

REAÇÕES EM MILHO (*Zea mays*, L.) A *Helminthosporium maydis*  
Nisikado & Miyake

AURI ALAÉCIO SIMPLÍCIO

Eng.º Agr.º - EMBRAPA

Orientador: Prof. Dr. Eric Balmer

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universi-  
dade 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

Fevereiro, 1978

A

meus pais e irmãos

MEU RECONHECIMENTO.

A

meus pais e mestre

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

O autor apresenta os mais sinceros agradecimentos:

Ao Prof. ERIC BALMER, pela valiosa orientação, apoio e estímulo durante a realização e redação deste trabalho;

À EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (C.N.Pq.) e ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pelos recursos e facilidades oferecidas durante a realização deste trabalho;

Aos Professores CLÉLIO LIMA SALGADO e TÁSSO LEO KRÜGNER, pelas sugestões e revisão dos originais;

Ao Professor HIROSHI KIMATI, pelas atenções e sugestões;

À colega MARIA MENEZES, pelo estímulo e colaboração;

Ao colega JANDIR FRANCISCO FROSI, pela prestimosa colaboração durante a realização dos trabalhos;

Aos colegas GILSON SOARES DA SILVA e YODIRO MASSUDA pela dedicação na preparação das fotografias;

Ao colega GILSON SOARES DE MELO pelo apoio, estímulo e amizade;

Ao colega HENRY EVEN BAJUNGU e Sr.<sup>a</sup> MARGARET TYLLES WAGNER pela participação durante a versão do resumo para o Inglês;

À Sementes Agroceres S/A, através do Engº Agrº OSWALDO ANTONIO PINTO PEREIRA e ao Departamento de Genética da E.S.A. "Luiz de Queiroz", através do Prof. JOÃO RUBENS ZINSLY, pelas sementes concedidas;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, aos funcionários da E.S.A. "Luiz de Queiroz" e a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma na realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. RESUMO . . . . .	1
2. INTRODUÇÃO . . . . .	3
3. REVISÃO DE LITERATURA . . . . .	5
3.1. Aspectos Gerais da Doença . . . . .	5
3.2. O Patógeno . . . . .	7
3.2.1. Generalidades . . . . .	7
3.2.2. Raças Fisiológicas . . . . .	8
3.3. Reações do Hospedeiro . . . . .	9
3.3.1. Reações à Raça O . . . . .	9
3.3.2. Reações à Raça T . . . . .	11
3.3.3. Fontes de Resistência . . . . .	12
3.4. Esporulação "IN VIVO" . . . . .	12
4. MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	14
4.1. Obtenção das Plantas . . . . .	14
4.2. Os Hospedeiros . . . . .	14
4.3. Origem do Isolado e Preservação do Material Foliar Contendo o Patógeno . . . . .	15
4.4. Isolamento, Obtenção do Inóculo e Inoculação . . . . .	16
4.5. Avaliação das Reações do Hospedeiro . . . . .	18
4.6. Esporulação "IN VIVO" . . . . .	19
4.7. Morfologia dos Conídios . . . . .	20
4.8. Experimentos Realizados . . . . .	20
4.8.1. Reações de híbridos, com diferentes citoplasmas, linhagens e variedade de milho a <u>H. maydis</u> . Ex- perimento I . . . . .	20

4.8.2.	Comportamento de linhagens dos compostos A e B, selecionadas para resistência a <u>H. turcicum</u> em condições de campo, quando inoculadas com <u>H. maydis</u> . Experimento II e III .....	21
4.8.3.	Reação das progênies de seleções feitas na variedade de milho Centralmex inoculada em condições de campo com o isolado de <u>H. maydis</u> . Experimento IV .....	22
4.8.4.	Esporulação "IN VIVO" para o isolado de <u>H. maydis</u> em diferentes tipos de lesão .....	23
4.8.5.	Determinação das características morfológicas dos conídios do isolado de <u>H. maydis</u> utilizado no presente estudo .....	23
5.	RESULTADOS .....	24
5.1.	Reações de Híbridos, com Diferentes Citoplasmas, Linhagens e Variedade de Milho a <u>H. maydis</u> . Experimento I .....	24
5.2.	Comportamento de linhagens dos compostos A e B, selecionadas para resistência a <u>H. turcicum</u> em condições de campo, quando inoculadas com <u>H. maydis</u> . Experimento II e III .....	26
5.3.	Reação das Progênies de Seleções feitas na Variedade de Milho Centralmex em Condições de Campo com o Isolado de <u>H. maydis</u> .....	32
5.3.1.	Seleção de plantas resistentes e suscetíveis a <u>H. maydis</u> .....	32
5.3.2.	Reação de Progênies de Plantas Inoculadas e Seleccionadas em Condições de Campo. Experimento IV .....	32
5.4.	Esporulação "IN VIVO" para o Isolado de <u>H. maydis</u> em Diferentes Tipos de Lesão .....	36
5.5.	Determinação das Características Morfológicas dos Conídios do Isolado de <u>H. maydis</u> Utilizado no presente Estudo .....	37

	<u>Página</u>
6. DISCUSSÃO . . . . .	39
7. CONCLUSÕES . . . . .	43
8. SUMMARY . . . . .	45
9. LITERATURA CITADA . . . . .	47

## ÍNDICE DE TABELAS

	<u>Página</u>
Tabela 1 - Reações em híbridos, com diferentes citoplasmas, linhagens e variedade de milho a <u>H. maydis</u> .....	26
Tabela 2 - Reações em diferentes linhagens de milho e híbridos, com diferentes citoplasmas, a um isolado de <u>H. maydis</u> .....	27
Tabela 3 - Reações em diferentes linhagens, híbridos com diferentes citoplasmas e variedade de milho a um isolado de <u>H. maydis</u> .....	30
Tabela 4 - Teste de patogenicidade em progênies da variedade de milho Centralmex, selecionadas para resistência e suscetibilidade a um isolado de <u>H. maydis</u> .....	35
Tabela 5 - Grau de esporulação de um isolado de <u>H. maydis</u> em diferentes tipos de lesão .....	37
Tabela 6 - Comprimento e largura, em um, e septação de conídios de um isolado de <u>H. maydis</u> produzido em tecido foliar .....	38



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1 - Lesões do tipo suscetível em híbridos com citoplasmas T, C e normal induzidas por um isolado de <u>H. maydis</u> .....	25
Figura 2 - Reação de resistência e suscetibilidade nas linhas CB-2 e 929-B3 induzidas pelo isolado de <u>H. maydis</u> .....	29
Figura 3 - Reação de resistência e suscetibilidade em plantas da variedade Centralmex induzidas por um isolado de <u>H. maydis</u> .....	33
Figura 4 - Reações de resistência, moderada resistência e suscetibilidade, em progênies de plantas da variedade Centralmex, induzidas pelo isolado de <u>H. maydis</u> ....	34

## 1. RESUMO

O presente trabalho teve por finalidades: identificar um isolado de Helminthosporium maydis Nisikado e Miyake a nível de raça; determinar fontes de resistência em plantas de milho; estudar a capacidade de esporulação do patógeno "IN VIVO" e verificar os aspectos morfológicos do isolado em estudo.

A identificação do isolado a nível de raça foi realizado, baseando-se no tipo de reação induzida em híbridos com citoplasmas T, C e normal, não tendo sido observada qualquer especificidade do isolado por determinado citoplasma, sendo, portanto, o isolado identificado como pertencente à raça 0.

O estudo para determinação de fontes de resistência foi realizado em linhagens pertencentes a dois compostos de milho e na variedade Centralmex. A reação de resistência observada se caracterizou por pontos cloróticos, tipo "flecks", e pequenas lesões cloróticas necróticas, enquanto que do tipo suscetível se revelou como lesões necróticas de formato retangular limitadas pelas nervuras. Na maioria das linhagens, a reação observada variou de suscetível a moderadamente resistente, tendo sido detectado uma linhagem com alto grau de resistência. A variedade Centralmex

revelou segregação para o caráter de resistência.

No tocante à esporulação "IN VIVO" observada em diferentes tipos de lesões, foi verificado que há uma relação entre o tipo de reação induzida pelo isolado e o período requerido para esporulação sob condição de umidade elevada, constatando-se que lesões do tipo resistente apresentavam esporulação no período de 72 horas de incubação, ao passo que lesões do tipo suscetível com 48 horas de incubação nas mesmas condições já apresentavam esporulação abundante.

A determinação dos aspectos morfológicos dos conídios, com comprimento, largura, em  $\mu\text{m}$ , curvatura e septação, foi realizado em conídios obtidos mediante esporulação em tecido foliar, revelando tratar-se de um isolado de H. maydis.

## 2. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (Zea mays L.) ocupa posição de destaque entre os cereais cultivados em termos de volume de produção em todo o mundo, superado apenas pelo trigo e o arroz. O milho é cultivado em uma ampla faixa de condições climáticas, variando desde zonas tropicais até subtropicais, e nos mais diversos tipos de solos, sendo que em algumas partes do mundo é a principal fonte de alimento para os animais. Em outras partes como África e Ásia é utilizado como a principal fonte de alimento para o homem.

