estas inoculações diferido dos efeitos provocados por inoculações no 4º internódio.

7. SUMMARY

The present work was carried out under field conditions to verify the symptoms caused by Diplodia maydis (Berk.) Sacc. in the stalks of two corn hybrids one of them being of moderate resistance and the other being susceptible to breaking in the field as a result of rotting. It also evaluated the percentage of dead tissues in the second and third internodes as a result of inoculating Diplodia maydis (Berk.) Sacc. in the first and fourth internodes and the effects of inoculation site and the period of evaluation of results on the development of internal symptoms of stalk.

Both hybrids showed moderate resistance to the development of internal symptoms, the extent of reactions being influenced by the period of cropping. Differences in susceptibility between the first and fourth internodes became visible two weeks after inoculation, the symptoms being more severe in the fourth internode than in the first one.

The duration of the period between inoculation and symp -

tom evaluation had a linear effect on the intensity of the internal sym
ptoms.

The development of the internal symptoms varied for the different types of inoculation and hybrids tested. Inoculation of the first internode with pure water resulted in less symptoms than the other types of inoculation tested.

Time of planting had a significant influence in the consistency and color of the pith of the second internode. The effects of inoculation on the conditions of the pith in internodes adjacent to the inoculated ones varied too. Inoculations with D. maydis and pure water made in the first internode showed similar results, but they differed from those performed in the fourth internode.

8. LITERATURA CITADA

- ASNEY, T.S. e D.C. FOLEY, 1971. Influence of nutrition on stalk rot development of Zea mays. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 61: 1125-1129.
- AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 1973. Compendium of Corn Diseases. St. Paul, Minnesota, 64 p.
- ANDREW, R.H., 1954. Breeding for stalk rot resistance in maize. Euphytica, Wageningen, 3:43-48.
- BANZAL, R.K., 1970. A study of the factors associated with resistance to stalk rot, Diplodia zeae (Schw.) Lev. in corn (Zea mays L.). Diss. Abstr. 29:2712 in: Review of Applied Mycology, England, 49: 66.
- BeMILLER, J.N. e A.J. PAPPELIS, 1964. Relationship of glycoside content to corn stalk rot resistance. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 54:888.
- BeMILLER, J.N. e A.J. PAPPELIS, 1965a. 2-4-benzoxazin-3-one glycoside in corn. I. Relation of water-soluble, 1-butanol-soluble glycoside fraction content of pith cores and stalk rot resistance. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 55:1236-1240.
- BeMILLER, J.N. e A.J. PAPPELIS, 1965b. 2-4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one glycoside in corn. II. Isolation of 6-methoxy-2-benzoxazolinone fraction as a measure of glycoside content and tissue differences of glycoside content. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 55:1241-1243.

- BOOTHROYD, E.W. et alii, 1955. Stalk rot of corn in New York. Plant Diss. Repr., Beltsville, 39:380-381.
- CALVERT, O.H. e M.S. ZUBER, 1966. Improved technique for inoculating stalk rots in corn (Zea mays L.). Agron. Journ. Madison, 58:456.
- CALVERT, O.H. et alii, 1967. Contribution of pith tissue to stalk strength in corn. Agron. Abstr., Madison, 1967. In: Plant Breeding Abst. 39:2361. England, 1969.
- CALVERT, O.H. et alii, 1969. Effects of combining isolates of Diplodia maydis on the amount of stalk and ear rotting in corn. Agron. Abstr. 1966. In: Plant Breeding Abst. 39:2360. England, 1969.
- CAPPELLINI, R.A. 1959. A comparison of technique and sites of inoculation in field corn artificially inoculated with Gibberella zeae (Schw.) Petch. Plant Diss. Repr., Beltsville, 43:177-179.
- CLONINGER, F.D. et alii, 1970. Methods of evaluating stalk quality in corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 60:295-300.
- CRAIG, J. 1961. Physiological, chemical and morphological plant factors in Zea mays L. associated with Diplodia stalk rot reaction. Diss. Abstr. 21:1322-1323.
- CRAIG, J. e A.L. HOOKER, 1961. Relation to sugar trends and pith density to Diplodia stalk rot in dent corn. Phytopathology, St. Paul Minnesota, 51:376-382.
- DeVay, J.E. et alii, 1957. Methods of testing for diseases resistance in the corn diseases nurseries et St. Paul and comparison of 110 lines of corn for resistance to diseases important in the North Central Region. Plant Dis. Repr., Beltsville, 41:699-702.
- DICKSON, J.G. 1956. Diseases of field crops 2^a Ed. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York. 517 pp.
- DURRELL, L.W. 1922. Diplodia of corn in Iowa. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 12:29 (Abstr.).
- DURRELL, L.M., 1925. A preliminary study of fungus action as the cause of down corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 15:146-164.

