MÉTODOS DE INOCULAÇÃO EM MILHO COM *Colletotrichum graminicola* f.sp. *zeae* E HERANÇA DA RESISTÊNCIA

JOAQUIM REZENDE PEREIRA
Engenheiro Agrônomo - EMBRAPA

Orientador: PROF. DR. HIROSHI KIMATI

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1978

A

meus pais e irmãos,

pelo carinho e atenção constantes,

minha homenagem de gratidão.

À

minha esposa, REGINA CÉLIA,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja externar seus agradecimentos:

ao Prof. HIROSHI KIMATI, como orientador, incentivador e co-responsável pela elaboração desse trabalho;

à EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) e ao DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA da ESALQ pelas facilidades e recursos concedidos;

a SEMENTES AGROCERES S.A. e ao DEPARTAMENTO DE GENÉTICA da ESALQ, pelas sementes doadas;

ao Dr. MÁRIO BARRETO DE FIGUEIREDO, pelo envio de isolado de *Colletotrichum graminicola*;

ao Prof. CLÉLIO LIMA SALGADO, pelas sugestões e revisão dos originais;

ao colega de curso, HENRY EVEN BAJUNGU, pela versão para o Inglês do resumo;

à colega ELOCY MINUSSI, pelo apoio e estímulo;

aos colegas do Curso de Pós-Graduação, funcionários do Departamento de FITOPATOLOGIA e as demais pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização desse trabalho.

ÍNDICE

Página

1. RESUMO 1
2. INTRODUÇÃO 3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
4. MATERIAIS E MÉTODOS 12
   4.1. Inoculação em Sementes 13
   4.2. Inoculação em "Seedlings" 13
   4.3. Inoculação em Folhas 14
   4.4. Tentativas de Obtenção da Fase Perfeita de *Colletotrichum graminicola* f. sp. *zeae* 15
   4.5. Análise de Segregação 16
5. RESULTADOS 20
   5.1. Inoculação em Sementes 20
   5.2. Inoculação em "Seedlings" 21
   5.3. Inoculação em Folhas 22
   5.4. Tentativa de Obtenção da Fase Perfeita de *Colletotrichum graminicola* f. sp. *zeae* 22
   5.5. Análise de Segregação 23
6. DISCUSSÃO 26
7. CONCLUSÕES 30
8. SUMMARY 31
9. LITERATURA CITADA 33

1. RESUMO

Foram testados, em condições de casa de vegetação, 3 métodos de inoculação artificial com *Colletotrichum graminicola* de milho: em sementes, "Seedlings" e nervura foliar de plantas com 50 dias de idade.

Paralelamente pesquisou-se a possibilidade de obtenção da fase perfeita de *C. graminicola* f.sp. *zeae*.

Também analisou-se a segregação de gerações F_1 e F_2 dos híbridos AG 256, AG 259, AG 152 e AG 152 R, em confronto com os híbridos simples DG, M 206 e M 102, para determinação do tipo de herança da resistência de milho à Antracnose, observando-se concomitantemente as variedades sintéticas Centralmex e Dentado Composto autofecundados.

O isolado de *C. graminicola*, utilizado no presente trabalho, foi apatogênico em inoculação de sementes e em nervura sem ferimentos, de folhas de plantas com 50 dias de idade. Capaz de ocasionar danos em "Seedlings" de milho em condições de período prolongado de câmara úmida (48 e 60 horas), matando inclusive plantas resistentes, sem entretanto provocar sintomas em plantas adultas sem ferimentos. A resistência do híbrido DG em relação à suscetibilidade dos híbridos M 102 e M 206 pode ser evidenciada em inoculação de "Seedlings", seguida de 16 a 36 horas de câmara úmida. Evidencia-se também, nessas condições, a suscetibilidade do milho doce.

O alto grau de resistência do híbrido DG é controlado por um fator genético dominante, em relação à suscetibilidade dos híbridos M 206 e M 102.

Apesar de não formar a fase perfeita e nem infectar semen - tes, sugere-se que o isolado de *C. graminicola*, utilizado é semelhante aos que ocorrem nos EE.UU.

2. INTRODUÇÃO

Entre as doenças do milho que ocorrem no Estado de São Paulo, está a Antracnose, relatada pela primeira vez, em Campinas, por SILVEIRA, FIGUEIREDO e CRUZ (1965). Pelo que se depreende desse trabalho. sua ocorrência, segundo informações esparsas de agricultores e, por isso mesmo, carentes de confirmação, ocasionam prejuízos de até 30% na produção.

Sendo uma doença potencialmente importante para a qual existem boas fontes de resistência (KIMATI, 1975), o presente trabalho visou primordialmente o estudo da sua herança. Complementarmente, tendo-se em vista a comparação de isolados de *Colletotrichum graminicola* do Brasil com os dos Estados Unidos, foram testados métodos de inoculação em sementes, "Seedlings" e folhas, com e sem ferimentos. Ainda com o mesmo intuito foi estudado a possibilidade de obtenção do estágio ascógeno do agente patogênico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O agente patogênico de Antracnose do milho foi primeiramente descrito por Cesati na Itália, em 1852, com o nome de *Dicladium graminicolum*. Posteriormente, Wilson (1914) transferiu-o para *Colletotrichum* ao mesmo tempo que reduzia outras 10 espécies à sinonimia, com o nome de *Colletotrichum graminicolum* (Ces. Wils. ARX (1957) em sua revisão taxonômica do gênero *Colletotrichum*, adotou um conceito amplo de *C. graminicola* dentro do qual inclui a maioria das espécies de esporos falcados ocorrendo em gramíneas. Atualmente, tendo em vista a especificidade de isolados aos seus hospedeiros congeniais, a qual é acompanhada por características diferenciais adicionais há uma tendência em se considerar a existência de *formae speciales* dentro de *C. graminicola*, recebendo a do milho a denominação de *Colletotrochum graminicola* f. sp.*zeae* (MESSIAEN, LAFON e MOLOT , 1959; KIMATI, 1975).

C. graminicola f. sp. *zeae*, apesar de causar alguns surtos epidêmicos de Antracnose na Europa (BONING e WALLNER, 1936; MESSIAEN, LAFON e MOLOT, 1959; ZWILLENBERG, 1959) e na Índia (CHOWDHURY, 1936) não fora estudado, nos Estados Unidos, em meio de cultura, até por volta de 1960, quando, então, ocorreram frequentes surtos de Antracnose em certas áreas do Arkansas (DALE, 1963). Desse autor são as informações de coloração de micélio em BDA e CMA (Corn meal agar), variável conforme a temperatura, de ótimo de temperatura (28ºC) e de rica esporulação nos dois meios citados, a 24 - 36ºC, no escuro, quando meios de cultura em placas

foram inoculados com concentradas suspensões de esporos. Anteriormente, na Índia, CHOWDHURY (1936) observara pobre esporulação em meio de cultura e, na França, MESSIAEN (1957) havia relatado que a esporulação em tubos de isolamento era muito fraca, mas que era possível obter cepas até mais esporulantes do que a original a partir da transferência de esporos.