O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de milho, vindo em primeiro lugar os Estados Unidos. Sua importância é devida a sua ampla utilização na alimentação humana e animal, sendo consumido "in natura" e através de seus diversos derivados.

As doenças surgem como um dos fatores limitantes da cultura, ocasionando perdas qualitativas e quantitativas na produção do milho: entre estas, destaca-se a mancha da folha do milho causada por Helminthosporium maydis Nisikado & Miyake, cuja ocorrência sobre o milho ocasiona lesões sobre as folhas, afetando a sua capacidade fotosintética, além de afetar outras partes da planta.

Sendo o uso de variedades resistentes um dos métodos mais econômicos e de maior eficiência no controle de doenças de plantas, a ocorrência desta "helminthosporiose" tem despertado interesse na determinação de fontes de resistência para este patógeno.

A ocorrência de um isolado de H. maydis, incidindo em cultivares de milho motivou o presente trabalho que teve por objetivos:

- caracterização do isolado a nível de raça, segundo o tipo de reação induzida em híbridos com diferentes citoplasmas;
- determinação de fontes de resistência em milho;
- verificar o grau de esporulação "IN VIVO" sobre diversos tipos de lesões produzidas em plantas de milho pelo isolado de H. maydis.
- estudar o aspecto morfológico de conídios do isolado, obtidos em tecido foliar;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Aspectos Gerais da Doença

A "helminthosporiose" em milho (Zea mays L.), doença causada por Helminthosporium maydis Nisikado & Miyake ocorre em toda parte do mundo, principalmente em regiões onde a temperatura varia entre 20 a 32°C (American Phyt. Soc. 1973). No Brasil a doença foi constatada em novembro de 1973 (PEREIRA, 1976).

Sintomas da doença ocorrem principalmente nas folhas em forma de lesões. HOOKER et alii (1973) relatam que lesões são formadas 4 a 5 dias após a inoculação das plantas com H. maydis. Segundo ULLSTRUP (1944), essas lesões se caracterizam por apresentar uma área necrótica circundada por uma purpura.

Os estudos envolvendo H. maydis passaram a merecer maior atenção dos fitopatologistas e melhoristas de plantas a partir de 1970 após o aparecimento nos Estados Unidos de uma nova raça de H. maydis, afetando híbridos portadores de citoplasmas T, causando sérios prejuízos à cultura do milho, em virtude do cultivo em larga escala de híbridos portadores deste tipo de citoplasma.

Avaliando as perdas na produção, JOSEPHSON et alii (1971) realizaram ensaios com híbridos possuidores de citoplasmas T e normal; em um primeiro ensaio verificaram uma redução no peso de espigas dos híbridos com citoplasma T em 52 a 72% em relação aos híbridos com citoplasma normal; já em um outro ensaio conduzido paralelamente ao primeiro, a redução no peso de espigas foi em torno de 30 a 46%, ocasionando redução na produção, considerada significativa para altamente significativa. Quando comparado à produção de híbridos, resultantes da combinação de plantas com citoplasmas T e normal, em relação à produção de híbridos com citoplasmas normal, constataram que a porcentagem na redução na produção, estava diretamente relacionado com a proporção de citoplasmas T ou normal envolvidos na composição dos híbridos.

LIM et alii (1974) realizaram estudos comparativos de produção e peso de grão em milho híbrido portadores de citoplasmas T e normal em presença da raça T, tendo sido observado: a) a produção e o peso de mil grãos de híbridos com citoplasma T em campo inoculado artificialmente, foi significativamente inferior, em relação a híbridos com citoplasma normal; b) redução na produção de híbridos com citoplasma T em relação a híbridos com citoplasma normal foi em torno de 23 a 60%; c) no campo exposto a infecção natural, a produção de híbridos portadores de citoplasma T, e resistente à raça T, só apresentavam diferenças significativas quando comparado com híbridos de citoplasma normal. Por outro lado, híbridos suscetíveis apresentavam reduções significativas em torno de 43%; d) redução na produção e no peso de mil grãos em híbridos com citoplasma T, foram significativamente maiores no campo inoculado em relação ao campo não inoculado, sendo que para os híbridos com citoplasma normal não foram observadas diferenças significativas.

### 3.2. O Patógeno

#### 3.2.1. Generalidades

Helminthosporium maydis Nisikado & Miyake ou Bipolaris maydis (Nisikado) Shoemaker, foi descrito e identificado causando doença em milho em 1926 (ULLSTRUP, 1970) embora o estágio sexual Ophiobolus heterostrophus, já houvesse sido descrito por DRECHSLER (1925), posteriormente, DRECHSLER (1934) denominou-o como Cochliobolus heterostrophus. O estado heterotático da espécie foi comprovado por NELSON (1957).

De acordo com DRECHSLER (1925), conídios de H. maydis apresentam curvatura pronunciada, apresentando comprimento variável de 30 a 115  $\mu\text{m}$  e a largura variando de 10 a 17  $\mu\text{m}$ . Confirmação destes dados são encontrados no American Phyt. Soc. (1973), acrescentando que os conídios apresentam um número variável de 3 a 13 septos.

Já ULLSTRUP (1941) observou em várias coleções de isolado de H. maydis uma variação de 20 a 140  $\mu\text{m}$  no comprimento e de 7 a 22  $\mu\text{m}$  na largura dos conídios, sendo também notado uma variação de 3 a 15 no número de septos.

Segundo ULLSTRUP (1944) e LUTTRELL (1961), conídios de H. maydis medem 25 a 127  $\mu\text{m}$  de comprimento por 7 a 21  $\mu\text{m}$  de largura (tamanho médio: 89 x 15  $\mu\text{m}$ ) com um número de septos variável de 3 a 13.



### 3.2.2. Raças Fisiológicas

Devido à ocorrência da doença em 1970, trazendo prejuízos para a cultura do milho, HOOKER et alii (1970a) realizaram estudos que permitiram confirmar a existência da raça O e T de H. maydis, observando que as mesmas diferiam em vários aspectos, quais sejam: especificidade para certos citoplasmas, quantidade de patotoxina produzida, parte da planta que podem atacar, rapidez com que se reproduzem em hospedeiros suscetíveis e o ótimo de temperatura requerido.

Apesar da ocorrência de forma epidêmica e identificação da raça T serem verificadas somente em 1970, NELSON et alii (1970), trabalhando com isolados de H. maydis coletados desde 1955, e obtidos de diferentes espécies hospedeiras e área geográficas, verificaram que alguns destes isolados exibiam capacidade patogênica idênticas aquelas atribuídas aos isolados da raça T descritos em 1970.

Do mesmo modo, NELSON (1973) trabalhou com uma coleção de 165 isolados de H. maydis coletados no Brasil, Grécia, Guatemala, Inglaterra, Colombia, Costa Rica, El Salvador, África Holanda, Itália, México, Peru, Escócia, Espanha, Tailândia e Estados Unidos, no período de 1958 a 1967, e verificou que 150 desses isolados pertenciam à raça T e apenas 15 a raça O.

NELSON et alii (1973), estudando um total de 204 isolados obtidos durante o ano de 1972 em várias regiões dos Estados Unidos, verificaram que 189 (93%) desses isolados pertenciam à raça T e 15 (7%) à raça O. Estudos semelhantes foram realizados por FISHER e HOOKER (1975), que trabalhando com uma coleção de 283 isolados de H. maydis coletados em várias partes dos Estados Unidos durante o ano de 1970, constatando que a raça T estava presente em 269 (95%) desses isolados e que apenas 14 (5%) pertencem -

ciam à raça O. BLANCO et alii (1974), trabalhando com 21 isolados de H. maydis coletados em várias partes da Pensilvânia, observaram que 12 desses isolados pertenciam à raça T e 9 à raça O.

No entanto, SCHEIFELE (1971) observou numa coleção de isolados obtidos no período 1967 a 1970, nos Estados Unidos, sobre os citoplasmas T e normal, que os isolados coletados no período 1969 a 1970 nos Estados da Indiana, Kentucky, Ohio, Michigan, Wisconsin, Minnesota, Nebraska e província canadense de Ontário pertenciam à raça T, enquanto a raça O foi detectado em isolados coletados no período 1967 a 1969 nas regiões central e sudeste da Pensilvânia.

ALCORN (1975) assinala a ocorrência de Cochliobolus heterotrophus na Austrália a partir de 1972, tendo sido identificado a raça T em isolados coletados na região sul, observando ainda que ocorria uma predominância da raça O quando se mudava o cultivo de linhagens possuidora de citoplasma T para linhagens com citoplasma normal.

### 3.3. Reações do Hospedeiro

#### 3.3.1. Reações à Raça O

Estudos que antecederam ao aparecimento da raça T em 1970, realizados por CRAIG e DANIEL-KÁLIO (1968) e CRAIG e FAJEMISIN (1969) em "seedlings" de milho inoculados com isolados de H. maydis, demonstravam que reações do tipo resistente se caracterizava por pequenas lesões circulares e cloróticas, enquanto lesões do tipo suscetível eram necróticas variando de forma oval para retangular, apresentando coloração parda para castanha.