- EL-ROBY, M.M. e W.A. RUSSEL, 1966. Locating genes determining resistance to Diplodia maydis in maize by using chromosomal translocation. Canad. J. Gen. Cytol. Ottawa, 8:233-240.
- FAJEMISIN, J.M. e A.L. HOOKER, 1974. Predisposition to Diplodia stalk rot in corn affected by three Helminthosporium leaf blights. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 64:1496-1499.
- FERNANDES, F.T., 1975. Avaliação de cultivares de milho (Zea mays L.) quanto à suscetibilidade a Fusarium moniliforme e Diplodia maydis após inoculação artificial dos colmos. Piracicaba, ESALQ, 66 pp (Tese MS).
- FOLEY, D.C., 1960. The response of corn to inoculation with Diplodia zeae and Gibberella zeae. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 50:146-150.
- FOLEY, D.C. e C.C. WERNHAM, 1957. The effect of fertilizers on stalk rot of corn in Pennsylvania. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 47:11-12.
- GALLI, F. et alii, 1968. Manual de Fitopatologia. São Paulo, Agronômica CERES, 640 pp.
- GROGAN, R.G. e M. BOLING, 1968. Proposed Diplodia stalk rot inoculating technique for maize. Plant Diss. Repr. Beltsville, 52:611-612.
- HELEN, J. e A.D. DICKSON, 1945. A soluble substance in corn stalks that retards growth of Diplodia zeae in culture Jour. Agr. Res. Washington, 71:89-110.
- HOFFBECK, L.J., 1963. Inheritance of resistance to Diplodia zeae, Gibberella zeae and stalk breakage in corn. Diss. Abstr., 22:2951-52, 1962. In: Review of Applied Mycology, England, 42:17.
- HOFFBECK, L.J., 1964. Relation between stalk breakage of corn and reaction to Diplodia maydis and Gibberella zeae. Crop. Sci. Madison, 4:573-575.
- HOLBERT, J.R. et alii, 1935. Some factors affecting infection with and spread of Diplodia zeae in the host tissue. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 25:1113-1114.

