

**INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE COLMOS DE MILHO
(*Zea mays* L.) EM DIFERENTES IDADES E
CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO E SUA RELAÇÃO COM A
EXPRESSÃO DA RESISTÊNCIA A *Fusarium moniliforme* Sheld**

MIRIAN DE FREITAS BORGES

1999

MIRIAN DE FREITAS BORGES

**INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE COLMOS DE MILHO (*Zea mays*
L.) EM DIFERENTES IDADES E CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO
E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DA RESISTÊNCIA A
Fusarium moniliforme Sheld**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de MESTRE.

Orientador

Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Borges, Mirian de Freitas

Inoculação artificial de colmos de milho (*Zea mays* L.) em diferentes idades e concentrações de inóculo e sua relação com a expressão da resistênciia a *Fusarium moniliforme* Sheld / Mirian de Freitas Borges. – Lavras : UFLA/FAEPE, 1999.
50 p. : il.

Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Podridão do colmo. 3. *Fusarium moniliforme* 4. Inoculação artificial. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título

CDD-633.15944

MIRIAN DE FREITAS BORGES

**INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE COLMOS DE MILHO (*Zea mays* L.)
EM DIFERENTES IDADES E CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO E
SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DA RESISTÊNCIA A *Fusarium*
moniliforme Sheld**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de MESTRE.

APROVADA em 12 de agosto de 1999

Prof. Renzo Garcia Von Pinho UFLA

Prof. Denilson Pereira de Oliveira UFLA

Prof. Mário Sobral de Abreu UFLA


Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

*“ Para ter fê em nosso caminho, não é preciso
provar que o caminho dos outros está errado.
Quem age assim não confia nos próprios passos.”*

Paulo Coelho

**À Deus,
pelo presente que é participar dessa magia,
a vida.**

DEDICO

**Aos meus pais, Antonio e Ozana, e irmãos
Ozana, Caetano e Antonio, pelo constante
amor, carinho e confiança.**

MINHA ETERNA GRATIDÃO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial o Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realizar este curso;

Às instituições de apoio ao ensino e pesquisa, CAPES e FAPEMIG, pelo suporte financeiro durante o curso;

Ao Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, amizade e dedicação dispensada durante a realização desse trabalho;

Aos Profs. Renzo Garcia Von Pinho e Mário Sobral de Abreu, pelos ensinamentos, sugestões e incentivo;

Ao Prof. Denilson Pereira de Oliveira, membro da banca examinadora, pela colaboração;

A Ana Maria dos Santos e Ivani Maria Gervásio, pela paciência e gratificante convívio;

Aos demais professores, funcionários e servidores do Departamento de Fitopatologia da UFLA;

Aos funcionários do Galpão de Grandes Culturas da UFLA, pelo auxílio;

Aos amigos que desde o início dessa trajetória estiveram sempre presentes, Carlos Eduardo Marchi, Alessandra Keiko Nakasone e Kátia de Lima Nechet, pelo carinho e companheirismo;

Às amigas Elisandra, Gislaine e Simone Novaes Reis pela amizade e paciência;

Aos amigos do curso, pelo apoio carinho e respeito com que sempre me trataram, em especial: Alessandra A. Ferreira, Claudine, Maria Luiza N. Celeste Leimi Kobayashi, Emílio Takashi, Bernardo A. H. Vieira, Viviane Talamini, Eloísa das G. Leite, Frederico A. de Oliveira;

A Aloima Souza Pinto, Rozane Garcia, Aristoteles Pires de Matos e Sebastião de Oliveira e Silva, pela amizade e incentivo apesar da distância.

Aos amigos do curso, pelo apoio carinho e respeito com que sempre me trataram, em especial: Alessandra A. Ferreira, Claudine M. Carvalho, Maria Luíza N. Celeste Leimi Kobayasti, Emilio Takashi Ishida, Bernardo A. H. Vieira, Viviane Talamini, Eloísa das G. Leite, Frederico A. de Oliveira;

A Aloima Souza Pinto, Rozane Garcia, Aristoteles Pires de Matos e Sebastião de Oliveira e Silva, pela amizade e incentivo apesar da distância.