Estudando reações de plantas de milho no estágio de "seedlings" a isolados de H. maydis, baseando-se na forma do tipo de lesão, esporulação na lesão sob condição de alta umidade e reação na raiz primária na presença de uma toxina patogênica do fungo, HOOKER et alii (1970 b) verificaram que "seedlings" portadores de citoplasmas T ou P para esterilidade masculina comportavam-se como suscetíveis enquanto "seedlings" com citoplasma normal (não estéril) ou com citoplasmas S ou C para esterilidade masculina foram resistentes aos mesmos isolados.

Estudos realizados após o aparecimento da raça T em 1970 por SMITH et alii (1970), baseando-se no tipo de lesão, esporulação na lesão quando o tecido foliar foi incubado em condição de umidade elevada, observaram que "seedlings" portadores de citoplasmas T, P, S e C para esterilidade masculina apresentavam reação de resistência quando inoculados com isolados da raça O. Com relação à especificidade citoplasmática para a raça O, HOOKER et alii (1970 a), GOOD e SCHENCK (1973) e GOOD e HORNER (1974) nada observaram a esse respeito.

SMITH e HOOKER (1973) e SMITH (1975) verificaram que a resistência em plantas de milho portadoras de citoplasmas normal e T inoculadas com isolados de H. maydis raça O, se manifestava por pequenas lesões cloróticas, enquanto plantas suscetíveis exibiam lesões retangulares e necróticas. Trabalhos realizados por vários autores comprovaram que as lesões em plantas de milho formadas em resposta a H. maydis raça O, apresentam dimensões que variam de 6 x 12 mm a 19 mm, American Phyt. Soc. (1973).

### 3.3.2. Reações à Raça T

Verificando o comportamento de linhagens de milho inoculadas com isolados de H. maydis raça T, SMITH et alii (1970) e baseando-se no tipo de lesão e esporulação na lesão sob condição de alta umidade, verificaram que "seedlings" possuidores de citoplasmas T ou P apresentavam reação de suscetibilidade. HOOKER et alii (1970) e SCHEIFELE (1971) comprovaram a especificidade da raça T para o citoplasma T.

Do mesmo modo, HILTY e JOSEPHSON (1971) baseando-se no tipo de sintomas sobre plantas de milho no estágio de "seedlings", verificaram que linhagens portadoras de citoplasma T, para esterilidade masculina eram suscetível a isolados da raça T, enquanto linhagens com citoplasmas normal e J, este para esterilidade masculina, apresentavam reação de resistência semelhante quando inoculadas com isolados de H. maydis raça T.

Com relação ao comportamento de linhagens com citoplasma normal, os quais possuíam diferentes genótipos, BERGQUIST e PEVERLY (1972) observaram diferentes níveis de resistência à raça T, variando de altamente resistente para suscetíveis; retrocruzamento recorrente com linhagens possuidoras de citoplasmas S, C e El Salvador, apresentavam reações que variavam de moderadamente resistente para altamente resistente; resistente para altamente resistente e altamente resistente, respectivamente. Segundo observações citadas no American Phyt. Soc. (1973), as reações à raça T apresentam dimensões que variam de 6 a 12 mm x 6 a 27 mm.

### 3.3.3. Fontes de resistência

No tocante à natureza da resistência, HOOKER et alii (1970a) concluíram que a resistência para a raça O é de natureza genética, não tendo sido observado evidências de efeitos citoplasmáticos; enquanto a resistência à raça T é atribuída a fatores genéticos e citoplasmáticos, sendo o componente citoplasmático de fundamental importância. A maioria dos citoplasmas normais (não macho estéreis) apresenta alto grau de resistência, o mesmo ocorrendo com os citoplasmas C, S, EK, I, M, ML, MY, PS, RB, R, TA, TC, VG, J, B, D, F, G, H, W, IA, K, SD, CA, ME e L, todos citoplasmas para esterilidade masculina.

PATE e HARVEY (1954) atribuem resistência em milho a H. maydis como sendo governada por vários genes. Posteriormente, SMITH e HOOKER (1973) constataram que esta resistência em milho a raça O é condicionada por um gen recessivo rhm, sendo esta resistência expressa pelo tipo de lesão, tamanho da lesão e extensão da esporulação. SMITH (1975) constatou que o gen rhm também condicionava resistência em milho a raça T.

### 3.4. Esporulação "IN VIVO"

Trabalhos sobre a esporulação "IN VIVO" de H. maydis têm sido desenvolvidos por alguns pesquisadores. CRAIG e DANIEL-KÁLIO (1968), estudando a esporulação "IN VIVO" em segmentos de folhas de "seedlings" que apresentavam reação de resistência e de suscetibilidade, verificaram que nenhuma esporulação ocorreu sobre lesões em segmentos de folhas resistentes, após um período de 48 horas de incubação em condição de umidade e levada. A esporulação ocorreu em 19, 37 e 69% dos segmentos de folhas resistentes, respectivamente, após 68, 92 e 169 horas de incubação, sendo

que foi observada esporulação sobre 87% dos segmentos de folhas suscetíveis após 48 horas de incubação. Todos os segmentos de folhas suscetíveis apresentavam esporulação sobre a lesão após 68 horas de incubação. Os autores chegaram a conclusão que o tipo de lesão clorótica para resistência a H. maydis, tem um efeito retardador sobre a esporulação do patógeno, na lesão.

Do mesmo modo, HOOKER et alii (1970 b) e SMITH et alii (1970) verificaram que a esporulação sobre lesão suscetível individual ocorria após 24 horas de incubação em condição de alta umidade, não sendo observado esporulação em lesões de folhas resistentes durante o mesmo período. Diferenças aparentes também foram observadas no período de 48 horas, sendo que uma esporulação abundante em todas as lesões de folhas suscetíveis e resistentes foi observada no período de 120 horas.

HILTY e JOSEPHSON (1971) constataram que em plantas suscetíveis possuidoras de citoplasma T, a esporulação nas lesões foi observado após 24 horas de incubação em condições de umidade elevada. Algumas linhagens portadoras de citoplasmas normal e J, apresentando reação de resistência, também apresentaram uma esporulação do patógeno sobre as lesões neste mesmo período. Após 48 horas, todas as linhagens resistentes apresentavam uma esporulação sobre as lesões, sendo que com 96 horas a esporulação nas linhagens suscetíveis, era mais abundante que aquela observada nas linhagens resistentes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção das Plantas

Nos ensaios conduzidos em condições de casa de vegetação, foram semeadas 5 sementes de milho por vaso de alumínio, medindo 14,5 cm de diâmetro, contendo um substrato previamente esterilizado, composto de uma mistura de terra roxa, areia e esterco na proporção de 8:6:1.

No experimento de campo, as sementes de milho foram semeadas num espaçamento de 0,20 m entre plantas por 1,0 m entre fileiras.

Para os ensaios conduzidos em casa de vegetação foram feitas duas adubações com um adubo na formulação de 15 - 15 - 30, na dosagem de aproximadamente 0,7 g por vaso, sendo a primeira e a segunda aplicação feitas, respectivamente, aos 8 dias antes da inoculação e aos 5 dias após a inoculação.

### 4.2. Os Hospedeiros

Os trabalhos foram realizados com plantas de milho resultan-

tes de sementes de diferentes origens.

Para os testes visando detectar especificidade por certos citoplasmas foram utilizados os híbridos TG e TGe com citoplasma normal, e TGeme e TGme<sub>2</sub>, respectivamente, com citoplasma T e C, obtidos de sementes Agroceres S.A.

Nos testes de patogenicidade visando detectar possível fonte de resistência ao patógeno foram utilizadas as linhagens dos compostos A e B, selecionadas para resistência a Helminthosporium turcicum Pass., e a variedade de milho Centralmex, todas obtidas no Instituto de Genética da E. S.A.L.Q. As linhagens são apresentadas segundo o composto do qual originaram.

Composto A - CA-3; CA-4; CA-5; CA-6; CA-7; CA-8; CA-10; CA-11; CA-12; CA-13; CA-14; CA-15; CA-16; CA-17; CA-18; CA-20; CA-21; CA-22; CA-23; CA-24; CA-25; CA-29; CA-31; CA-33; CA-35.

Composto B - CB-1; CB-2; CB-3; CB-4; CB-5; CB-6; CB-7; CB-8; CB-9; CB-10 ; CB-12; CB-13; CB-14; CB-15; CB-17; CB-18; CB-19; CB-20; CB-21; CB-22; CB-23; CB-24; CB-25; CB-26; CB-27.

#### 4.3. Origem do Isolado e Preservação do Material Foliar Contendo o Patógeno

O isolado de H. maydis utilizado no presente estudo foi obtido de espigas de milho provenientes de Inhumas no Estado de Goiás, em agosto de 1976.

Folhas de "seedlings" da linhagem 929-B3, contendo lesões ca



racterísticas da reação de suscetibilidade, induzida através da inoculação do isolado em questão, foram coletadas, herborizadas e, em seguida, preservadas em sacos de papel numa câmara fria à temperatura entre 10 - 15°C. Folhas de linhagens altamente suscetíveis ao patógeno apresentando lesões características foram preservadas como mencionado acima e utilizadas para a recuperação do isolado em experimentos futuros.