- HOOKER, A.L., 1956. Association of resistance to several seedling , root, stalk, and ear disease in corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 46:379-385.
- HOOKER, A.L., 1957. Factors affecting the spread of Diplodia zeae in inoculated corn stalks. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 47: 196-199.
- HUNTER, J.W. e N.E. DALBEY, 1937. A histological study of stalk-brea- king in maize. Amer. Jour. Bot., Columbus, 24:492-494.
- IVANOFF, S.S., 1934. A plant inoculator. Phytopathology, St. Paul , Minnesota, 24:74-76.
- JOSEPHSON, L.M., 1962. Effects of Potash on premature stalk dying and lodging of corn. Agron. Journ. Madison, 54:179-180.
- KAPPELMAN, A.J. e D.L. THOMPSON, 1966. Inheritance of resistance of Diplodia stalk rot in corn. Crop. Sci. Madison, 6:288-290.
- KAPPELMAN, JR. A.J. e D.L. THOMPSON, 1966. Inoculation and rating procedures for corn stalk rot in the South. Plant Diss. Repr. Ma- dison, 50:655-659.
- KAPPELMAN JR., A.J. et alii, 1965. Virulence of 20 isolates of Diplo- dia zeae as revealed by stalk rot development in corn. Crop. Sci. Madison, 5:541-543.
- KELMAN, A. org., 1967. Sourcebook of laboratory exercises in plant pa- thology. San Francisco, Freeman, 387 pp.
- KOEHLER, B., 1960. Cornstalk rots in Illinois. Illinois Agric. Exp. Sta. Bull. (Bull. 658). 90 pp.
- LITTLEFIELD, L.J. e R.D. WILCOXSON, 1962. Studies of necrotic lesions in corn stalks. Amer. Journ. Bot., 49:1072-1078.
- MACNEW, G.L., 1960. The nature, origin, and evolution of parasitism . In: Horsfall, J.G. & Oimond, A.E. 1960. Plant Pathology, New York, Academic Press. Vol. 3 pp. 19-69.

- MICHAELSON, M.E., 1957. Factors affecting development of stalk rot of corn caused by Diplodia zeae and Gibberella zeae. Phytopathology St. Paul, Minnesota, 47:499-503.
- OTTO, H.J. e H. L. HEVERET, 1956. Influence of Nitrogen and Potassium fertilization on the incidence of stalk rot of corn. Agron. Jour. Madison, 48:301-305. 1956.
- PAPPELIS, A.J., 1963a. Increased stalk rot susceptibility in corn following root and leaf injury. Phytopathology, St. Paul, Minnesota 53:624.
- PAPPELIS, A.J., 1963b. Corn stalk rot symptoms induced by root injury. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 53:624-625.
- PAPPELIS, A.J., 1970. Effect of root and leaf injury on cell death and stalk rot susceptibility in corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 60:355-357.
- PAPPELIS, A.J., 1973. Parenchyma cell death and Diplodia maydis susceptibility in stalks and ears of corn. Plant Dis. Repr. 57:308-310.
- PAPPELIS, A.J. e F.G. SMITH, 1963. Relationship of water and living cells to spread of Diplodia zeae in corn stalks. Phytopathology St. Paul, Minnesota, 53:1100-1105.
- PAPPELIS, A.J. e L.V. BOONE, 1966. Effects of soil fertility on cell death in corn stalk tissue. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 56:850-852.
- PAPPELIS, A.J. e R.A. KATSANOS, 1969. Ear removal and cell death rate in corn stalk tissue. Phytopathology, 59:129-131.
- PAPPELIS, A.J. et alii, 1973. Increases in host nuclear dry mass, nuclear area, and nucleolar area in Diplodia infected corn. Plant Diss. Repr., Madison, 57:1043-1045.
- PARADELA F^o, O., 1972. Avaliação do comportamento de populações de milho (Zea mays L.) inoculadas artificialmente com os agentes das podridões do colmo e da espiga. Piracicaba, ESALQ, 44 pp (Tese MS).
- PEREIRA, O.A.P. e W.S.P. PEREIRA, 1976. Estudo de Diplodia zeae (Schw.) Lev. e Fusarium moniliforme Sheldon em colmo de milho. Summa Phytopathologica, 3:165-171.