OBRIGADA

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Podridão do colmo causada por <i>Fusarium moniliforme</i>	3
2.2 Resistência do milho à podridão do colmo.....	4
2.2.1 Mecanismos de resistência.....	6
2.3 Inoculação artificial.....	7
2.4 Avaliação.....	9
2.5 Época de inoculação.....	10
2.6 Concentração de inóculo.....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Isolado.....	12
3.2 Produção do inóculo fúngico.....	12
3.3 Inoculações.....	13
3.4 Experimentos de campo.....	13
3.4.1 Experimento 1 - Reação de híbridos de milho a inoculação artificial do colmo com <i>F. moniliforme</i> aplicadas em diferentes idades das plantas.....	14
3.4.2 Experimento 2 - Reação de híbridos de milho a inoculação artificial do colmo com <i>F. moniliforme</i> aplicadas com diferentes concentrações de inóculo.....	15
3.5 Avaliações.....	15
3.6 Reisolamento	17
3.7 Análise de tanino e lignina no colmo como possíveis mecanismos de resistência.....	17
3.7.1 Determinação do teor de lignina.....	18
3.7.2 Determinação do teor de tanino.....	18
3.8 Análise dos Dados.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Patogenicidade e reisolamento de <i>F. moniliforme</i>	19
4.2 Reação de híbridos de milho à inoculação artificial de <i>F. moniliforme</i> realizada em diferentes idades das plantas.....	20
4.3 Reação de híbridos de milho à inoculação artificial do colmo com diferentes concentrações de <i>F. moniliforme</i>	26
4.4 Tanino e lignina como possíveis mecanismos de resistência do colmo à podridão do colmo de milho.....	30

5 CONCLUSÕES.....	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXOS.....	44

RESUMO

BORGES, MIRIAN DE FREITAS. Inoculação Artificial de Colmos de Milho (*Zea mays* L.) em Diferentes Idades e Concentrações de Inóculo e sua Relação com a Expressão da Resistência à *Fusarium moniliforme* Sheld. Lavras: UFLA, 1999. 50 p. (Dissertação – Mestrado em Fitopatologia) *

A podridão do colmo de milho tem ocorrência generalizada nas regiões produtoras. Visando obter informações sobre o comportamento do patógeno mais freqüentemente associado a essa doença, *Fusarium moniliforme* Sheld, foi avaliada a reação de híbridos de milho à inoculação artificial no colmo feita em diferentes idades das plantas, 30, 55 e 80 dias após a semeadura, e com três níveis de concentrações de inóculo de 1×10^4 , 5×10^5 e 1×10^7 conídios/mL. Nestes experimentos utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, com respectivamente, 4 e 5 repetições, sendo cada parcela constituída de 50 plantas. As inoculações foram feitas no centro do segundo entrenó alongado acima do solo. A avaliação da doença foi realizada aos 120 dias após a semeadura, com base na sintomatologia interna do colmo, utilizando uma escala de notas variando de 1 a 9. Por ocasião da colheita foi avaliado o número de plantas acamadas e a produção de grãos. Procedeu-se também a análise do teor de lignina e tanino da casca e da parte interna do entrenó inoculado nos diferentes tratamentos. De acordo com os resultados, o nível de resistência dos híbridos Cargill 333, Dina 766 e o Cargill 901, foi decrescente nessa ordem. Não houveram diferenças significativas para os níveis de doença obtidos, inoculando-se os colmos com *F. moniliforme*, em diferentes idades das plantas. A menor concentração de inóculo usada permitiu diferenciar o nível de resistência dos híbridos testados. Os teores de tanino não foram significativamente diferentes entre os híbridos. O híbrido Cargill 333 apresentou maior teor de lignina nos tecidos internos e externos do entrenó inoculado, seguido pelo Dina 766, que diferiram significativamente do Cargill 901, esse mostrando menores teores.