Os primeiros trabalhos de inoculação, feitos por BONING e WALLNER (1936) mostram que a severa murcha e podridão do pé, em milho, ocorrida na Alemanha, era causada por uma linhagem de *C. graminicola* capaz de reproduzir a doença inoculando-se sementes, sementes e "seedlings" e solo; além disso, foi mostrado que o fungo é passível de disseminação através de sementes infectadas, que podem apresentar sintomas de manchas ou estrias pretas na superfície. A linhagem de *C. graminicola* descrita na Índia CHOWDHURY (1936) foi constatada, em experimentos de inoculação ser capaz de afetar todas as partes da planta, porém sem apresentar especificidade para milho, de vez que várias gramíneas lhe foram suscetíveis. Com base nestes trabalhos não é possível comparar patogenicamente as linhagens da Alemanha e da Índia. Contudo, o isolado descrito mais tarde, na Holanda (ZWILLENBERG, 1959) difere do indiano, pois se mostrou específico ao milho, cujas folhas foram rápida e completamente invadidas, quando inoculadas com suspensão de esporos.

MESSIAEN e col. (1959) são de opinião que a Antracnose do milho é especificamente européia, plântulas de milho sendo muito sensíveis à inoculação por suspensão de esporos.

Parece que nem sempre há uma correlação perfeita quando se quer comparar resistência na folha com resistência pela semente. Assim, WARREN e SHEPHERD (1976) observaram que linhagens resistentes na folha, nem sempre o foram através da semente. Algumas linhagens se mostram resistentes ou suscetíveis em ambas as fases. Ficou provado a função de proteção que exerce a palha contra a penetração do fungo na semente, onde linhagens resistentes no campo (resistência na semente) se mostraram suscetíveis em testes de laboratório. As sementes em estágio de "pamonha" se mostraram muito suscetíveis, enquanto as mesmas sementes maduras e secas tiveram uma taxa de infecção muito menor.

WHITE e CHRISTINE (1976) testaram duas técnicas de inoculação em colmos de milho, com auxílio de uma seringa especial, visando uma melhor determinação de plantas resistentes e suscetíveis. A melhor técnica foi aquela que consistia em injetar uma suspensão de esporos (2×10^5 conídios/ml de suspensão) nos primeiros e segundos internódios de plantas no estágio de formação das espigas. O número de internódios descolori - dos foi maior acima do ponto de inoculação do que abaixo, o que indica que o fungo se movimenta melhor de baixo para cima. Esses autores são de opinião que lesões nas folhas precedem a podridão no colmo e que esporos produzidos na fase de infecção na folha são lavados e carreados, pene - trando logo no colmo. Três tipos de resistência têm sido descritas em sorgo: Resistência à lesão foliar, Resistência à podridão do colmo sob condições naturais (Resistência à penetração e colonização) e Resistência do colmo após a inoculação artificial (Resistência à colonização e expansão). Os dois últimos tipos podem estar presentes no milho.

WARREN e NICHOLSON (1975) relatam o efeito da infecção em sementes, sobre a emergência e o stand final da cultura de milho. De sementes, desinfestadas superficialmente com NaOCl a 1% por 3 minutos, plaqueadas em BDA ou meio de aveia e incubadas por 10 dias a 24ºC, foram observados e isolados acérvulos de *Colletotrichum* sobre todas as sementes. "Seedlings derivados de sementes infectadas tiveram um alto índice da doença e baixo peso seco. Os "Seedlings" exibem doença 7 - 14 dias após a semeadura, e os que sobrevivem por mais de 5 semanas podem se recuperar formando raízes laterais. Nesse trabalho ficou evidenciado também a possibilidade de tratamento químico das sementes com fungicidas.

WARREN (1977) descreve o efeito da estocagem a 4ºC sobre a sobrevivência de *C. graminicola* e mostra que a prevalência do fungo varia de acordo com o conteúdo de umidade da semente e a estação do ano. O agente da Antracnose do milho sobrevive na semente a 4ºC por mais de 3 anos. A viabilidade do fungo é estável em sementes infectadas natural - mente, porém é reduzido em sementes infectadas artificialmente. *Fusarium moniliforme, Aspergilus flavus* *Penicillium* spp, podem ser isolados mais frequentemente de sementes infectadas, após 24 meses. Isso sugere

que esses fungos são responsáveis pela falta de habilidade de *C. graminicola* infectar sementes. A viabilidade de *C. graminicola* diminui com o tempo de armazenamento e os conídios perdem a viabilidade em 6 semanas. O crescimento do fungo na semente supõe-se ser de estroma ou hifa embutida no endosperma. O armazenamento conduz ao decréscimo de *C. graminicola* e também outros fungos.

SMITH (1976) fez um balanço dos prejuízos na produção de grãos em plantios infectados por *C. graminicola*, em condições de campo. De modo geral as variedades menos produtivas foram as mais infectadas pela doença. Isso indica a possibilidade de redução de grãos se a linhagem suscetível for a planta-mãe na produção e formação de híbridos, onde *C. graminicola* estiver presente.

Inoculações em colmo, pelo método do palito, feitas por DALE (1963) com um isolado foliar de *C. graminicola* em 6 variedades de milho e, posteriormente, em duas, deram resultados inconclusivos, muitos dos colmos inoculados afetados pela Antracnose estando também infectado pelos organismos das podridões de *Diplodia* e *Gibberella*, o que o levou a considerar *C. graminicola* um parasita secundário. Nas inoculações foliares, por pulverização de suspensão de esporos, sem ferimento, DALE (1963) conseguiu severa infecção de "seedlings" de milho da variedade DIXIE. No mesmo ano, WILLIAMS e WILLIS (1963), trabalhando com um isolado de *C. graminicola* associado com uma podridão do colmo, em Ohio, relatou a necessidade de ferimento para infecção foliar na variedade Ohio W49, ao mesmo tempo que conseguiu severa infecção em colmos e espigas em inoculação com seringas providas de agulhas hipodérmicas. Os resultados desses trabalhos, apesar de mostrarem diferenças entre os isolados de Arkansas e Ohio, quanto à necessidade ou não de ferimento de "seedlings" para infecção, concordam quanto à especificidade do milho. Mais recentemente, WHEELER, POLITIS e PONELEIT (1974), trabalhando com 30 isolados de *C. graminicola* do milho, de 6 diferentes estados, encontrou que todos conseguiam atacar "seedlings" de milho, sem ferimento, e concluem que uma nova raça de fungo, diferente das anteriormente relatadas, está amplamente difundida nos Estados Unidos, visto que esses isolados do milho tinham capacidade de

atacar também o sorgo. Acrescente-se o fato de que algumas das linha - gens desse grupo de isolado produziam peritécios em pedaços de folhas de milho esterilizadas (POLITIS e WHEELER (1972), POLITIS (1973, 1974 e 1975) Comparações de peritécios de isolados de milho com os da cana-de-açúcar _ levaram POLITIS (1975) a descrever os do milho com uma espécie nova, *Glomerella graminicola* POLITIS, a qual difere de *Glomerella tucumanensis* da cana-de-açúcar por ter peritécios erumpentes, peritécios, ascas e ascosporos maiores e ascosporos curvos.

KIMATI (1975), trabalhando com 3 isolados de *C. graminicola* do milho, não conseguiu infecção em cana-de-açúcar nem em sorgo, usando metodologia de inoculação em nervura central da folha, com ferimento, e inóculo em gotas de suspensão de esporos. Como outros métodos de inoculação não foram usados, para fins de comparação com os isolados de *C. graminicola* alienígenas, torna-se necessário testar inoculação com suspensão de esporos em "seedlings", em presença e ausência de ferimentos. Ainda para fins comparativos pode-se pesquisar a possibilidade de formação de peritécios em folhas autoclavadas de milho como foi feito por POLITIS (1975).