#### 4.4. Isolamento, Obtenção do Inóculo e Inoculação

Pequenos segmentos de folhas de milho, contendo lesões causadas pelo patógeno, foram desinfetadas superficialmente durante um minuto em solução de hipoclorito de sódio, obtida mediante a diluição de uma parte da solução comercial de hipoclorito de sódio contendo 5% de cloro ativo, com três partes de água estéril. Em seguida, os segmentos foliares foram lavados em água estéril, sendo transferidos, assepticamente, para condição de câmara úmida em placas de petri que foram deixadas à temperatura ambiente em laboratório, por um período de 48 a 72 horas para indução de esporulação.

Para obtenção de culturas puras do patógeno, conídios produzidos sobre os segmentos de folhas com lesões, foram, assepticamente, transferidos, com o auxílio de uma agulha histológica, para placas de Petri contendo o meio de lactose caseína hidrolizada (MALCA e ULLSTRUP, 1962) com a seguinte composição:

Lactose .....	37,0 g
Caseína Hidrolizada Enzimática .....	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
Solução de micronutrientes .....	2 ml
Ágar .....	15,0 g
Água .....	1000 ml

As placas foram, em seguida, mantidas, durante 6 a 8 dias, à temperatura de 25 a 28°C, em condições de alternância de iluminação, com a duração de 24 horas para cada período de iluminação ou ausência de luz.

A coleta de conídios obtida de cultura pura foi feita após o desenvolvimento da colônia atingir todo o diâmetro da placa. Para isto, foram colocados aproximadamente 10 ml de água destilada sobre a cultura na placa, sendo os conídios desalojados dos conidióforos mediante o uso de um pincel de pelos finos. Obtida a suspensão de conídios passou-se a mesma por uma camada de gaze dupla, a fim de separar o micélio e fragmentos do meio de cultura da suspensão de esporos.

A padronização do inóculo foi feita através da determinação da concentração de esporos mediante o uso do hemocitômetro, tipo câmara de Neubauer, sendo a concentração de esporos em seguida calibrada para  $2,5 \times 10^4$  esporos/ml. Esta concentração foi padronizada para todos os experimentos realizados em casa de vegetação. Para fins de inoculação, foi adicionada uma gota de tween-80 a cada 100 ml de suspensão de conídios.

A inoculação, em condições de casa de vegetação, foi feita pulverizando-se a parte aérea das plantas quando estas se apresentavam no estágio de desenvolvimento correspondente a 4 ou 5 folhas verdadeiras. Após a inoculação as plantas foram colocadas em condições de umidade elevada por 16 horas à temperatura ambiente, sendo em seguida removidas para condições de casa de vegetação onde permaneceram até a leitura das reações apresentadas pelas plantas.

O inóculo, para inoculações em condições de campo, foi obtido mediante a transferência de fragmentos de meios de cultura contendo estruturas do patógeno para sementes de sorgo, previamente esterilizadas na proporção de 100 g de sementes de sorgo para 100 ml de água, e mantidas em condições de laboratório durante 6 a 8 dias.

A inoculação das plantas no campo foi feita quando estas apresentavam o estágio de desenvolvimento correspondente a 7 ou 8 folhas, colocando-se de 3 a 4 sementes de sorgo contendo as estruturas do patógeno no cartucho, sendo uma segunda inoculação realizada sete dias após a primeira inoculação.

#### 4.5. Avaliação das Reações do Hospedeiro

A avaliação para as reações da planta hospedeira em condições de casa de vegetação foi realizada 8 dias após a inoculação, através da classificação das reações segundo o tipo de lesão.

Em condições de campo a avaliação foi realizada 20 dias após a segunda inoculação.

Em ambos os experimentos foi utilizado o seguinte critério de classificação:

- |                          |   |
|--------------------------|---|
| Resistente               | - pontos cloróticos e pequenas lesões, com formato variando de redondas para elípticas, apresentando um centro necrótico com halo clorótico em torno da lesão. Presença de lesões do tipo "flecks". |
| Moderadamente Resistente | - lesões de formato circular para ovalado, com centro necrótico, podendo apresentar bordo carmim e com presença de clorose em torno da lesão. Ausência de lesões do tipo "flecks".                  |
| Suscetível               | - lesões grandes, de formato retangular, delimitadas pelas nervuras do limbo foliar, necróticas, de coloração mar-  |

rom claro para cor palha, ausência de clorose em torno da lesão, presença de lesões coalescentes e seca da extremidade das folhas.

#### 4.6. Esporulação "IN VIVO"

Segmentos de folhas de milho, contendo lesões do patógeno e resultantes dos testes de patogenicidade, foram coletadas 9 dias após a inoculação realizada em condições de casa de vegetação e transportadas em sacos de polietileno para o laboratório.

Segmentos menores de folhas, variando de 4 a 5 cm de comprimento e contendo lesões de tamanho variável, foram desinfectados superficialmente, durante um minuto em uma solução de hipoclorito de sódio, resultante da diluição de uma parte de uma solução comercial de hipoclorito de sódio contendo 5% de cloro ativo com três partes de água estéril.

Após a desinfecção do tecido foliar, foram colocados assepticamente, com o auxílio de uma agulha histológica, dois segmentos de folhas em cada placa de Petri esterilizada contendo papel de filtro umedecido, os quais foram deixados à temperatura ambiente em laboratório.

As leituras, para a avaliação do desenvolvimento do patógeno sobre as lesões e do grau de esporulação nos tecidos, foram realizadas com intervalos de 24 horas, durante 5 dias, a partir da colocação do tecido foliar em condição de câmara úmida. Os critérios adotados são apresentados a seguir:

- ( - ) - Presença apenas de micélio sobre as lesões
- ( + ) - Presença de conidióforos na lesão e tecidos adjacentes.
- ( ++ ) - Presença de conidióforos e conídios na lesão e tecidos adjacentes.
- ( +++ ) - Esporulação abundante na lesão e tecidos adjacentes.

#### 4.7. Morfologia dos Conídios

Os estudos para a determinação das características morfológicas dos conídios, foram feitos com esporos coletados em tecido foliar de milho, contendo lesões características de suscetibilidade, e mantidas em condição de umidade elevada em placas de petri, durante 72 horas à semelhança ambiente.

Foram verificados o comprimento, a largura, o formato e a septação dos conídios. Para as medições foi utilizado o micrômetro de Baush & Lomb, sendo tomadas medições em 100 conídios tomados ao acaso, representados por 10 amostras com 10 conídios cada.

#### 4.8. Experimentos Realizados

##### 4.8.1. Reações de híbridos, com diferentes citoplasmas, linhagens e variedades de milho a H. maydis. Experimento I.

Os hospedeiros testados foram os híbridos TG e TGe, ambos com citoplasma normal; TGeme, possuidor de citoplasma T, e TGme., possuidor de citoplasma C, estes dois últimos, tipos de citoplasmas para esterilidade masculina. A linhagem 929-B3 e a variedade Centralmex, respectivamente, suscetível e segregante para o caráter resistência também foram incluídas no presente teste.

Neste experimento, foram utilizadas 4 repetições, sendo semeadas 5 sementes em cada vaso, considerado como uma repetição, e que foram distribuídos de maneira inteiramente ao acaso na casa de vegetação.

O experimento foi realizado durante o mês de dezembro de

1976, com a temperatura da casa de vegetação variando entre a mínima de 22,7°C e máxima de 32,7°C, com uma temperatura média diária de 27°C, sendo esta calculada sobre três temperaturas diárias, tomadas às 9, 15 e 21 horas.

4.8.2. Comportamento de linhagens dos compostos A e B, selecionadas para resistência a H. turcicum em condições de campo, quando inoculadas com H. maydis. Experimento II e III.

No experimento II, foram usadas 15 linhagens do composto A e 15 do composto B, sendo, também, incluídos os híbridos possuidores de citoplasmas normal, T e C e a linhagem 929-B3, padrão de suscetibilidade.

No experimento III, foram utilizadas 10 outras novas linhagens do composto A e 10 do composto B, os híbridos com citoplasmas normal, T e C, a linhagem 929-B3 e a variedade de milho Centralmex.

No experimento III, foi utilizada como padrão de resistência a linhagem CB-2, selecionada no experimento II, as suas progênes CB-2-1 e CB-2-2 provenientes de autofecundação no campo, e como padrão de suscetibilidade a progênie 929-B3-1, obtida da linhagem 929-B3.

Em cada experimento, foram utilizadas 4 repetições, sendo semeadas 5 sementes por vaso, considerado como uma repetição. Os tratamentos foram distribuídos inteiramente ao acaso na casa de vegetação.

O experimento II foi conduzido durante o período de dezembro de 1976 a janeiro de 1977, com uma temperatura de casa de vegetação, mínima de 22,2°C e máxima de 33°C, com uma temperatura média diária em torno de 26,4°C.

Já o experimento III foi conduzido durante o período abril/maio de 1977, com a temperatura da casa de vegetação mínima de 21,8°C e a máxima de 33,3°C, com uma temperatura média diária em torno de 27,7°C.