* Comitê Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende – UFLA (Orientador),
Mário Sobral de Abreu, Renzo Garcia Von Pinho – UFLA. (Co-orientador)

ABSTRACT

BORGES, MIRIAN DE FREITAS. Artificial Inoculation of Maize (*Zea mays* L.) stalks at different ages and with different inoculum concentrations on the expression of resistance to *Fusarium moniliforme* Sheld. Lavras: UFLA, 1999. 50 p. (Dissertation – Master in Phytopathology)

Corn stalk rot bears a generalized occurrence in the growing regions. Seeking to understand the behaviour of the most widely associated pathogen to that disease, *Fusarium moniliforme* Sheld, both, the reaction of corn hybrids to artificial inoculation in the stalk performed at three different ages of the plants, 30, 55 and 80 days post-planting and three levels of inoculum concentrations, 1×10^4 , 5×10^5 and 1×10^7 conidia/ml were assessed. Randomized block designs, respectively, with four and five replications were utilised in these experiments, being each plot constituted of fifty plants. The inoculations were carried out at the center of the second internode extended above soil level. Disease assesment was conducted 120 days post-planting, by using a score scale ranging from 1 to 9, based on the internal symptomatology of the stalk. By harvest time, the number of fallen plants and the grain yield were evaluated. The lignin and tannin contents of the bark and of the internal part of the inoculated internode were also analyzed for different treatments. Resistance level of the hybrids Cargill 333, Dina 766 and Cargill 901, decreased in that order. There were no significant differences in disease levels obtained when stem inoculations with *F. moniliforme* were performed at different plant ages. The lowest inoculum concentration used, enable to distinguish the resistance levels in the tested hybrids. Tannin contents were not significantly different among the hybrids. The hybrid Cargill 333 presented higher lignin content in the internal and external tissues of the internode inoculated, followed by Dina 766; those significantly differed from Cargill 901, which showed lower lignin contents.

Guidance Committee : Mario Lucio Vilela de Resende - UFLA (Adviser),
Mário Sobral de Abreu (Co-adviser), Renzo Garcia Von Pinho -
UFLA (Co-adviser)

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é cultivado em quase todos os países do mundo, desempenhando importante papel social e econômico. Em 1996/97 a produção mundial estava em torno de 513 milhões de toneladas de grãos, sendo que, no Brasil, foram produzidas 32 milhões de ton. (FAO, 1996). Já na safra 1997/98, a produção brasileira sofreu uma considerável redução, decorrência direta da substituição parcial da área plantada, no verão, pela soja. Considerando a safra de verão, a área diminuiu de 14,1 para 11,6 milhões de hectares e a produção foi de 25,5 milhões de toneladas de grãos. Porém, analisando-se a produção ao longo desta década, verifica-se um grande incremento, em virtude principalmente da rápida evolução da tecnologia disponível, com a ampliação da época de cultivo e das áreas irrigadas, uso de cultivares mais produtivos, melhoria na fertilidade do solo ou da densidade de semeadura. Esses fatores estão diretamente relacionados com a ocorrência de podridões do colmo (Foley, 1960, Foley, 1969; Abney e Foley 1971, Deacon, 1997; Pereira, 1997), ficando evidenciada, assim, a necessidade de se dar maior atenção a esse tipo de doença, que nos últimos anos tem aumentado muito no Brasil.

Considerada uma das enfermidades mais destrutivas do milho, a podridão do colmo tem ocorrência em várias partes do mundo, causando grandes prejuízos na produção (Kucharek e Kommedahl, 1966; Headrick e Pataky, 1991). No Brasil foram relatadas perdas de até 26,4% no rendimento de grãos no Estado do Paraná, em dados coletados durante três safras agrícolas (Nazareno, 1989). O acamamento causado por essa doença é o principal responsável por essas perdas, pois dificulta a colheita das espigas que, permanecendo em contato com o solo, podem apodrecer. Littlefield e Wilcoxson (1962), citados por Fernandes (1975), relatam que a influência na má granação das espigas é menos

freqüente, porém ocorre se mais de 50% do entrenó for comprometido nessa fase de desenvolvimento da planta.

Vários patógenos podem estar envolvidos com essa doença, sendo que o mais freqüente é o fungo *Fusarium moniliforme* Sheld e sua forma perfeita *Gibberella fujikuroi* (sin. *Gibberella moniliforme*) (Nelson, 1992; Munkvold e Desjardins, 1997).

F. moniliforme é comumente encontrado associado a sementes de milho, podendo causar morte de plântulas ou permanecer em estado de latência durante o crescimento da planta até a época da polinização, quando, com a queda da resistência, os tecidos dos entrenós próximos ao solo passam a ser colonizados pelo fungo. Assim, verifica-se que as infecções podem ocorrer em qualquer período do desenvolvimento da planta, porém os sintomas só são observados no final do ciclo da cultura (Foley, 1969; Futrell e Kilgore, 1969; Tanaka e Balmer, 1980; Nelson, 1992; Kedera, Leslie e Clafin, 1994; Munkvold e Carlton, 1997; Munkvold, McGee e Carlton, 1997).