No que tange a estudos feitos sobre a resistência de milho à Antracnose, existem relatos que enfocam o assunto, porém não fazem referências sobre a natureza da herança da resistência.

MESSIAEN (1957) encontrou, em 6 híbridos simples 1 híbrido duplo e 2 populações, variações em suscetibilidade da ordem de 4,6 a 59,5% de podridão do colmo, em inoculações de *C. graminicola* do milho em condições de campo, estando a suscetibilidade altamente correlacionada com a suscetibilidade ao complexo fúngico em que *Gibberella zeae* predominava. QUEBRAL (1958) constatou que de 7 variedades comerciais testadas nenhuma se mostrou resistente se bem que 2 tivessem sobrevivido. PONELEIT, POLITIS e WHEELER (1972) consideraram, do total de 21 híbridos comercialmente disponíveis, 9 moderadamente resistentes e encontraram que, em 28 linha - gens, a graduação de suscetibilidade variou de 2,3 a 4,0, numa escala de 1 a 5, várias tendo classificação abaixo de 3, com lesões restritas que não matavam as folhas.

WARREN, NICHOLSON e TURNER (1975) testaram, em condições de campo, 100 linhagens de milho previamente selecionadas em condições de casa de vegetação e concluiram que a maioria das altamente resistentes ou suscetíveis em casa de vegetação reagiram igualmente no campo, mas plantas mostrando reações intermediárias em casa de vegetação variaram em suscetibilidade, desde altamente suscetíveis a moderadamente resistentes, em condições de campo. O método de inoculação utilizado pelos últimos autores foi o de pulverização de 5 ml/planta de suspensão de conídios (2,5 x 10^5 conídios/ml) no cartucho foliar de plantas com 6 a 8 semanas de idade ou, então, quando se usou grão de sorgo, se colocou aproximadamente 0,5 g no cartucho foliar de plantas com 6 semanas de idade. O critério de resistência se baseou numa escala de 0 a 5 (0 = nenhuma infecção; 5 = plantas mortas), os números intermediários correspondendo a porcentagens de área foliar infectada total.

KIMATI (1975), utilizando método de inoculação em nervura central com uma gota de suspensão de conídios (10^6 a 10^7 conídios/ml) e imediato ferimento com uma agulha lanceolada, encontrou plantas altamente resistentes nas duas variedades sintéticas testadas, a Centralmex e a Dentado Composto, com maior frequência na primeira. Ademais constatou que os híbridos simples M 102 e M 206 são altamente suscetíveis, ao passo que o híbrido simples DG e os híbridos duplos AG 152 e AG 256,resultantes do cruzamento de DG com M 102 e M 206, respectivamente, são altamente resistentes. Sob o ponto de vista da genética da resistência a *C.graminicola* em milho nada se encontra na literatura, motivo pelo qual os últimos resultados de KIMATI (1975) são sumamente sugestivos no sentido de possibilitar uma análise genética da segregação da resistência, um dos objetivos do presente trabalho.

Os trabalhos sobre resistência à Antracnose foram feitos em diferentes épocas e locais, utilizando-se de metodologia de inoculação e avaliação diferentes. NICHOLSON e WARREN (1976) tentaram padronizar metodologia de inoculação em "seedlings", de vez que, segundo eles, nem tamanho de lesão, tamanho de área coberta, nem tempo de expressão de sintoma após inoculação representam um teste adequado para reação do hospedei-

ro. Os critérios resultantes desse trabalho se baseiam em características de lesões individuais, sob condições de casa de vegetação, tendo se definido os tipos de lesão suscetível, resistente e hipersensível. Em função do critério desenvolvido 3 isolados de *C. graminicola* de diferentes origens geográficas foram testados em 183 linhagens de milho, chegando-se a conclusão que resistência e suscetibilidade diferencial à isolados de *C. graminicola* é comum para genótipos individuais de milho e que ocorrem raças fisiológicas do patógeno.

É conhecida a influência das condições ambientais sobre o desenvolvimento das infecções de plantas. LEONARD e THOMPSON (1976) observaram que a incidência de Antracnose em milho variava de acordo com a temperatura e a idade da planta. Dispondo de 12 genótipos que foram inoculados no estágio de 4 a 5 folhas. A metodologia de inoculação consistia em uma pulverização tipo "spray" sobre os "seedlings" com uma suspensão de esporos ($2,5 \times 10^5$ esporos/ml) após o que, todas as plantas eram deixadas em câmara úmida por 16 horas a 28ºC e em seguida em câmaras ambientais com temperaturas constantes de 20, 24, 26, 28, 30 e 32ºC. A avaliação era baseada no comprimento de lesão. A temperatura que proporcionou um maior comprimento de lesão foi 30ºC. O efeito da idade da planta foi estudado com um híbrido duplo precoce, que atingia o estágio de polinização aos 33 dias e a maturação fisiológica aos 58 dias, onde foram inoculadas plantas com idades de 2 a 8 semanas, usando a metodologia anterior. Foi observado grande número de lesões sobre folhas mais velhas e baixas de plantas jovens e sobre folhas mais novas de plantas com idade entre 7 e 8 semanas. A correlação entre tamanho de lesão e posição da folha na planta, foi quase linear, com maiores lesões sobre as folhas mais velhas. Os resultados dessas investigações sugerem que a ocorrência sasonal de sintomas de Antracnose no campo, depende amplamente das alterações de suscetibilidade à medida em que as plantas se desenvolvem.

HAMMERCHMIDT e NICHOLSON (1977) demonstraram que o tamanho da lesão de Antracnose sobre linhagens resistentes e hipersensíveis a *C. graminicola* foi menor quando as plantas foram inoculadas sob altas inten-

sidades luminosas. Um acúmulo de antocianinas ao redor das lesões estava associado consistentemente com a diminuição do tamanho da lesão. Esse acúmulo de antocianinas, que são glicosídeos flavonoides e a redução associada ao tamanho de lesão, sugerem que o metabolismo fenótico está envolvido na resistência do milho à Antracnose. Posteriormente esses mesmos autores investigaram a função do metabolismo fenótico na resistência do milho a *C. graminicola* e evidenciaram que a acumulação de fenois específicos estava associado com a resposta diferencial do hospedeiro à infecção. Três compostos fenóticos, M1, M2 e M3 estavam acumulados em cada linhagem após a inoculação. Esses compostos apareceram mais cedo nas linhagens resistentes e hipersensíveis do que nas suscetíveis. A fungitoxidade desses compostos e a acumulação dos mesmos, precedendo a restrição da lesão sugere que eles desempenham alguma função na resistência do milho à Antracnose.