4.8.3. Reação das progênies de seleções feitas na variedade de milho Centralmex inoculada em condições de campo com o isolado de H. maydis. Experimento IV.

A seleção de plantas na variedade Centralmex, em condições de campo foi realizada durante o período outubro a dezembro de 1976, período correspondente ao ano agrícola, e conduzido no campo experimental do Departamento de Fitopatologia da E.S.A. "Luiz de Queiroz".

O desbaste das plantas foi realizado deixando-se 2 plantas por cova, sendo a irrigação, pulverizações com Lorsban - 40, para controle de pragas, feitos sempre que necessário.

Em condições de campo, entre as muitas plantas, previamente inoculada com H. maydis, apresentando o caráter de resistência ou de suscetibilidade foram selecionadas e autofecundadas na variedade Centralmex 10 plantas que apresentavam reação de resistência e 2 plantas que apresentavam reação de suscetibilidade.

As sementes obtidas separadamente para as diferentes progênies foram testadas em condições de casa de vegetação, sendo utilizadas 4 repetições, semeando-se 5 sementes em cada vaso, foram incluídos nos testes os padrões de resistência e suscetibilidade, linhagem CB-2 e 929-83, respectivamente, além da variedade Centralmex.

Durante o período maio a junho de 1977, foi realizado o tes-

te das progênies de plantas selecionadas, em condições de casa de vegetação. Neste período a temperatura da casa de vegetação variava entre uma mínima de 20,7°C e máxima de 31,4°C, com a temperatura média diária de 24,9°C.

4.8.4. Esporulação "IN VIVO" para o isolado de H. maydis em diferentes tipos de lesão.

O material para este estudo foi coletado dos hospedeiros CB-2, apresentando reação de resistência; CMR-8, comportando-se como moderadamente resistente e CMS-1 e 929-B3 que apresentavam reação de suscetibilidade. Este material foi coletado do experimento IV. O estudo referente a este experimento foi realizado como descrito no item 4.6.

4.8.5. Determinação das características morfológicas dos conídios do isolado de H. maydis utilizado no presente estudo.

O material para este estudo foi coletado do teste de patogenicidade realizado no experimento II, da linhagem 929-B3, e realizado conforme descrito no item 4.7.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Reações de Híbridos, com Diferentes Citoplasmas, Linhagens e Variedade de Milho a H. maydis. Experimento I.

O tipo de reação observado nos híbridos com diferentes citoplasmas variou de moderadamente resistente para suscetível, verificando-se que o isolado não apresentou especificidade citoplasmática (Tab. 1). A linhagem 929-B3 e a variedade Centralmex, incluídas neste teste, como referimos, comportou-se como suscetível e segregante, respectivamente.

As reações de suscetibilidade, presença de lesões necróticas retangulares ou tendendo para tal, observados para os híbridos com citoplasmas T, C e normal são apresentados na Figura 1.

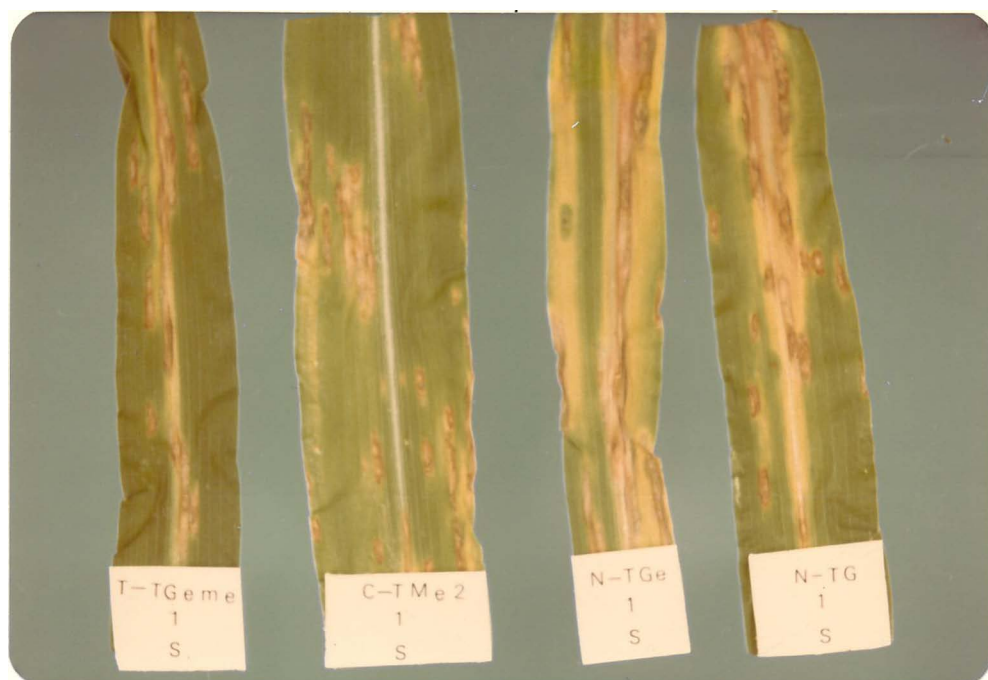


Figura 1. Lesões do tipo suscetível em híbridos com citoplasmas T, C e normal induzidas por um isolado de H. maydis.

Tabela 1. Reações em híbridos, com diferentes citoplasmas, linhagens e variedades de milho a H. maydis

Hospedeiros	Total de Plantas Testadas	Frequência de Plantas nos Diferentes Tipos de Reação %		
		Resistente	Moderadamente Resistente	Suscetível
TG	14	0,0*	28,5	71,5
TGe	14	0,0	14,2	85,8
TGeme	18	0,0	22,2	77,8
TGme <sub>2</sub>	14	0,0	14,2	85,8
929-B3	17	0,0	0,0	100,0
Centralmex	14	14,2	57,4	28,4

\* Média de 4 repetições.

5.2. Comportamento de Linhagens dos Compostos A e B, Seleccionadas para Resistência a H. turcicum em Condições de Campo, quando Inoculadas com H. maydis. Experimento II e II

Experimento II

Os resultados obtidos revelaram que o material testado, de modo geral, apresentou uma alta porcentagem de plantas suscetíveis, Tabela 2. A reação de suscetibilidade se caracterizou por lesões necróticas de formato retangular, cujo desenvolvimento era delimitado pelas nervuras das folhas.

Destacando-se das demais, a linhagem CB-2 revelou um alto grau de resistência, que se caracterizou pela presença de pontos cloróticos e pequenas lesões cloróticas necróticas com centro necrótico. As reações de resistência e suscetibilidade observadas, respectivamente, nas linhagens CB-2 e 929-B3 são apresentadas na Figura 2.

Tabela 2. Reações em diferentes linhagens de milho e híbridos, com diferentes citoplasmas, a um isolado de H. maydis.

Hospedeiros	Total de Plantas Testadas	Frequência de Plantas nos Diferentes Tipos de Reação %		
		Resistente	Moderadamente Resistente	Suscetível
CA-3	13	0,0*	0,0	100,0
CA-4	20	0,0	0,0	100,0
CA-5	13	0,0	0,0	100,0
CA-6	13	0,0	0,0	100,0
CA-7	11	0,0	9,1	90,9
CA-8	15	0,0	26,6	73,4
CA-10	12	0,0	8,3	91,7
CA-13	15	0,0	0,0	100,0
CA-14	16	0,0	0,0	100,0
CA-15	11	0,0	18,1	81,9
CA-17	15	0,0	6,6	93,4
CA-20	14	0,0	0,0	100,0
CA-23	17	0,0	0,0	100,0
CA-24	16	0,0	25,0	75,0
CA-25	16	0,0	0,0	100,0
CB-1	19	0,0	0,0	100,0

(Continua)

(Continuação)

Hospedeiros	Total de Plantas Testadas	Frequência de Plantas nos Diferentes Tipos de Reação %		
		Resistente	Moderadamente Resistente	Suscetível
CB-2	16	100,00*	0,0	0,0
CB-6	17	0,0	0,0	100,0
CB-7	16	0,0	0,0	100,0
CB-8	15	46,6	13,3	40,1
CB-9	13	0,0	0,0	100,0
CB-12	19	0,0	5,2	94,8
CB-13	15	0,0	0,0	100,0
CB-17	13	0,0	7,6	92,4
CB-18	17	0,0	0,0	100,0
CB-19	17	0,0	20,0	80,0
CB-20	16	0,0	31,2	68,8
CB-21	16	0,0	0,0	100,0
CB-22	19	0,0	52,6	47,4
CB-23	18	11,1	16,7	72,2
929-B3	14	0,0	0,0	100,0
TG	19	0,0	5,2	94,8
TGe	15	0,0	0,0	100,0
TGeme	12	0,0	8,3	91,7
TGme2	20	0,0	0,0	100,0

\* Média de 4 repetições.