A melhor forma de controle da doença é o uso de híbridos resistentes. O melhoramento genético encontra uma maior dificuldade para obtenção desses híbridos, pois o modo de herança da resistência às podridões do colmo não está bem claro. Sabe-se, porém, que a resistência de um híbrido é proporcional ao número de linhagens resistentes que entram em sua síntese. É de grande importância que as técnicas usadas para seleção de linhagens estejam bem definidas, sendo capazes de detectar fontes de resistência (Hooker, 1956; Kappelman e Thompson, 1966; Djordjevic e Ivanovic, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos da inoculação artificial de *F. moniliforme* em diferentes idades de plantas de milho e com diferentes concentrações de inóculo. Procurou-se também verificar os teores de tanino e lignina no colmo das plantas e a sua relação com o nível de resistência dos híbridos utilizados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Podridão do colmo causada por *Fusarium moniliforme*

Dentre os agentes causadores de podridões do colmo de milho, podem ser encontradas diversas espécies de fungos, tais como *Gibberella zeae* (Schw.) Petch (anamorfo: *Fusarium graminearum* (Schw.)), *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc. [Sin. *Diplodia zeae*], *Fusarium subglutinans* (Wr. e Reink.) Nelson, Toussom e Marasas e *Colletotrichum graminicola* (CES.) G. W. Wils (teleomorfo *Glomerella graminicola*). Porém, o mais frequentemente associado a essa enfermidade é o *Fusarium moniliforme* Sheld (Nelson, 1992; Munkvold e Desjardins, 1997). O teleomorfo *G. fugikuroi* (sin. *Gibberella moniliforme*) corresponde a um complexo de populações assexuais denominadas por letras, que vão de A a G, sendo que apenas as população A e F são consideradas *F. moniliforme* com base morfológica (Kedera, Leslie e Claffin, 1992; Klittich e Leslie, 1992; Kedera, Leslie e Claffin, 1994).

A podridão do colmo é uma enfermidade complexa resultante das interações entre a ampla gama de patógenos que podem estar a ela associados, à planta e ao ambiente, sendo que a importância de cada um desses componentes ainda não é bem compreendida.

Nas plantas doentes, os sintomas apresentados pela colonização por *F. moniliforme* resume-se à coloração avermelhada que adquirem os tecidos internos dos entrenós mais baixos, podendo ou não ocorrer a quebra da base do colmo e o acamamento das plantas. Em alguns casos acontece a murcha e a morte da planta doente (Pinto, Fernandes e Oliveira, 1997; Pereira, 1997)

F. moniliforme é um parasita não especializado, que infecta diversas espécies de plantas. Em milho, não só é o patógeno mais freqüente, como

também um dos mais comuns colonizadores endofíticos. É transmitido por sementes, sendo essa a principal forma de ocorrência de infecções sistêmicas, sem sintomas visíveis, que no decorrer do desenvolvimento da planta podem causar morte de plântulas, podridão de raiz, colmo e/ou espiga (Foley, 1962; Futrell e Kilgore, 1969; Tanaka e Balmer, 1980; Nelson, 1992; Kedera, Leslie e Claffin, 1992; Kedera, Leslie e Claffin, 1994; Munkvold e Carlton, 1994; Munkvold, McGee e Carlton, 1997; Yates, Bacon e Hinton, 1997). Possui fase saprofítica ativa, podendo sobreviver através do espessamento das paredes da hifa e até multiplicar-se em matéria orgânica do solo, restos da cultura, sendo esta a principal fonte de inóculo (Pinto; Fernandes e Oliveira, 1997; Munkvold, McGee e Carlton, 1997). Geralmente, os esporos aéreos, microconídios formados em cadeia (Hsieh, Snyder e Smith, 1979; Nelson, 1992), são produzidos em abundância e são facilmente dispersos pelo ar a longas distâncias (Ooka e Kommedahl, 1977). Esses esporos servem de inóculo para infecções do colmo, atingindo os tecidos da planta por penetração direta ou mais comumente via ferimentos, causados principalmente por insetos (Headrick, Pataky e Juvik, 1990; Munkvold, McGee e Carlton, 1997).