- RAY, R.E. et alii, 1953. Concentration and translocation of nitrogen compounds in the corn plant (Zea mays L.) during grain development. Plant Physiol., Lancaster, Pennsylvania, 28:606-621.
- ROGER, L., 1953. Physiologie Des Pays Chauds. Paris, Paul Chevalier. Tomo II. pp. 1743-1749.
- SAYERE, J.D. et alii, 1931. The effect of preventing fruiting and reducing the leaf area on the accumulation of sugars in the corn stem. J. Amer. Soc. Agron. Madison, 23:751-753.
- SEMIENIUK, G., 1942. Comparative reactions of single crosses of dent maize to Diplodia zeae. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 32:16.
- SHEAR, C.L. e N. E. STEVENS, 1936. Sphaeria zeae (Diplodia zeae) and confused species. Mycologia, New York, 27:467-477.
- SMITH, A.L. et alii, 1938. Development of a differential inoculation technique for Diplodia stalk rot of corn. Phytopathology, St. Paul Minnesota, 28:497-504.
- SUMMER, D.R., 1968. Ecology of corn stalk rot in Nebraska. Phytopathology, St. Paul, 58:755-760.
- THAYER, P. e L.E. WILLIAMS, 1960. The effects of nitrogen, phosphorus and potassium concentrations on the development of Gibberella stalk and root rot of corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 50:212-214.
- ULLSTRUP, A.J., 1943. Diseases of dent corn in the United States. U.S. Dep. of Agriculture. Circ. nº 674. 34 pp.
- VANDERWEYEN, A., 1960. Preparation en laboratoire de grandes quantités d'inoculum de Diplodia zeae. Parasitica, 16:14-15. 1960. In: Review of Applied Mycology, England, 39:571.
- VanREEN, R. e W.R. SINGLETON, 1952. Sucrose content in the stalks of maize inbreds. Agr. Jour. Madison, 44:610-614.
- WALL, R.E. e C.G. MORTIMORE, 1965. The growth pattern of corn in relation to resistance to root and stalk rot. Can. Jour. Bot. Ottawa, 43:1277-1283.

- WERNHAM, C.C., 1959. Cornstalk rot trials in Pennsylvania, 1958. Plant Diss. Repr., Madison, 43:863-870.
- WHITEHEAD, M.D., 1957. Sorghum grain, a medium suitable for the increase of inoculum for studies of soil born and certain other fungi. Phytopathology, St. Paul, 47:450.
- WHITNEY, N.Y. e C.J. MORTIMORE, 1959. An antifungal substance in the corn plant and its effect on growth of two stalk-rotting fungi. Nature, London, 183:341.
- WHITNEY, N.Y. e C.J. MORTIMORE, 1960. Isolation of the antifungal substance, 6-methoxybenzoxazolinone, from field corn (Zea mays L.) in Canada. Nature, London, 184:1320.
- WILLIAMS, L.E. e S.K. MENON, 1957. A corn borer technique of inoculating corn plants with stalk rot fungi. Plant Diss. Repr. Madison 41:111-114.
- WYSONG, D.S. e A.L. HOOKER, 1966. Relation to soluble solids content and pith conditions to Diplodia rot in corn hybrids. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 56:35.
- YOUNG, H.C., 1943. The toothpick method of inoculation for ear and stalk rots. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 33:16.
- ZUBER, M.S. et alii, 1957. Studies of the interrelation of field stalk lodging, two stalk rotting fungi and chemical composition of corn. Agron. Jour. Madison, 49:328-331.

9. APÊNDICE

Tabela 1 - Total de precipitação pluviométrica temperaturas médias e Umidade Relativa do ar dos meses, durante os quais foram conduzidos os experimentos

Ano	Mês	Total de precipitação (em mm)	Temp. °C média mensal	Umidade Rel. % média mensal
1974	Agosto	5,5	18,8	54,0
1974	Setembro	25,1	22,0	61,0
1974	Outubro	130,2	21,2	88,7
1974	Novembro	175,0	22,8	62,0
1974	Dezembro	360,8	22,4	81,3
1975	Janeiro	168,0	24,2	76,0
1975	Fevereiro	357,2	24,6	81,9
1975	Agosto	-	21,9	59,9
1975	Setembro	55,1	22,8	54,5
1975	Outubro	98,0	21,7	59,0
1975	Novembro	236,8	22,6	61,5
1975	Dezembro	315,1	24,1	77,2