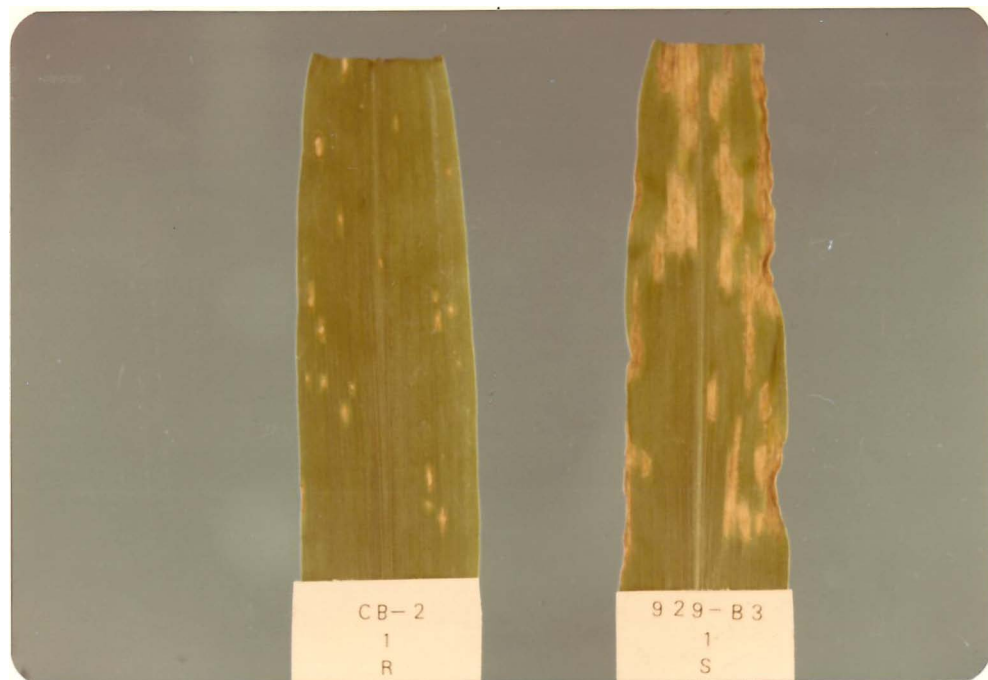


Figura 2. Reação de resistência e suscetibilidade nas linhagens CB-2 e 929-B3 induzida pelo isolado de H. maydis.

Experimento III

As linhagens testadas apresentaram diferentes tipos de reações ao isolado de H. maydis, Tabela 3. A maioria das linhagens revelou-se como suscetível, sendo que em algumas foi detectado o tipo de reação moderadamente resistente além da reação de suscetibilidade. A linhagem CB-3 segregou de resistente para suscetível e a linhagem CB-24 comportou-se como moderadamente resistente. A linhagem CB-2 e as suas progênes CB-2-1 e CB-2-2 revelaram um alto grau de resistência. A linhagem 929-B3 revelou um alto grau de suscetibilidade, tendo sido observado o mesmo tipo de reação para as plantas de sua progênie 929-B3-1. A variedade Centralmex apresentou reação semelhante a que ocorreu no primeiro experimento, segregando para o caráter resistência. Os híbridos revelaram-se suscetíveis, enquanto que os padrões para resistência e suscetibilidade, respectivamente, as linhagens CB-2 e 929-B3 apresentaram reações semelhantes àquelas observadas nos experimentos anteriores.

Tabela 3. Reações em diferentes linhagens, híbridos com diferentes citoplasmas e variedades de milho a um isolado de H. maydis.

Hospedeiros	Total de Plantas	Frequência de Plantas nos Diferentes Tipos de Reação %		
		Resistente	Moderadamente Resistente	Suscetível
CA-11	17	0,0*	0,0	100,0
CA-12	15	0,0	0,0	100,0
CA-16	16	0,0	0,0	100,0
CA-18	17	0,0	0,0	100,0

(continua)

(continuação)

Hospedeiros	Total de Plantas Testadas	Frequência de Plantas nos Diferentes Tipos de Reação %		
		Resistente	Moderadamente Resistente	Suscetível
CA-21	13	0,0	0,0	100,0
CA-22	20	0,0	0,0	100,0
CA-29	13	0,0	0,0	100,0
CA-31	16	0,0	0,0	100,0
CA-33	13	0,0	0,0	100,0
CA-35	18	0,0	0,0	100,0
CB-2	17	100,0	0,0	0,0
CB-2-1	20	100,0	0,0	0,0
CB-2-2	19	100,0	0,0	0,0
CB-3	16	6,2	25,0	68,8
CB-4	17	0,0	0,0	100,0
CB-5	18	0,0	44,4	56,6
CB-10	16	0,0	0,0	100,0
CB-14	17	0,0	0,0	100,0
CB-15	15	0,0	0,0	100,0
CB-24	18	0,0	100,0	0,0
CB-25	19	0,0	0,0	100,0
CB-26	19	0,0	10,5	89,5
CB-27	17	0,0	0,0	100,0
929-B3	16	0,0	0,0	100,0
929-B3-1	20	0,0	0,0	100,0
TG	20	0,0	0,0	100,0
TGe	19	0,0	0,0	100,0
TGeme	17	0,0	0,0	100,0
TGme <sub>2</sub>	19	0,0	0,0	100,0
Centralmex	18	16,6	55,5	29,9

\* Média de 4 repetições.



### 5.3. Reação das Progenies de Seleções Feitas na Variedade de Milho Centralmex Inoculada em Condições de Campo com o Isolado de *H. maydis*

#### 5.3.1. Seleção de plantas resistentes e suscetíveis a *H. maydis*.

De 100 plantas de milho da variedade Centralmex, na qual a maioria se comportou como resistente, foram selecionadas 10 plantas resistentes e 2 suscetíveis que foram autofecundadas e as sementes colhidas para teste em condições de casa de vegetação.

As reações de resistência e suscetibilidade observadas em plantas da variedade Centralmex quando inoculadas em condições de campo são apresentadas na Figura 3.

#### 5.3.2. Reação de progenies de plantas inoculadas e selecionadas em condições de campo. Experimento IV

As progenies de plantas selecionadas em condições de campo foram testadas em condições de casa de vegetação para a sua reação a *H. maydis*. Das 3 progenies obtidas de plantas selecionadas como resistentes em condições de campo, seis revelaram-se como segregando para as reações resistente e moderadamente resistente, uma progênie revelou-se moderadamente resistente e três segregaram para os tipos de reações moderadamente resistente e suscetível (Tabela 4).

As reações de resistência, moderadamente resistente e suscetível observadas, respectivamente, em plantas das progenies CMR-7, CMR-8 e CMS-1, são apresentadas na Figura 4.

Das duas progenies obtidas de plantas selecionadas para sus-



Figura 3. Reação de resistência e suscetibilidade em plantas da variedade Centralmex induzidas por um isolado de H. maydis.

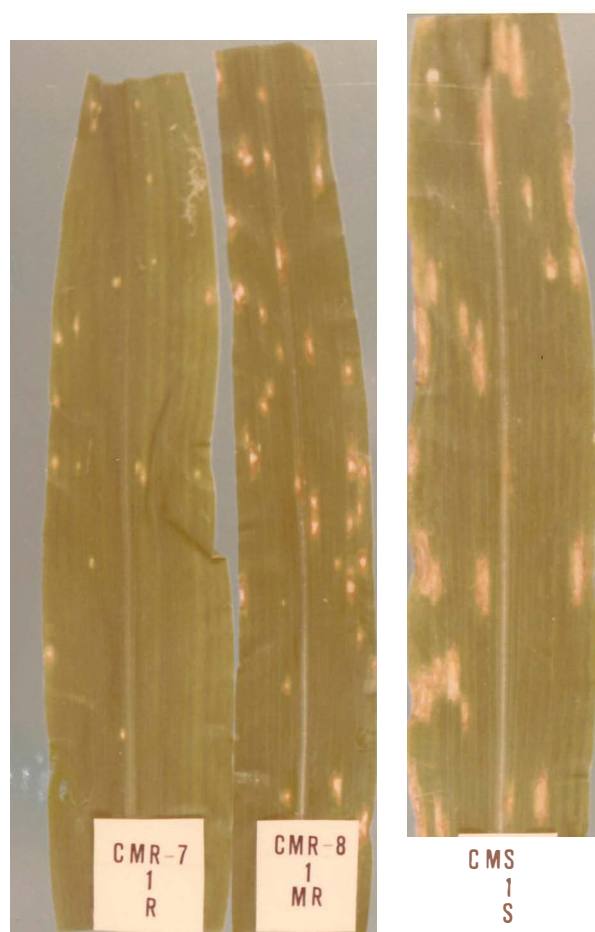


Figura 4. Reações de resistência, moderada resistência e suscetibilidade, em progênies de plantas da variedade Centralmex, induzidas pelo isolado de H. maydis.

ctibilidade, uma revelou-se moderadamente resistente, enquanto que a outra como suscetível.

Os padrões para resistência e suscetibilidade, respectivamente, CB-2 e 929-B3, comportaram-se como nos experimentos anteriores, mantendo as suas características.

Tabela 4. Teste de patogenicidade em progênies da variedade de milho Centralmex, selecionadas para resistência e suscetibilidade a um isolado de H. maydis.