NICHOLSON, TURPIN e WARREN (1976) obtiveram resultados que sugerem que isolados individuais de *C. graminicola* são capazes de sintetizar (in vivo e in vitro) um número de enzimas do grupo enzimas pécticos . A atividade de Poligalacturonase, Polimetilgalacturonase, pectina liase e um baixo nível metilesterase. A influência desses enzimas ainda é obscura. Entretanto o aumento da incidência da podridão do colmo, causada por *C. graminicola*, parece ser uma função positiva dos enzimas pécticos no desenvolvimento da podridão do colmo durante todo crescimento da planta. Em tecidos de plantas suscetíveis na folha foram encontradas enzimas hidrolíticos, porém em folhas de plantas resistentes, enzimas pécticos tipo liase, foram aparentemente mais significantes na patogenicidade. Isso não só sugere diferenças na reação da planta, mas também, essas diferenças na influência da síntese de enzimas pécticos por *C. graminicola*, tanto qualitativa quanto quantitativamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Durante o desenvolvimento dos trabalhos, foram utilizados 2 isolados de *C. graminicola:* M1, reisolado do híbrido M 206 e MB, cedido pelo Dr. Mário Barreto Figueiredo. Para que se pudesse trabalhar sempre com culturas novas, eram feitos reisolamentos a partir de folhas com lesões típicas de Antracnose. De nervuras previamente desinfectadas superficialmente com algodão umidecido em álcool, eram retirados pequenos pedaços internos, com auxílio de instrumentos cortantes devidamente esterilizados, os quais eram transferidos para placas de Petri contendo BDA (Batatam 200 g; Dextrose 12 g; Ágar, 18 g; Água, 1000 ml), em presença de luz contínua. Após 48 horas pontas de hifas eram transferidas para placas contendo meio de aveia (farinha de aveia Quaker, 60 g; Ágar, 12 g: Água 1000ml) e cultivadas em condições de luz contínua em câmara ambiental Biotronett MARK III, durante 12 a 14 dias. A partir daí, todas as repicagens eram feitas, via de regra através de suspensão de esporos (10^5 a 10^6 esporos/ml) na base de 1 ml por placa, contendo em média 25 ml de meio de cultura. Normalmente se utilizou o meio de aveia para produção de inóculo, por ser o que melhor proporcionou uma boa esporulação.

4.1. Inoculação em Sementes

Foram utilizados nesse experimento 3 híbridos simples de milho e 1 variedade de milho doce: DG (resistente), M 206, M 102 (suscetíveis) e milho doce (suscetível).

100 sementes de cada híbrido ou variedade, previamente desinfectadas superficialmente com uma solução a 5% de hipoclorito de sódio comercial eram imediatamente imersas em água destilada esterilizada durante aproximadamente 20 horas (pré-germinação). Na inoculação essas sementes foram imersas numa suspensão de esporos (2,46 x 10^7 esporos/ml) por 10 minutos, antes da semeadura em vasos de alumínio, contendo terra esterilizada. Para cada híbrido ou variedade precisou-se de 20 vasos que receberam 5 sementes/vaso.

Para se poder comparar a eficiência do método outros 10 vasos foram preparados também com 5 sementes/vaso, porém sementes imersas apenas em água destilada esterilizada. A avaliação foi realizada 20 dias após a semeadura, contando-se as plantas sobreviventes e observando o sistema radicular e foliar das mesmas.

4.2. Inoculação em "Seedlings"

Esse experimento foi planejado visando observar o comportamento de *C. graminicola* em "seedlings" de milho, com diferentes períodos de exposição em câmara úmida, a título de comparação com os isolados dos Estados Unidos.

A metodologia utilizada foi a descrita por PONELEIT e WHEELER e col. (1974), que consistiu na pulverização da suspensão de esporos (10^7 esporos/ml) sobre "Seedlings", cuja idade era de 15 dias. O isolado utilizado foi o M1-M 206, cultivado em meio de aveia durante 12 dias. O critério de avaliação consistiu em enquadrar a reação dos "Seedlings" dentro de uma escala de 1 a 5, conforme PONELEIT e col. (1972 onde:

1. plantas resistentes - com minúsculos pontos cloróticos .

2. moderadamente resistentes - poucas lesões nas primeiras e segundas folhas, um pouco cloróticas.

3. moderadamente suscetíveis - lesões nas terceiras e quartas folhas, bem como nas folhas mais baixas, as lesões não coalecem, poucas folhas mortas.

4. suscetíveis - muitas lesões coalecidas, folhas baixas totalmente cloróticas e mortas.

5. altamente suscetíveis - plantas totalmente mortas.

Foram incluídas variedades e híbridos tais como: DG (resistente), M 206, M 102, milho, suscetíveis. Inicialmente, fez-se um teste preliminar com os híbridos DG, M 206, M 102, com 60 "seedlings" para cada híbrido, inoculando-os e deixando em condições de câmara úmida (cobertura com plástico escuro) durante 48 e 60 horas, para se averiguar a drasticidade desses períodos longos e uma alta concentração de esporos ($1,22 \times 10^7$ esporos/ml).

No ensaio definitivo, foram incluídos os mesmos híbridos e mais a variedade milho doce, com períodos de exposição em câmara úmida de 16, 24 e 36 horas. Para cada período e/ou variedade e híbridos se utilizou 10 vasos, contendo em média 5 "seedlings"/vaso. Como controle, apenas 3 vasos para cada variedade e/ou híbrido e período foram pulverizados com água destilada esterilizada. A avaliação foi realizada 15 dias após a inoculação.

4.3. Inoculação em Folhas

Esse experimento teve como finalidade observar o comportamento de *C. graminicola* em plantas de milho, com idade de 50 dias, na presença e ausência de ferimentos. O híbrido testado foi o M 206, bastante suscetível (KIMATI, 1975). A metodologia de inoculação foi a de gotejar $\pm$ 0,05 ml de suspensão de esporos (6×10^7 esporos/ml) no terço inferior da nervura das 3 folhas bem abertas a partir da ponta, para em seguida ,

proceder um ferimento com agulha lanceolada, em 30 plantas sendo que outras 30 não receberam ferimentos. Para facilitar as observações cada vaso tinha de 2 a 3 plantas.

4.4. Tentativas de Obtenção da Fase Perfeita de *Colletotrichum graminicola* f. sp. *zeae*.

O experimento foi realizado, tendo-se em vista a comparação de isolados de *C. graminicola* do Brasil com os dos Estados Unidos. A metodologia descrita por POLITIS (1975) e KIMATI (1975), consistiu em autoclavar secções de folhas maduras de milho em placas de Petri, forradas com papel de filtro Whatman nº 1 durante 1 hora, a 1 atmosfera. Pedaços de folhas assim autoclavados, foram colocados dentro de placas de Petri contendo 20 ml de BDA, para posterior inoculação. Foram utilizados dois tipos de inóculo: micélio e conídios individuais germinados, com dois regimes de luz: escuro contínuo e luz contínua.

No preparo de culturas monoconidiais, foi feita uma suspensão diluída de conídios a partir de uma cultura madura de *C. graminicola*. Pequeno volume (0,5 ml) dessa suspensão foi adicionado em placas de Petri com BDA, quando se esperou decorrer 6 a 10 horas para que os conídios germinassam e daí serem transferidos para os pedaços de folha de milho , com auxílio de agulha histológica. A repicagem de micélio foi feita com um furador de rolha (5 mm), colocando-se um cilindro de micélio em cada pedaço de folha superposta em BDA.

O ensaio foi esquematizado da seguinte maneira: 7 placas por tratamento e/ou isolado, num total de 63 placas.

Tratamentos

luz contínua, inoculadas com micélio do isolado M1-M 206.

luz contínua, inoculadas com conídios individuais germinados isolado M1-M 206.

luz contínua, inoculadas com micélio, isolado MB.

luz contínua, conídios individuais germinados, isolado MB.