Tabela 2 - Análise da variância para extensão dos sintomas internos nos internódios inoculados de dois híbridos em 3 épocas de avaliação. 1º experimento

Fontes de variação	GL.	SQ.	QM.	F
Blocos	3	0,8482	0,2827	1,35 ^{n.s.}
Híbridos	1	2,0335	2,0335	9,69*
Resíduo (a)	3	0,6293	0,2098	
Ef. Linear de Épocas	1	11,2133	11,2133	56,49**
Ef. Quadrático de Épocas	1	0,1736	0,1736	0,87 ^{n.s.}
Híbridos X Épocas	2	0,2869	0,1435	0,72 ^{n.s.}
Resíduo (b)	12	2,3817	0,1985	
Inoculação dentro da Hib. DG	2	43,4467	21,7634	180,77**
Inoculação dentro Hib. M-206	2	23,0606	11,5303	95,77**
Épocas X Inoculação	4	4,4289	1,1072	9,20**
Híbrido X Épocas X Inoculação	4	0,7039	0,1760	1,46 ^{n.s.}
Resíduo (c)	36	4,3333	0,1204	
Total	71	93,5399		
Inoculação dentro 1ª época	2	9,9775	4,9888	41,44**
Inoculação dentro 2ª época	2	21,8634	10,9317	90,79**
Inoculação dentro 3ª época	2	37,4933	18,7467	155,70**
Híbrido X Inoculação	2	1,6019	0,8010	6,65**
Híbrido X Época X Inoculação	4	0,7039	0,1760	1,46 ^{n.s.}
Resíduo (c)	36	4,3333	0,1204	

C.V. (a) = 21,28%

C.V. (b) = 20,43%

C.V. (c) = 16,15%

Tabela 3 - Análise da variância para extensão dos sintomas internos nos internódios inoculados dos dois híbridos em 3 épocas de avaliação. 2º experimento.

Fontes de variação	GL.	SQ.	QM.	F.
Blocos	3	0,3183	0,1061	0,63 ^{n.s.}
Híbridos	1	1,6200	1,6200	9,57*
Resíduo (a)	3	0,5078	0,1693	
Ef. Linear de Épocas	1	1,1408	1,1408	9,34**
Ef. Quadrático de Épocas	1	0,0011	0,0011	0,01 ^{n.s.}
Híbridos X Épocas	2	0,2725	0,1363	1,12 ^{n.s.}
Resíduo (b)	12	1,4656	0,1221	
Inoculação dentro do Híb. DG	2	86,0438	41,0219	277,36**
Inoculação dentro do Híb. M-206	2	73,4106	36,7056	248,18**
Época X Inoculação	4	0,6281	0,1570	1,06 ^{n.s.}
Híbridos x Época X Inoculação	4	0,8142	0,2036	1,38 ^{n.s.}
Resíduo (c)	36	5,3233	0,1479	
Total	71	167,5461		

C.V. (a) = 14,62%

C.V. (b) = 12,42%

C.V. (c) = 13,67%

Tabela 4 - Análise da variância para condições da medula no 2º internódio condicionada à inoculação no 1º e 4º internódios dos dois híbridos em 3 épocas de avaliação. 1º experimento.

Fontes de variação	GL.	SQ.	QM.	F.
Blocos	3	1,7428	0,5809	11,93*
Híbridos	1	6,3551	6,3551	130,45**
Resíduo (a)	3	0,1461	0,0487	
Ef. linear de épocas	1	0,4389	0,4389	3,62 ^{n.s.}
Ef. quadrático de épocas	1	1,2192	1,2192	10,04**
Híbridos X épocas	2	0,1652	0,0826	0,68 ^{n.s.}
Resíduo (b)	12	1,4567	0,1214	
Inoculação	3	13,4095	4,4698	51,66**
Híbrido X inoculação	3	0,1361	0,0454	0,52 ^{n.s.}
Época X inoculação	6	0,3977	0,0663	0,77 ^{n.s.}
Híbrido X época X inoculação	6	2,1373	0,3562	4,12**
Resíduo (c)	54	4,6719	0,0865	
Total	95	32,2765		

C.V. (a) = 10,85%

C.V. (b) = 17,13%

C.V. (c) = 14,46%

Tabela 5 - Análise da variância para condições da medula no 2º internódio condicionada à inoculação do 1º e 4º internódios dos dois híbridos em 3 épocas de avaliação. 2º experimento.