A produção de várias substâncias pelo *F. moniliforme*, como ácido fusárico, fusarinas, giberelinas, moniliforminas e a fumonisinas, aumenta sua importância como patógeno de milho (Kucharek e Kommedahl, 1966; Nelson, 1992; Pereira, 1997; Michelangelo, 1997; Munkvold e Desjardins, 1997).

2.2 Resistência do milho à podridão do colmo

A maioria dos trabalhos referentes às podridões do colmo de milho têm origem norte-americana e foram desenvolvidos com *D. maydis* e *G. zae*.

A resistência da epiderme do colmo tem maior importância nas infecções por *D. maydis*, que em geral penetra diretamente. Já a infecção por

F. moniliforme mostra-se mais dependente de ferimentos. Além disso, sua ocorrência em sementes é alta, apresentando grande potencial de causar podridões no desenvolvimento da plantas (Munkvold e Carlton, 1997; Munkvold, McGee e Carlton, 1997; Munkvold e Desjardins, 1997; Casa, 1997). Assim, para esse último é de maior relevância a resistência interna do colmo atuando na colonização.

Tecidos do colmo com células em plena atividade e intenso metabolismo apresentam uma maior resistência à colonização por *F. moniliforme*. Isto está relacionado, entre outros fatores, com os teores de açúcares, sólidos solúveis, nitrogênio e substâncias fungistáticas (BeMiller e Pappelis, 1964), teores estes que decrescem à medida que aumenta a senescência das plantas (Pinto, Fernandes e Oliveira, 1997).

Para o enchimento dos grãos em milho, é necessária uma abundante demanda de açúcar da planta. Aproximadamente 80% podem ser supridos pela fotossíntese da folha, e os outros 20% são supridos por reservas de açúcar armazenadas, principalmente na base do colmo. Essas reservas de açúcar são reduzidas de maneira controlada com a aproximação da maturidade da planta (Deacon, 1997). Entretanto, a paralisação do crescimento vegetativo, senescência das folhas e reprodução (Foley, 1960; Craig e Hooker, 1961) são capazes de alterar a atividade fisiológica das células, afetando a resposta do hospedeiro aos patógenos (Wysong e Hooker, 1966).

Uma maior predisposição da planta às infecções ocorre quando estas encontram-se sob condições de estresse. Deficiência hídrica e excesso de nitrogênio em relação ao potássio (Foley e Wemham, 1957), alta incidência de manchas foliares, danos causados pelo granizo, por insetos (Pappelis, 1970) ou outros fatores que possam reduzir temporariamente a taxa fotossintética levam à remoção de mais açúcar dos tecidos do talo. Com isso, inicia-se a rápida e prematura senescência dos tecidos do colmo e, em consequência, uma maior

predisposição da planta ao ataque de fungos causadores de podridões do colmo (Craig e Hooker, 1961; Deacon, 1997).

2.2.1 Mecanismos de resistência

Os resultados encontrados em estudos sobre os mecanismos de resistência a podridões do colmo são contraditórios. Johann e Dickson (1945), Whitney e Mortimore (1962) (1960), citados por Fernandes (1975), verificaram, em testes com meios de cultura, correlação entre a composição química de extratos do colmo de plantas de milho e a resistência aos patógenos. Eles observaram que extratos de colmo obtidos antes ou pouco após a polinização apresentavam um efeito fungistático sobre *F. moniliforme* e *D. maydis*, indicando que o mecanismo de resistência à colonização era o mesmo para os dois fungos. Porém, inoculações com esses dois fungos juntos e individualmente, nas mesmas cultivares, mostraram que é possível detectar plantas resistentes a *F. moniliforme*, não o sendo a *D. maydis*, o que leva a crer que esses resultados se devam à maior virulência desse último (Fernandes, 1975).

Barnes (1959), fazendo bioensaios com extratos de colmo de plantas resistentes e suscetíveis a *G. zaeae*, relatou que nos extratos colhidos por ocasião da emissão dos estigmas, a quantidade de substâncias fungistáticas não diferiu. Após tal período, essas substâncias inibidoras desapareciam mais lentamente nas plantas resistentes que nas suscetíveis.