Escuro contínuo, inoculadas com micélio do isolado M1-M 206

Escuro contínuo, conídios individuais germinados, isolado M1-M206.

Escuro contínuo, micélio do isolado MB.

Escuro contínuo, conídios individuais germinados, isolado MB.

luz contínua, mistura de esporos de M1-M 206 com esporos de MB.

As placas que permaneceram no escuro contínuo foram envolvidas com papel de alumínio. Todas as placas foram incubadas em câmara ambiental Biotronett MARK III (luz do dia - 40 W) a uma distância de 40 cm, durante 21 dias, procurando-se manter a temperatura ambiente em torno de 23ºC, conforme exigência dos isolados periteciais americanos. Após 21 dias foi feito um estudo morfológico com auxílio de lupa e microscópio esterioscópico.

4.5. Análise de Segregação

Os trabalhos foram conduzidos em condições de campo e casa-de-vegetação. Inicialmente, sementes dos híbridos duplos AG 256, AG 152, AG 259, AG 152 R, híbridos simples DG, M 206, M 102 e as variedades sintéticas Centralmex e Dentado composto, foram semeadas em condições de campo em 06/10/1976, dispensando a cultura os tratos culturais normais. Após 50 dias, tendo as plantas, altura em torno de 1,80 m, procedeu-se a inoculação, com uma suspensão de esporos ($6,86 \times 10^5$ esporos/ml). O isolado utilizado foi M1-M 206, reisolado do híbrido simples M 206 e cultivado em meio de aveia durante 12 dias.

A metodologia de inoculação foi a descrita por ABBOTT (1938) e KIMATI (1975), ligeiramente modificada pela substituição do gotejar da suspensão de esporos e após ferimento pela injeção com uma agulha hipodérmica ($\pm$ 0,05 ml) no terço inferior da nervura central das duas folhas bem abertas a partir da ponta.

O critério de avaliação foi baseado numa escala de notas 1 a 5, segundo KIMATI (1975), 14 dias após a inoculação.

Assim a nota 1 - lesão somente no local da inoculação.
2 - Lesão extensiva para a ponta.
3 - Lesão extensiva para a base até meio caminho.
4 - Lesão até a base do limbo.
5 - Lesão inclusive na bainha, tomando toda nervura.

Foram consideradas resistentes somente as plantas com nota 1 (um), para em seguida serem autofecundadas, também se autofecundou algumas plantas suscetíveis por medida de precaução. De 60 plantas inoculadas selecionou-se 5 mais resistentes e 5 mais suscetíveis, exceto para AG 152 do qual se obteve apenas 1 espiga devido à péssima germinação. O interesse maior esteve voltado para os híbridos duplos AG 256, AG 152, AG 152 R, AG 259 e o simples DG, não deixando, porém, de autofecundar e colher espigas dos demais híbridos e variedades. As espigas de plantas selecionadas foram colhidas separadamente, para ser feita a análise de segregação em condições de casa de vegetação.

A análise de segregação foi conduzida em 3 etapas distintas, para que se pudesse obter os melhores subsídios possíveis, em 3 épocas diferentes.

1a. ETAPA

Sementes de espigas colhidas de plantas autofecundadas foram semeadas, em condições de casa de vegetação, em vasos de alumínio contendo terra esterilizada, utilizando-se sementes de uma única espiga escolhida ao acaso.

Cada variedade ou híbrido foi representado por um total de 60 plantas, distribuídas em 15 vasos.

A inoculação foi feita, quando as plantas tinham a idade de

45 dias, utilizando-se da mesma metodologia praticada na fase de campo. O inóculo foi cultivado em meio de aveia, durante 11 dias, em condições de câmara ambiental Biotronett MARK III e a concentração de inóculo foi de ($8,89 \times 10^6$ esporos/ml), cujo isolado era o M1-M 206.

O ensaio foi realizado durante os meses de março e abril de 1977, ocasião em que a temperatura oscilou entre 20 e 38ºC, no interior na casa de vegetação.

A avaliação foi realizada 12 dias após a inoculação, segundo critério adotado por KIMATI (1975).

2a. ETAPA

Sementes dos híbridos AG 256, M 206 e DG, foram semeadas em vasos de alumínio em condições de casa de vegetação. Para cada híbrido constou um total de 28 plantas, distribuídas em 7 vasos. As plantas foram inoculadas aos 50 e 60 dias de idade, sendo inoculadas pela 2a vez somente as plantas resistentes na 1a inoculação.

A metodologia de inoculação consistiu em gotejar ($\pm$ 0,05 ml) de uma suspensão de esporos ($1,22 \times 10^7$ esporos/ml) no terço inferior das 3 folhas bem abertas a partir da ponta, seguido de um ferimento com agulha lanceolada, utilizando-se o isolado M1-M 206 produzido nas condições da 1a. etapa.

A avaliação foi feita aos 12 dias após a inoculação observando o critério adotado por KIMATI (1975). Esse ensaio foi conduzido durante os meses de agosto, setembro e outubro, ocasião em que ocorreu uma alta elevação de temperatura no interior da casa de vegetação (24-44ºC)

3a. ETAPA

Sementes autofecundadas dos híbridos AG 259, AG 152, AG 152 R, M 102 e DG, foram semeadas em vasos de alumínio em condições de casa

de vegetação, sendo que para cada híbrido se fez constar um total de 8 vasos, na proporção de 4-5 plantas/vaso.

As plantas foram inoculadas, aos 35 e 47 dias de idade, usando-se a mesma metodologia da 2a. etapa; o inóculo com uma concentração de ($1,33 \times 10^7$ esporos/ml), utilizando-se o isolado M1-M 206.

A avaliação foi igual a da 2a. etapa, porém feita 15 dias após a inoculação.

5. RESULTADOS

5.1. Inoculação em Sementes

A porcentagem de germinação das sementes utilizadas no ensaio, tanto para os híbridos resistentes como suscetíveis não foi afetada pela inoculação, sendo a menor porcentagem a do híbrido M 102 (83%) e a maior, a de milho doce (96%).

Além de uma emergência muito boa, os "seedlings" tiveram um desenvolvimento normal durante os 20 primeiros dias após a inoculação,não exibindo qualquer sintoma ou sinal de Antracnose, nas folhas, nem tampouco no sistema radicular.

As poucas sementes que não germinaram foram retiradas dos vasos, lavadas em água destilada, desinfectadas com solução de hipoclorito de sódio a 5% por 5 minutos e colocadas em placas de Petri com BDA, incubadas a 28ºC, durante 10 dias, sob luz contínua. Dessas sementes foram isolados fungos dos gêneros *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium*.

5.2. Inoculação em "Seedlings"

Os resultados do teste preliminar se encontram na Tabela 1.

Tabela 1. Influência do período de câmara úmida, no desenvolvimento da Antracnose do milho, inoculado na fase de "Seedlings".

Híbridos	Número de plantas com os índices de doença *									
	48 horas					60 horas				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
DG	0	0	0	16	44	0	0	0	1	59
M 206	0	0	0	4	56	0	0	0	0	60
M 102	0	0	0	2	58	0	0	0	0	60

* Escala de 1 a 5, segundo PONELEIT, POLITIS e WHEELER (1972)

Os resultados do teste definitivo podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Influência do período de câmara úmida, no desenvolvimento da Antracnose do milho, inoculado na fase de "Seedlings".