Fontes de variação	GL.	SQ.	QM.	F.
Blocos	3	0,3046	0,1015	1,20 ^{n.s.}
Híbridos	1	0,0938	0,0938	1,10 ^{n.s.}
Resíduo (a)	3	0,2546	0,0849	
Ef. linear de época/Hib. DG	1	0,0028	0,0028	0,03 ^{n.s.}
Ef. quadrático de época/Hib. DG	1	3,3375	3,3375	30,37**
Épocas dentro híbrido M-206	2	0,2680	0,1340	1,26 ^{n.s.}
Resíduo (b)	12	1,3183	0,1099	
Inoculação	3	6,2421	2,0807	25,01**
Híbrido X inoculação	3	0,1104	0,0368	0,44 ^{n.s.}
Épocas X inoculação	6	0,8198	0,1366	1,64 ^{n.s.}
Híbrido X épocas X inoculação	6	0,7352	0,1225	1,47 ^{n.s.}
Resíduo (c)	54	4,4925	0,0832	
Total	95	17,9796		

C.V. (a) = 12,59%

C.V. (b) = 14,32%

C.V. (c) = 12,46%

Tabela 6 - Análise da variância, para condições da medula no 3º internó dio condicionada à inoculação do 1º e 4º internódios, nos dois híbridos em 3 épocas de avaliação. 1º experimento.

Fontes de variação	GL.	SQ.	QM.	F.
Blocos	3	2,1671	0,7224	6,83 ^{n.s.}
Híbridos	1	0,2204	0,2204	2,09 ^{n.s.}
Resíduo (a)	3	0,3171	0,1057	
Épocas	2	0,0077	0,0039	0,04 ^{n.s.}
Híbridos X épocas	2	0,0752	0,0376	0,43 ^{n.s.}
Resíduo (b)	12	1,0471	0,0873	
Inoculação dentro híbrido DG	3	0,1100	0,0367	0,77 ^{n.s.}
Inoculação dentro Híbrido M-206	3	1,1176	0,3725	7,83**
Épocas X inoculação	6	0,2781	0,0464	0,97 ^{n.s.}
Híbridos X época X inoculação	6	0,2106	0,0351	0,74 ^{n.s.}
Resíduo (c)	54	2,5687	0,0476	
Total	95	8,1196		

C.V. (a) = 10,31%

C.V. (b) = 9,37%

C.V. (c) = 6,92%

Tabela 7 - Análise da variância para as condições da medula no 3º internódio dos dois híbridos condicionada ao efeito da inoculação no 1º e 4º internódios, em 3 épocas de avaliação. 2º experimento.

Fontes de variação	GL.	SQ.	QM.	F.
Blocos	3	0,0392	0,0131	0,07 ^{n.s.}
Híbridos	1	0,1067	0,1067	0,60 ^{n.s.}
Resíduo (a)	3	0,5308	0,1769	
Épocas	2	0,2215	0,1108	0,76 ^{n.s.}
Híbridos X épocas	2	0,1652	0,0826	0,57 ^{n.s.}
Resíduo (b)	16	1,7500	0,1458	
Inoculação	3	0,4192	0,1397	2,11 ^{n.s.}
Híbrido X inoculação	3	0,4475	0,1493	2,25 ^{n.s.}
Épocas X inoculação	6	0,1277	0,0213	0,32 ^{n.s.}
Híbridos X épocas X inoculação	6	0,0256	0,0043	0,06 ^{n.s.}
Resíduo (c)	54	3,5800	0,0663	
Total	95	7,4133	0,0780	