Existe uma correlação entre a densidade dos tecidos da medula do colmo e o teor de glicosídeos com a resistência à podridão; tecidos apresentando maior densidade possuem maior quantidade de substâncias glicosídicas que tecidos de baixa densidade, o que é suficiente para inibir a germinação dos esporos dos patógenos (BeMiller e Pappelis, 1965).

Yates, Bacon e Hinton (1997) relatam que a infecção endofítica de *F. moniliforme* pode estimular um aumento no crescimento de raízes e acelerar a deposição de lignina no talo de plântulas de milho, conferindo maior rigidez e provavelmente, proteção contra biótipos patogênicos.

No processo de melhoramento genético visando resistência à podridão do colmo, geralmente é utilizado o método de seleção recorrente. A continuação desse tipo de seleção por vários ciclos resulta em perdas na produção de grãos. Devey e Russell (1983), citados por Martin e Russell (1984a), encontraram redução de até 40% na produção quando realizados sete ciclos de seleção recorrente para qualidade do colmo, na linhagem Lancaster. Seleção para a característica citada, conferindo às plantas resistência às podridões, resulta em alterações no balanço de translocação, sendo que uma maior quantidade de fotoassimilados é utilizada pela planta, com conseqüente redução na disponibilidade dos mesmos para os grãos. (Martin e Russell, 1984a; Martin e Russell, 1984b; Rehn e Russell, 1986).

2.3 Inoculação artificial

Existe uma correlação positiva entre os dados obtidos pela inoculação artificial de colmos de milho e os obtidos pela infecção natural dos mesmos (Hooker, 1956; Pappelis, 1970). Porém Foley (1960), trabalhando com *D. zaeae* e *G. zaeae*, relatou serem completamente diferentes os sintomas manifestados por essas duas formas de infecção.

Apesar das limitações, a inoculação artificial, com ligeiras modificações, passou a ser utilizada em programas de melhoramento de milho (Hooker, 1957), tanto no estudo da herança da resistência (Russell, 1961, Martin e Russell, 1984a; Martin e Russell, 1984b; Kappelman e Thompson, 1966), como no estudo da natureza da resistência (Craig e Hooker, 1961; BeMiller e Pappelis,

1965; Pappelis, 1970; Kang, Pappelis e Zuber, 1986; Munkvold e Carlton, 1997).

Testando diferentes métodos de inoculação, Cappellini (1959), citado por Fernandes (1975), observou que não houve diferença significativa na severidade da doença quando foram utilizados palitos, seringa hipodérmica, introdução no colmo de discos de ágar e grãos de aveia colonizados pelo patógeno. Já Drepper e Renfro (1990) verificaram que o uso de palito com inóculo foi mais efetivo que injeção de suspensão de esporos. Porém, o uso de seringa torna o trabalho mais rápido e permite quantificação da suspensão de esporos inoculada.

Hooker (1957), em estudos com *D. zaeae*, procurou determinar o melhor local no colmo para inoculações. Foram inoculados o 1º, 2º, 3º, 4º e 5º entrenós alongados acima do nível do solo, de linhagens resistentes e suscetíveis. Observou-se diferença da severidade dos sintomas nos dois primeiros entrenós, sendo que nos entrenós mais altos as reações eram de suscetibilidade, mesmo na linhagem resistente.

Por outro lado, híbridos resistentes e suscetíveis, de ciclos precoce, médio e tardio, inoculados com suspensão de *D. maydis*, apresentaram uma menor severidade dos sintomas no 1º entrenó quando este foi comparado com o 3º e o 5º entrenós (Wysong e Hooker, 1966).

Uma vez que a resistência às podridões do colmo é detectada com maior segurança nos entrenós mais baixos e como a infecção natural ocorre com maior frequência nesta região do colmo, as inoculações visando seleção para resistência devem ser feitas na parte inferior da planta (Hooker, 1957).

O volume de suspensão de conídios usado em inoculações de colmo é variado, sendo encontradas aplicações de 0,5 mL (Cappellini (1959), citado por Fernandes (1975), 1 mL (Munkvold, McGee e Carlton, 1997) e até 2 mL (Drepper e Renfro, 1990).