Híbridos e Variedade	Número de plantas com os índices de doença *														
	16 horas					24 horas					36 horas				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
DG	40	8	2	0	0	34	11	5	0	0	6	21	20	2	1
M 102	1	5	16	28	0	0	1	8	33	8	0	0	30	7	13
M 206	2	3	18	27	0	0	3	7	34	6	0	0	31	3	16
Milho doce	2	8	14	26	0	0	4	7	30	9	0	0	26	5	19

* Escala de 1 a 5, segundo PONELEIT, POLITIS e WHEELER (1972)

Observando-se os resultados das Tabelas 1 e 2 verifica - se que o índice de doença aumentou com o maior período de exposição em câmara úmida.

Com 48 e 60 horas, não só plantas suscetíveis mas também as consideradas resistentes sucumbiram na sua maioria à doença. Com 16 horas, ficou evidenciado o maior nível de resistência do híbrido simples DG, em relação aos demais e milho doce. As plantas não inoculadas não apresentaram qualquer sintoma de Antracnose, em nenhum dos periodos de câmara úmida.

5.3. Inoculação em Folhas

Nesse experimento, observou-se que o isolado M1-M 206 somente conseguiu infectar folhas com ferimentos. Em 30 plantas do híbrido simples M 206 (altamente suscetível), as quais não receberam ferimentos no momento da inoculação, apenas 1(uma) delas exibiu pequenas lesões cor "palea", na nervura das folhas inoculadas, porém, 29 plantas permaneceram sadias, sem sintomas de Antracnose.

As outras 30 plantas, inoculadas através de ferimentos, 28 se mostraram infectadas, chegando a alcançar notas 4 e 5 na escala de KIMATI (1975).

5.4. Tentativa de Obtenção da Fase Perfeita de *Colletotrichum graminicola* f. sp. *zeae*

Feitas observações de todas as placas com auxílio de lupa (aumento 25 vezes), não se encontrou peritécios, apesar de ter transcorrido 21 dias.

Também foram preparadas lâminas e observadas ao microscópio com aumento de 40 vezes sem entretanto conseguir encontrar 1 ascosporo , sequer. Em todas as placas, houve um ótimo crescimento micelial, inde -

pendente da presença ou ausência de luz. Foi observado uma perfeita formação de apressórios típicos de *C. graminicola* do milho. Ficou patente a importância da luz, na formação de esporos, uma vez que as placas mantidas no escuro contínuo apresentaram uma pequena concentração de esporos .

5.5. Análise de Segregação

1a. ETAPA -

Tabela 3. Reação de híbridos e variedades autofecundadas de milho ao isolado M1-M 206 de *C. graminicola* .

Híbridos e Variedades(A)	Número de plantas com índice de doença (B)					Tipo de Reação(C)		X^2	GL
	1	2	3	4	5	R	S		
DG	57	3	0	0	0	60	0		
AG 256	39	6	9	6	0	45	15	0,0	
AG 152	38	6	9	6	1	44	16	0,022 NS	1
Centralmex	20	17	10	11	2	37	23	1,42 NS	1
D. Composto	8	20	9	13	10	28	32	6,42*	1
M 206	0	4	21	25	10	4	56	-	
AG 259	33	8	16	3	0	41	19	0,35 NS	1
AG 152R	27	17	4	12	0	44	16	0,022 NS	1

NS - Não significativo para a proporção 3:1
A - Plantas autofecundadas (Observação: híbridos AG 256, AG 152 (não autofecundados) são altamente resistentes, notas 1 a 2, conforme KIMATI (1975).
B - Conforme KIMATI (1975)
C - R, plantas com notas 1 e 2; S, plantas com notas 3, 4 e 5.

2a. ETAPA

Tabela 4. Reação de 3 híbridos autofecundados de milho ao isolado M1-M 206 de *C. graminicola*.

Híbridos (A)	Número de plantas com índice de doença (B)					Tipo de Reação (C)		X^2	GL
	1	2	3	4	5	R	S		
AG 256	21	0	2	5	0	21	7	0	1
DG	28	0	0	0	0	28	0	-	-
M 206	0	0	2	2	24	0	28	-	-

(A) Plantas autofecundadas (Observação: híbrido AG 256 não autofecundado é altamente resistente, segundo KIMATI (1975)
(B) Conforme KIMATI (1975).
(C) R, plantas com notas 1 e 2; S, plantas com notas 3, 4 e 5.

3a. ETAPA -

Tabela 5. Reação de híbridos autofecundados de milho ao isolado M1-M 206 de *C. graminicola*.

Híbridos *(A)*	Número de plantas com índice de doença (B)					Tipo de Reação (C)		X^2	GL
	1	2	3	4	5	R	S		
DG	10	0	0	0	0	10	0	-	-
AG 152	17	8	5	6	0	25	11	0,14 NS	1
AG 152R	16	9	5	5	1	25	11	0,14 NS	1
AG 259	12	8	2	4	2	20	8	0,047 NS	1
M 102	0	0	0	0	6	0	6	-	-

NS - Não significativo para a proporção 3:1
A - Plantas autofecundadas (Observação: híbrido AG 152 não autofecundado é altamente resistente, KIMATI (1975).
B - Conforme KIMATI (1975)
C - R, plantas com notas 1 e 2; S, plantas com notas 3, 4, 5.

Em todas as 3 etapas a avaliação foi baseada na inoculação de 2 ou 3 folhas, prevalecendo a maior nota por planta.

Vale ressaltar que o grau de resistência manifestado pelos híbridos duplos AG 256, AG 152, AG 259, AG 152 R e pelo híbrido simples DG, por ocasião da 1a. inoculação (2a. e 3a. etapas) foi mantido na 2a. inoculação.

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste Qui-quadrado e em todas as 3 etapas vê-se que esses híbridos duplos segregaram na proporção de 3 resistentes para 1 suscetível.

6. DISCUSSÃO

WARREN e NICHOLSON (1975),ao relatarem, pela primeira vez , a ocorrência de *C. graminicola* em grãos de milho, correlacionaram, em condições de campo mas não em casa de vegetação, menor emergência de "Seedlings" com maior grau de dano provocado no pericarpo; e a maioria dos "Seedlings" provenientes de grãos bastante afetados desenvolveram sintomas de murcha. Os resultados do ensaio de inoculação em sementes,não se mostrando eficientes na manifestação sintomatológica da Antracnose do milho, concordam com os de WARREN e NICHOLSON (1975) pois foi feito em condições de casa de vegetação, em solo esterilizado; porém devem ser ressalvadas as diferenças de condições de inoculação de vez que, no presente caso, foram usadas sementes sadias contaminadas artificialmente. Melhor comparação se pode fazer com o trabalho de WILLIAMS e WILLIS (1963) que inocularam solo esterilizado e não esterilizado com inóculo de *C. graminicola*, aumentado em caule e folha triturado de alfafa, não tendo observado nenhuma redução na emergência nem em aumento de morte de "Seedlings" de milho, trigo e aveia. Por esses relatos pode-se inferir que o isolado de *C. graminicola* do presente trabalho apresenta em comum com os isolados alienígenas a característica de ser apatogênica em inoculações de sementes.