C.V. (a) = 11,93%

C.V. (b) = 10,82%

C.V. (c) = 7,30%

Quadro 1 - Extensão dos sintomas do colmo nas 3 épocas de avaliação .
Médias de 4 repetições. 1º experimento

Híbridos	Época de Avaliação*	Internódios		1º Test. c/água
		1º	2º	
DG	1ª	1,55	3,22	1,05
	2ª	1,75	3,62	1,12
	3ª	2,25	4,65	1,62
M-206	1ª	1,32	1,95	1,10
	2ª	1,68	3,15	1,15
	3ª	1,95	4,15	1,38

* Respectivamente a 15,22 e 29 dias após inoculação

Quadro 2 - Extensão da sintomatologia interna do colmo nas 3 épocas de avaliação. Médias de 4 repetições. 2º experimento.

Híbridos	Épocas	Internódios inoculados		
		1º	2º	1º Test c/água
DG	1ª	1,95	4,82	1,00
	2ª	2,15	4,62	1,18
	3ª	2,05	4,78	1,42
M-206	1ª	2,55	4,62	1,02
	2ª	2,50	5,08	1,32
	3ª	3,15	4,75	1,68

* Respectivamente a 15, 25 e 35 dias após inoculação.

Quadro 3 - Condições da medula - % de tecido morto nos 2º e 3º internódios nas 3 épocas de avaliação. Médias de 4 repetições - 1º experimento.

Híbridos	Época de Avaliação	Internódio inoculado	Internódio estudado	
			2º	3º
DG	1ª	1º	2,60	3,18
		4º	1,72	3,08
		Test. c/água	2,60	3,10
		Test. s/ferimento	2,45	3,45
	2ª	1º	2,30	3,32
		4º	1,62	3,18
		Test. c/água	2,38	3,28
		Test. s/ferimento	2,05	3,18
	3ª	1º	2,92	3,22
		4º	2,02	3,12
		Test. c/água	2,85	3,20
		Test. s/ferimento	1,98	3,10
M-206	1ª	1º	2,08	3,35
		4º	1,22	2,82
		Test. c/água	2,18	3,12
		Test. s/ferimento	1,40	3,02
	2ª	1º	2,30	3,28
		4º	1,28	2,90
		Test. c/água	1,88	3,22
		Test. s/ferimento	1,20	2,95
	3ª	1º	2,18	3,22
		4º	1,18	2,95
		Test. c/água	2,40	3,28
		Test. s/ferimento	2,05	3,12

Quadro 4 - Condições da medula - % de tecido morto nos 2º e 3º internódios nas 3 épocas de avaliação. Médias de 4 repetições. 2º experimento.

Híbridos	Épocas de avaliação	Internódio inoculado	Internódios estudados	
			2º	3º
DG	1ª	1º	2,48	3,55
		4º	2,02	3,45
		Test. c/água	2,32	3,50
		Test. s/ferimento	1,60	3,28
	2ª	1º	2,88	3,65
		4º	2,65	3,62
		Test. c/água	2,72	3,68
		Test. s/ferimento	2,38	3,48
	3ª	1º	2,32	3,48
		4º	1,82	3,35
		Test. c/água	2,42	3,58
		Test. s/ferimento	1,78	3,20
M-206	1ª	1º	2,50	3,65
		4º	2,38	3,60
		Test. c/água	2,35	3,38
		Test. s/ferimento	1,82	3,50
	2ª	1º	2,65	3,62
		4º	2,25	3,68
		Test. c/água	2,70	3,40
		Test. s/ferimento	2,18	3,55
	3ª	1º	2,95	3,55
		4º	1,98	3,68
		Test. c/água	2,32	3,52
		Test. s/ferimento	2,18	3,48