Hospedeiros	Total de Plantas Testadas	Frequência de Plantas nos Diferentes Tipos de Reação %		
		Resistente	Moderadamente Resistente	Suscetível
CMR-1	20	0,0*	40,0	60,0
CMR-2	18	0,0	38,8	61,2
CMR-3	18	38,8	61,2	0,0
CMR-4	13	0,0	100,0	0,0
CMR-5	15	66,6	33,4	0,0
CMR-6	16	23,5	76,5	0,0
CMR-7	14	71,4	28,6	0,0
CMR-8	15	26,6	73,4	0,0
CMR-9	16	40,0	60,0	0,0
CMR-10	19	0,0	68,4	31,6
CMS-1	13	0,0	0,0	100,0
CMS-2	15	0,0	100,0	0,0
929-B3	17	0,0	0,0	100,0

(continua)

(continuação)

Hospedeiros	Total de Plantas Testadas	Frequência de Plantas nos Diferentes Tipos de Reação %		
		Resistente	Moderadamente Resistente	Suscetível
Centralmex	15	20,0	60,0	20,0
CB-2	19	100,0	0,0	0,0

\* Média de 4 repetições

#### 5.4. Esporulação "IN VIVO" para o Isolado de H. maydis em Diferentes Tipos de Lesão

Os resultados obtidos revelaram que o tipo de lesão tem influência sobre a esporulação do patógeno no tecido foliar em câmara úmida Tabela 5. No período de 24 horas, o comportamento foi uniforme para os três tipos de reações observadas. Após 48 horas, as lesões do tipo resistente e moderadamente resistente apresentavam apenas conidióforos sobre a lesão e tecido adjacente, sendo detectado esporulação no período de 72 horas. E para a reação do tipo suscetível a esporulação na lesão e tecido adjacente foi observado já no período de 48 horas, tornando-se intensa com 72 horas de incubação; para observações feitas com 96 horas após incubação, a esporulação foi idêntica para todos os tipos de lesão.

Tabela 5. Grau de esporulação de um isolado de H. maydis em diferentes tipos de lesão.

Hospedeiros	Tipos de lesões examinadas	Esporulação em lesão e período de incubação (h)				
		24	48	72	96	120
CB-2	Resistente	-	+	++	+++	+++
CMR-8	Moderadamente Resistente	-	+	++	+++	+++
CMS-1	Suscetível	-	++	+++	+++	+++
929-B3	Suscetível	-	++	+++	+++	+++

- Apenas presença de micélio sobre a lesão
- + Presença de conidióforos na lesão e tecido adjacente
- ++ Presença de conidióforos e conídios na lesão e tecido adjacente.
- +++ Esporulação abundante na lesão e tecido adjacente.

#### 5.5. Determinação das Características Morfológicas dos Conídios do Isolado de H. maydis Utilizado no Presente Estudo

Os dados obtidos revelaram uma variação no comprimento de 60,63 a 112,66  $\mu\text{m}$  e de 9,03 a 18,06  $\mu\text{m}$  na largura dos conídios (tamanho médio: 89,77x13,23  $\mu\text{m}$ ). O número de septos variou de 5 a 10, sendo a média de 8,03 (Tabela 6).

Dos 100 conídios observados, 85 apresentavam curvatura pronunciada, enquanto que outros 15 apresentavam uma forma reta.

Tabela 6. Comprimento e largura, em  $\mu\text{m}$ , e septação de conídios de um isolado de H. maydis produzidos em tecido foliar.

Amostra	Varição do comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Média	Varição da largura ( $\mu\text{m}$ )	Média	Varição no nº de septos	Média
1 <sup>a</sup> /	74,82-111,37	85,87	9,03-16,77	12,51	5-10	8,2
2	64,93-104,06	93,58	9,03-15,48	12,68	7-9	7,8
3	72,24-107,50	91,11	9,03-15,48	12,94	6-10	7,9
4	58,48-109,22	83,17	10,75-15,48	12,64	6-10	8,4
5	60,63-109,22	91,39	9,46-15,48	11,69	6-9	7,8
6	82,13-108,79	93,09	9,46-18,06	13,50	6-10	8,2
7	68,80-112,66	90,38	13,33-18,06	15,85	6-10	7,5
8	67,94-110,08'	84,10	9,46-16,77	13,93	5-9	7,6
9	68,80-104,92	90,12	12,04-15,48	13,54	7-9	8,3
10	94,98-106,64	94,98	9,89-14,19	13,02	7-10	8,6
Média Total		89,77		13,23		8,03

a/ Cada amostra corresponde à média de 10 conídios

## 6. DISCUSSÃO

A distinção entre as raças O e T de Helminthosporium maydis Nisikado & Myiake é feita através de plantas de milho que difiram entre si quanto ao tipo de citoplasma, sendo que esta diferenciação é realizada através do tipo de lesão produzida pelo patógeno.

O fato do isolado de H. maydis, utilizado nos testes de patogenicidade em diferentes híbridos, com diferentes citoplasmas, não revelar qualquer especificidade por plantas com citoplasmas T sugere que o isolado testado não pertence à raça T. De acordo com o HOOKER et alii (1970 a) e SCHEIFELE (1971), a raça T apresenta especificidade ao citoplasma T, enquanto que a raça O não apresenta especificidade por qualquer citoplasma conforme trabalhos de HOOKER et alii (1970 a), GOOD e SCHENCK (1973) e GOOD e HORNER (1974). Segundo BALMER (comunicação pessoal) um outro fato que sugere não se tratar de um isolado da raça T foi a segregação observada para plantas resistentes e suscetíveis na variedade Centralmex, possuidora de citoplasma normal, que se mostra completamente resistente quando inoculada com a raça T. Diante destes fatos podemos afirmar que o isolado em estudo pertence à raça O.



Embora não tenha sido feito um estudo comparativo com a raça T, o patógeno em questão produziu nos diferentes citoplasmas testados lesões necróticas pequenas com bordos paralelos e alguma clorose associados às lesões, HOOKER et alii (1970 a) mencionaram a características tamanho de lesão produzida como sendo uma das características da raça O.

Com relação ao diferente comportamento das linhagens dos compostos A e B, selecionadas para resistência a H. turcicum em condições de campo, os testes de patogenicidade ao isolado de H. maydis revelaram que a linhagem CB-2 apresentou um alto grau de resistência que se caracterizou pela presença de pontos cloróticos e de pequenas lesões com centro necrótico e halo clorótico. As progênies CB-2-1 e CB-2-2 oriundas da linhagem CB-2 e obtidas mediante a autofecundação desta, revelaram o mesmo grau de resistência ao isolado de H. maydis, mostrando ser o caráter resistência de natureza herdável e também serem as linhagens puras para o caráter em questão. As lesões do tipo resistente em milho ao isolado de H. maydis observadas no presente trabalho se assemelham aquelas observadas por SMITH e HOOKER (1973) e SMITH (1975) e atribuídas à raça O.

No tocante as demais linhagens dos compostos A e B, foi observado que a maioria comportou-se como suscetível, destacando as linhagens CB-3, CB-8 e CB-23 que apresentaram segregação para o caráter de resistência.

A baixa frequência de linhagens resistentes se deve, principalmente, ou a pouca importância que os melhoristas têm dado à doença, não exercendo seleção para o caráter de resistência, ou ao fato das linhagens testadas terem sido desenvolvidas na ausência do patógeno, uma vez que este é oriundo de Inhumas, Goiás.

Com relação aos tipos de lesões observadas em plantas resistentes quando comparadas com as lesões no hospedeiro suscetível, é importante frisar que, de modo geral, as maiores lesões necróticas observadas em plantas resistentes da linhagem CB-2 eram bem menores que as menores lesões necróticas observadas nas plantas suscetíveis da linhagem 929-B3, tida como padrão de suscetibilidade.

Quanto ao comportamento das progênies provenientes de seleção feita na variedade Centralmex para resistência e suscetibilidade a H. maydis em condições de campo, foi verificado que a maioria das progênies oriundas de plantas selecionadas como resistente em condições de campo se revelaram como manifestando lesões do tipo resistente ou moderadamente resistente em testes de casa de vegetação. Este fato permite especular sobre uma maior severidade da doença ocorrendo em testes de casa de vegetação do que aquela obtida em condições de campo. De modo geral, parece haver uma correlação entre reação de resistência manifestada no campo e maior resistência em testes de casa de vegetação.

Os testes também revelaram que a variedade Centralmex parece ser uma boa fonte para a obtenção de material resistente a H. maydis raça O.

Com relação à esporulação em tecido foliar de milho, foi observado o efeito do tipo de lesão sobre a esporulação do patógeno "IN VIVO" sob condições de umidade elevada, verificando-se que a lesão do tipo resistente retarda a esporulação do patógeno sobre a lesão, fato este já observado por CRAIG e DANIEL-KÁLIO (1968); a lesão do tipo moderadamente resistente teve o mesmo efeito sobre a esporulação que a lesão do tipo resistente; já na lesão do tipo suscetível foi detectado esporulação no período correspondente a 48 horas de incubação, diferindo este caso das ob-

servações realizadas por HOOKER et alii (1970 b), SMITH et alii (1970) e HILTY e JOSEPHSON (1971) os quais verificaram esporulação em lesões do tipo suscetível no período de 24 horas de incubação sob condições de umidade elevada.