WILLIAMS e WILLIS (1963), inoculando "Seedlings" de milho , trigo e aveia, com *C. graminicola* do milho, relataram que trigo e aveia não foram afetados, porém que milho de várias idades se tornaram doentes,

sendo usualmente suscetíveis somente quando ferido. DALE (1963) relatou que "seedlings" de milho não feridos, mantidos por 48 horas em câmara úmida, após a inoculação com uma suspensão de esporos de *C. graminicola* do milho, eram facilmente afetados. WHEELER e col. (1974) concluiram que os isolados de *C. graminicola* por eles usados eram como os de DALE (1963), capazes de causar doença em "Seedlings" de milho, porém algo diferentes no espectro de hospedeiros, podendo afetar também espécies de plantas do gênero *Sorghum*. Uma análise desses três trabalhos acima mencionados mostra que não são comparáveis em igualdade de condição. O de WILLIAMS e WILLIS (1963) não especifica o período de câmara úmida, após a inoculação; o de DALE (1963) utilizou um período de 48 horas em câmara úmida, sem especificar a concentração de inóculo e o de WHEELER e col. (1974) usou 48 horas em câmara úmida, de maneira intermitente. Nesse contexto, os resultados do presente trabalho (Tabelas 1 e 2) também não podem ser comparados taxativamente porque a concentração de inóculo utilizado (10^7 esporos/ml) foi maior do que a dos relatos de WILLIAMS e WILLIS (1963) e de WHEELER e col. (1974), sem levar em consideração outras diferenças. Entretanto, como já chamava a atenção KIMATI (1975), baseado em WHEELER (1968), inoculações com período de câmara úmida muito prolongado podem ter efeito bastante drástico, aumentando, inclusive o espectro de hospedeiros de um patógeno.

A drasticidade do período em câmara úmida pode ser muito bem observada pelos dados da Tabela 1. Essa drasticidade pode ser também devido em parte ao fato de que o ambiente da câmara úmida ser bem mais escuro do que o ambiente normal da casa de vegetação, pois se sabe pelo trabalho de HAMMERSCHMIDT e NICHOLSON (1977), que plantas submetidas a condições de baixa luminosidade são mais suscetíveis do que aquelas mantidas sob alta luminosidade.

Períodos de câmara úmida mais curtos, de 16, 24 e 36 horas (Tabela 2) se mostraram bem menos drásticos, possibilitando, inclusive, também por essa metodologia de inoculação, avaliar a resistência do híbrido simples DG em confronto com a suscetibilidade dos híbridos simples M 102 e M 206, o que comprova os resultados obtidos por KIMATI (1975).

Com relação à suscetibilidade do milho doce, esse parece ser mais um relato em concordância com os de WHEELER e col. (1974).

Pelos resutados das Tabelas 1 e 2 pode-se concluir que, ressalvadas as considerações acima expostas o isolado de *C. graminicola* do milho, utilizado no presente trabalho, é semelhante aos que ocorrem nos Estados Unidos (DALE, 1963; WHEELER e col., 1974), isto é, capaz de matar "seedlings" de milho sem ferimento conquanto sejam fornecidas condições de câmara úmida prolongada. É possível que sob essas condições, também os isolados de WILLIAMS e WILLIS (1963) se comportassem semelhantemente .

Com relação à inoculação de nervuras foliares de plantas , com 50 dias de idade, o fato de aparecerem sintomas somente em folhas inoculadas com ferimentos se assemelhe ao que acontece com a podridão vermelha em cana de açúcar (ABBOTT, 1938). Também no trabalho de WILLIAMS e WILLIS (1963) há indicações de que plantas com várias idades foram usualmente afetadas somente com ferimento. No trabalho de WHEELER e col (1974) não há indicações de que plantas mais adultas do que "Seedlings" de 10-24 dias de idade foram utilizados, de modo que comparações não são possíveis.

Pelo que até aqui se discutiu, o isolado de *C. graminicola* do milho ocorrendo em nosso meio, é em muitos aspectos semelhante aos que ocorrem nos Estados Unidos. O fato de não haver formado a fase ascógena em meio de cultura, apesar de se testarem vários meios e condições de cultivo, não deve ser visto como prova contra a semelhança aos isolados utilizados por POLITIS (1975) de vez que a coexistência de linhagens ascógenas e não ascógenas é muito comum em *Colletotrichum*.

Com relação à herança da resistência à Antracnose do milho nada se encontrou na literatura pesquisada. Entretanto, em doença semelhante causada por *C. graminicola* f. sp . *sorghii* em sorgo foi demonstrado que a resistência na folha é condicionada por um fator genético dominante (LEBEAU e COLEMAN, 1950) e que a resistência à podridão vermelha do colmo é controlada por outro, estando esses genes de resistência intimamente ligados, com valor de crossing-over de 9,57% (COLEMAN e STOKES,1954)

Pelo que se conhece sobre a herança da resistência à doen - ças, de um modo geral, existem pelo menos dois tipos de resistência, aque la envolvendo um ou poucos fatores genéticos e aquela controlada por muitos gens, sendo que o primeiro tipo é o mais frequentemente citado na literatura por ser de mais fácil comprovação (ALLARD, 1960 e ROBINSON , 1973).

Enquadrar a resistência da presente pesquisa em qualquer desses tipos de herança pressupõe o estudo da segregação em progênies derivadas de híbridos e, no caso de herança monogênica, pressupõe ainda a possibilidade de classificar plantas em suscetível ou resistente (ALLARD, 1960), tarefa não muito fácil porque geralmente as reações das plantas variam num gradiente contínuo, dependente de condições ambientais. A es cala de nota adotada, de 1 a 5, conforme KIMATI (1975), procurou abranger todas reações possíveis, desde a altamente resistente de DG até a altamen te suscetível que só aparece em plantas de M 102 e M 206. O agrupamento das notas 1 e 2 em tipo de reação resistente é justificado pelo fato de serem não só lesões menores, portanto, pouco esporulantes, mas também lesões favorecidas pela facilidade de expansão para o ápice da folha devida à própria natureza da inoculação.

Os resultados encontrados no presente trabalho, adotando o acima mencionado critério de resistência e suscetibilidade preencheram os requisitos de segregação 3:1 da geração F2, em 3 oportunidades diferentes (Tabelas 3, 4 e 5) pelo que se pode sugerir que a resistência é governada por um fator genético dominante.

É digno de se notar que plantas autofecundadas dos híbridos DG, M 206 e M 102, conforme o critério de resistência adotado, não apre - sentaram segregação, comportando-se com homozigotas quanto à resistência ou suscetibilidade.

7. CONCLUSÕES

Da presente pesquisa podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. O isolado *C. graminicola* f. sp. *zeae*, ocorrendo no Brasil, é muito semelhante aos que ocorrem nos Estados Unidos, sendo:

a) Apatogênico em inoculação de sementes de milho pré-germinadas e de nervura foliar de plantas com 50 dias de idade sem ferimento .

b) Capaz de ocasionar graves danos, inclusive morte em "Seedlings" de milho, mesmo sem ferimento, conquanto sejam fornecidas condições de câmara úmida após a inoculação.

2. Inoculações de "Seedlings" de milho, seguidas por um período de câmara úmida de 48 e 60 horas, são muito drásticas, matando inclusive plantas resistentes em inoculações foliares; em períodos de câmara úmida menos prolongados (16, 24, 36 horas) os efeitos são menos drásticos, havendo possibilidade de separar híbridos resistentes de suscetíveis

3. O alto grau de resistência do híbrido DG é controlado por um fator genético dominante em relação à suscetibilidade dos híbridos M 206 e M 102.