Os dados obtidos para os caracteres morfológicos, comprimento, largura e septação dos conídios se ajustam a aqueles já observados por DRECHSLER (1925), ULLSTRUP (1941, 1944), LUTTRELL (1951) e no (American Phyt. Soc. 1973) para H. maydis.

## 7. CONCLUSÕES

Pelo que foi observado durante a realização do presente trabalho, pode-se concluir que:

1. o isolado em estudo não apresentou especificidade aos citoplasmas T, C e normal, sendo considerado como pertencente à raça 0 de H. maydis;

2. as diferentes linhagens de milho dos compostos A e B apresentam diferentes graus de reação ao patógeno, sendo que a linhagem CB-2 e suas progênes apresentaram um alto grau de resistência, podendo estas servirem tanto como fonte de resistência como também como linhagem padrão;

3. a linhagem de milho 929-83 apresentou um alto grau de suscetibilidade, podendo ser utilizada como linhagem padrão ao isolado de H. maydis raça 0;

4. as plantas da variedade Centralmex apresentaram diferentes graus de reação, podendo, provavelmente, esta variedade ser utilizada como fonte de resistência ao patógeno.

5. existe uma relação entre o tipo de reação induzida pelo isolado de H. maydis e o período requerido para esporulação "IN VIVO" sob condição de umidade elevada;

6. o tipo de resistência encontrada ao isolado de H. maydis é caracterizado por pontos cloróticos e por pequenas lesões necróticas com halo clorótico.

## 8. SUMMARY

This study was carried out with the following objectives in mind: to identify an isolate of Helminthosporium maydis Nisikado & Miyake at the race level; to determine sources of resistance in corn plants; to study sporulation capacity of the pathogen "IN VIVO", and to verify morphological aspects of the isolate under consideration.

The identification of the isolate at race level was realised based on the type of reaction induced in corn hybrids with T, C and normal cytoplasms, no specificity was demonstrated by the pathogen to any of the above cytoplasms and therefore it was identified as belonging to race 0.

Determination of sources of resistance was carried out in lineages belonging to two artificial populations and variety Centralmex. The resistance reaction observed was characterized by "flecks" type chlorotic points, and small lesions which were chlorotic and necrotic at the same time. Meanwhile the susceptible types showed necrotic lesions, rectangular in shape and bordered by the veins. The reaction observed in most lineages ranged from susceptible to moderately resistant, only one lineage was found to possess a high degree of resistance. Variety Cen -

tralmex showed segregation for the resistance character.

The relation to sporulation "IN VIVO" observed in different types of lesions, it was shown that there exists a relationship between the type of reaction induced by the isolate and the period required for sporulation under high humidity conditions it was verified, that lesion types in resistant hosts showed sporulation after a period of 72 hours of incubation under high humidity conditions, whereas susceptible type lesions presented abundant sporulation after 48 hours of incubation, under similar conditions.

Determination of the morphological aspects of conidia, i.e length, width, in  $\mu\text{m}$ , curvature and septation was conducted through sporulation in leaf tissue, which proved to be an H. maydis isolate.

## 9. LITERATURA CITADA

- ALCORN, J.L., 1975. Race-mating type associations in Australian populations of Cochliobolus heterostrophus. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 53: 742-743.
- AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, 1973. Compendium of corn diseases . St. Paul, Minnesota, 64 p.
- BERGQUIST, R.R. e G. PEVERLY, 1972. Reaction of corn inbreds and hybrids with Helminthosporium maydis raça T. Pl. Dis. Reporter. Beltsville, Maryland, 56: 112-114.
- BLANCO, M.H.; R.R. NELSON; J.E. AYERS; J.P. HILL e S. DALMACIO, 1974. Racial composition of Helminthosporium maydis and H. carbonum on corn hybrids in normal cytoplasm in Pennsylvania in 1973. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 58: 934-936.
- CRAIG, J. e DANIEL-KÁLIO, 1968. Chlorotic lesion resistance to Helminthosporium maydis in maize. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 52:134-136.
- CRAIG, J. e J.M. FAJEMISIN, 1969. Inheritance of chlorotic lesion resistance to Helminthosporium maydis in maize. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 53:742-743.
- DRECHSLER, C., 1925. Leafspot of maize caused by ophiobolus heterostrophus, n. sp, the ascigenous stage of a Helminthosporium exhibition bipolar germination. Jour. Agric. Research, Washington, 31:701-726



- DRECHSLER, C., 1934. Phytopathological and taxonomic aspects of Ophiobolus, Pyrenophora, Helminthosporium, and a new genus, Cochliobolus. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 24:953-983.
- FISCHER, D.E. e A.L. HOOKER, 1975. Race mating type, and virulence characteristics of the 1970 North American Helminthosporium maydis population. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 59: 784-786.
- GOOD, R.L. e N.C. SCRENCK, 1973. Incidence of race O and T of Helminthosporium maydis on maize with normal and Texas male-sterile cytoplasm at Gainesville, Florida 1971-1972. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 57: 981-983.
- GOOD, R.L. e E.S. HORNER, 1974. Effect of normal cytoplasm on resistance to Southern leaf blight on other traits of maize. Crop Science, Madison, 14: 368-370.
- HILTY, J.W. e L.M. JOSEPHSON, 1971. Reaction of corn inbreds with different cytoplasm to Helminthosporium maydis. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 55: 195-198.
- HOOKEER, A.L. ; A. MESTERHAZY; D. R. SMITH e S.M. LIM, 1973. A new Helminthosporium leaf blight of corn in the Northern corn belt. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 57:195-198.
- HOOKEER, A.L.; D.R. SMITH; S.M. LIM e M.D. MUSSON, 1970 a. Physiological races of Helminthosporium maydis and disease resistance. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 54:1109-1110.
- HOOKEER, A.L.; D.R. SMITH; S.M. LIM e J.B. BECKETT, 1970 b. Reaction of corn seedlings with male-sterile cytoplasm to Helminthosporium maydis. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 54:708-712.
- JOSEPHSON, L.M.; C.R. GRAVES; H.C. KINGER e J.W. HILTY, 1971. Reductions in yield of corn from Southern Corn Leaf Blight. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 25:115-118.
- LIM, S.M.; A.L. HOOKER; J.G. KINSEY e D.R. SMITH, 1974. Comparative grain yields of corn hybrids in normal and in texas male-sterile cytoplasm (Cms-T) infected with Helminthosporium maydis race T and disease components of Cms-T corn hybrids. Crop Science. Madison, 14: 190-195.

- LUTTRELL, E.S., 1951. A key to species of Helminthosporium reported on grasses in the United States. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, Suppl. 201:59-67.
- MALCA, I. e A. J. ULLSTRUP, 1962. Effects of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of Helminthosporium. Bulletin of the Torrey Botanical Club, Lancaster, Pennsylvania, 89:240-249.
- NELSON, R.R., 1957. Heterothallism in Helminthosporium maydis. Phytopathology, St. Paul Minnesota, 47:191-192.
- NELSON, R.R., 1973. Further studies on the past occurrence and geographical distribution of isolates of isolates of race T of Helminthosporium maydis. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 57:18-19.
- NELSON, R.R.; J.E. AYRES; H. COLE e D.H. PETERSEN, 1970. Studies and observations on the past occurrence and geographical distribution of isolates of race T of Helminthosporium maydis. Pl. Dis. Reporter Beltsville, Maryland, 54:1123-1126.
- NELSON, R.R.; J.E. AYERS; J. HILL; M. BLANCO e S. DALMACIO, 1973. Racial composition of Helminthosporium maydis race T 1969 and 1970. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 57:411-412.
- PATE, J.B. e P.H. HARVEY, 1954. Studies on the inheritance of resistance in corn to Helminthosporium maydis leaf spot. Agronomy Journal, Madison, 46:442-445.
- PEREIRA, O.A.P., 1976. Comportamento de H. maydis Nisikado e Miyake raça T, em milho (Zea mays L.) contendo diferentes citoplasmas para esterilidade masculina. Piracicaba, ESALQ-USP, 64 p. (Tese de Mestrado).
- SCHEIFELE, G.L., 1971. Geographical distribution of Helminthosporium maydis race T for 1969 and 1970. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 55:302-306.
- SMITH, D.R., 1975. Expression of monogenic chlorotic lesion resistance to Helminthosporium maydis in corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 65:112-114.
- SMITH, D.R. e A.L. HOOKER, 1973. Monogenic chlorotic lesion resistance in corn to Helminthosporium maydis. Crop Science, Madison, 13:330-331.

- SMITH, D.R.; A.L. HOOKER e S.M. LIM, 1970. Physiologic races of Helminthosporium maydis. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 54 : 819-822.
- ULLSTRUP, A.J., 1941. Two Physiologic races of Helminthosporium maydis in the corn belt. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 31:508-521.
- ULLSTRUP, A.J., 1944. Further studies on a species of Helminthosporium parasitizing corn. Phytopathology, St. Paul, Minnesota, 34:214-222.
- ULLSTRUP, A.J., 1970. History of Southern Corn Leaf Blight. Pl. Dis. Reporter, Beltsville, Maryland, 54:1100-1102.