8. SUMMARY

Three artificial methods of inoculation by *Colletotrichum graminicola* in corn were carried out in a greenhouse: inoculation was tested on seeds, seedlings and leaf veins of corn plants that were 50 days old.

Simultaneously, the possibility of obtaining the perfect phase of *C. graminicola* was tried.

Segregation of F1 and F2 generations of hybrids AG 256, AG 259 and AG 152R were analysed in comparison with common hybrids DG,M 206 and M 102 for determination of the type of inheritance of resistance in corn to Anthracnose; at the sametime self pollinated synthetic varieties Centralmex and Dentado Composto were also studied for the same purpose.

The isolate of *C. graminicola* used in the present work did not present itself as a pathogen when inoculated in seeds or in 50 days old plants when their leaf veins were not briised. The same isolate caused demages in corn seedlings that were kept for long periods of 48 and 60 hours in humid chamber including resistant ones without howe - ver, provoking symptoms in adult plants whose leaf veins were not brii - sed.

The resistance of hybrid DG in relation to the susceptibility of M 102 and M 206 may be demonstrated in inoculation of seedlings

and then keeping them in a humid chamber, for 16-36 hours. Under these same conditions, sweet corn was also found to be susceptible to this isolate.

The high degree of resistance of hybrid DG is controlled by one dominant genetic factor when considered in relation to the susceptibility of hybrids M 206 and M 102.

In spite of this isolate not being able to form a perfect phase or to infect seeds, it is suggested that the isolate of *C. graminicola* used in this work is similar to those encountered in the United States of America.

9. LITERATURA CITADA

ABBOTT, E.V. 1938. Red Rot of Sugar-Cane. U.S. Dept. Agr. Tech. Bul. 641 p.

ALLARD, R.W. 1960. Principles of Plant Breding. New York, John Wiley & Sons, Inc. 485 p.

ARX, J.A. von. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathology Z 29:413-468.

BONING, K. e F. WALLNER, 1936. Walke, Fuss Krankheit und andere Schadingungen an Vais durch *Colletotrichum graminicolum* (Ces) Wilson. Phytopathology Z 8:99-110 (Rev. Appl. Mycol. 15:494).

CHOWDHURY, S.C. 1936. A disease of *Zea mays* caused by *Colletotrichum graminicolum* (Ces) Wils. Indian J. Agric. Sci. 6:833-834 (Rev. Appl. Mycol. 15:795).

COLEMAN, H.O. e I.E. STOKES. 1954. The inheritance of resistance to Stalk Red Rot in Sorghum. Agronomy Journal. Washington 46:61-63

DALE, J.L. 1963. Corn Antracnose. Plant Dis. Reptr. 47:245-249.

HAMMERSCHMIDT, R. e R.L. NICHOLSON, 1977. Resistance of maize to Antracnose. Effect of light intensity on lesion development. Phytopathology. 67:247-250.

KIMATI, H. 1975. Taxonomia, Esporulação e Patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces) Wils (Sensu ARX, 1957) (Tese de Livre-Docência) ESALQ. Piracicaba, SP, 103 p.

LEBEAU, F.J., O.H. COLEMAN. 1950. The inheritance of resistance in Sorghum to Leaf Antracnose. Agron. Jour. 42:33-34.

LEONARD, K.J., D.L. THOMPSON. 1976. Effects of temperature and host maturity on lesion development of *C. graminicola* on Corn. Phytopathology 66:635-639.

MESSIAEN, C.M. 1957. Richesse en sucre des tiges de Mais et verse parasitaire. Rev. Path. Veg. 36(4):209-213.

MESSIAEN, C.M., R. LAFON e P. MOLOT. 1959. Necrosis de racines, parasitaire du mais. Ann. Epiphyt. 4:441-474.

NICHOLSON. R.L., H.L. WARREN. 1976. Criteria for evaluation of resistance to maize Antracnose. Phytopathology 66:86-90.

NICHOLSON, R.L., C.A. TURPIN, R.L. WARREN. 1976. Role of pectic enzymes in susceptibility of living maize pith to *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology Z 87:324-336.

POLITIS, D.J. 1973. Taxonomic relationships of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. IN: International Congress of Plant Pathology. 2. Abstracts of papers. Sess. 4,0155. Minneapolis, Univ. of Minnesota

POLITIS, D.J. 1974. Taxonomy and Pathogenicity of the fungus *C. graminicola*. Proceeding of the American Phytopathology Society 1:165 (Abstr)

POLITIS, D.J. 1975. The identity and perfect state of *C. graminicola*. Micologia 67:56-62.

POLITIS, D.J., H. WHEELER. 1972. The perfect stage of *C. graminicola*. Plant Disease Reporter. 56:1026-1027.

PONELEIT C.G., D.J. POLITIS e H. WHEELER. 1972. Resistance to Cor Antracnose. Crop Science. 12:875-876.

QUEBRAL, F.C. 1958. Antracnose of Corn. Philipp. Agric. 42:250-263.

ROBINSON, R.A. 1973. Horizontal Resistance. Rev. Pl. Path. 52:483-501

SILVEIRA, A.P., M.B. FIGUEIREDO, B.P.B. CRUZ. 1965. Ocorrência de Antracnose do milho no Estado de São Paulo. O Biológico 31:192-194.

SMITH, D.R. 1976. Yield reduction in dent corn caused by *C. graminicola*. Plant Dis. Reptr. 60:967-970

ZWILLENBERG, H.H.L. 1959. *Colletotrichum graminicola* (Ces) Wils. auf mais und verschiedenen anderen. Pflanzen. Phytopathology Z 34417-425. (Rev. Appl. Mycol. 38:474-475)

WARREN, H.L. 1977. Survival of *C. graminicola* in corn kernels. Phytopathology, 67: 160-162.

WARREN, H.L., R.L. NICHOLSON, M.T. TURNER. 1975. Field reaction of Corn inbreds to *C. graminicola*. Plant Dis. Reptr. 59:767-769.

WARREN, H.L., R.L. NICHOLSON. 1975. Kernel infection "Seedling" blight, and wilt of maize caused by *C. graminicola*. Phytopathology 65:620-623.

WARREN, H.L., P.L. SHEPHERD. 1976. Relationships of *C. graminicola* to foliar and kernel infection. Plant Dis. Reptr. 60:1084-1086.

WHEELER, B.E.J. 1968. Fungal Parasites of Plants. In the fungi. An Avanced Treatise, 3, The Fungal Population. cap. 7:179-210 (AINS - WORTH, G.C. e A.S. SUSMAN, Eds. New York, Academic Press).

WHEELERm H., D.J. POLITIS, C.G. PONELEIT. 1974. Pathogenicity host range and distribution of *C. graminicola* on Corn. Phytopathology 64: 293-296.

WHITE, D.G., H. CHRISTINE. 1976. Methods for inoculations of corn stalks with *C. graminicola*. Plant Dis. Reptr. 60:898-899.

WILSON, G.W. 1914. The identity of the Antracnose of grasses in the United States. Phytopathology 4:106-112.

WILLIAMS, L.E. e G.M. WILLIS. 1963. Disease of corn caused by *C. graminicola*. Phytopathology 53:364-365.