Inoculações feitas com mistura de vários patógenos compromete a interpretação dos resultados. Fernandes (1975), estudando a reação de um grupo de cultivares a inoculações feitas isoladamente e em conjunto para *D. maydis* e *F. moniliforme*, e realizando avaliações em diferentes épocas, ou seja, 3, 4 ou 5 semanas após a inoculação, observou maior frequência de plantas resistentes nas inoculações isoladas com *F. moniliforme* e verificou também o desenvolvimento mais rápido das lesões causadas por *D. maydis*. Assim, concluiu-se que a diferença no comportamento dos cultivares foi devida à maior patogenicidade de *D. maydis*, já que a metodologia empregada nas inoculações e o potencial de inóculo foram os mesmos para os dois patógenos.

2.4 Avaliação

Para a avaliação da podridão do colmo de milho, utiliza-se a incidência, plantas mortas ou acamadas, ou a severidade da doença no entrenó inoculado. Entretanto, segundo Koehler (1960), citado por Fernandes (1975), a primeira variável só deve ser usada em estudos de resistência da planta quando a podridão do colmo for considerada como a única causa da morte.

Na quantificação dos sintomas internos, corta-se longitudinalmente a região do colmo inoculada e avalia-se a área que apresenta alteração na coloração do tecido. Para tanto, os dados geralmente são colhidos antes das folhas começarem a morrer como resultado da senescência.

Craig e Hooker (1961) propuseram um escala contendo notas que permitem separar os sintomas em 6 classes: 1, de 0 a 25%; 2, de 26 a 50%; 3, de 51 a 75%; 4, de 76 a 100% da área interna do entrenó inoculado apresentando sintomas; 5, quando os sintomas atingiram os entrenós adjacentes; e 6, quando ocorrer morte prematura da planta. Essa mesma escala é também encontrada sem a última classe (Hooker, 1956) ou com as duas últimas classes divididas em sub-

classes (Pappelis, 1970). Segundo Todd e Kommedahl (1994), escalas com base larga resultam em perda de precisão.

Alguns estudos procuraram determinar a melhor época para avaliação dos sintomas com base na descoloração interna dos tecidos do colmo. O processo de colonização de variedades suscetíveis por *D. zea* é intenso até a 3ª semana após a inoculação e a avaliação deve ser feita, preferivelmente, na 4ª semana (Hooker, 1957; Wysong e Hooker, 1966). Avaliações antes da 4ª semana após a inoculação podem conduzir a detecção de falsa resistência a *F. moniliforme*. Assim, é preciso dar tempo para que a colonização do colmo alcance determinado grau, a partir do qual os aumentos de sintomas passem a ocorrer de maneira mais lenta (Hooker, 1957; Fernandes, 1975).

2.5 Época de inoculação

Para se estudar o efeito da época de inoculação sobre o desenvolvimento dos sintomas, Michaelson (1957) inoculou plantas de milho com *D. zea* e *G. zea* em épocas diferentes e observou que, quando as inoculações eram feitas antes das plantas atingirem o período de maior suscetibilidade, o que ocorria próximo à época de produção de pólen, as lesões eram menores que aquelas decorrentes de inoculações mais tardias, embora, no primeiro caso, o tempo para o aparecimento dos sintomas fosse maior.

Hooker (1957), fazendo inoculações do colmo com uma suspensão de *D. zea*, 1, 2, 3 e 4 semanas após a ântese e avaliando as reações das plantas com base nas sintomas internos, observou que a melhor época para inoculações se estendia por um período de 1 a 3 semanas após a ântese.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura procuram avaliar o efeito de inoculações no colmo feitas pouco antes ou durante o período

reprodutivo das plantas. Deste modo, são escassas as informações sobre o efeito de inoculações precoces de *F. moniliforme* no desenvolvimento da doença.

2.6 Concentração de inóculo

Segundo Koehler (1960), citado por Fernandes (1975), a concentração de inóculo é um importante fator na determinação da severidade dos sintomas em colmo de milho. Porém, não foi encontrado nenhum trabalho que determinasse uma concentração ideal para detectar resistência a *F. moniliforme*. Em geral verifica-se a utilização de concentrações com 1×10^6 ou 1×10^7 conídios/mL (Munkvold, McGee e Carlton, 1997; Drepper e Renfro, 1990).

A forma de controle mais efetiva para a podridão do colmo em milho é o uso de híbridos resistentes. A correta detecção de fontes de resistência no melhoramento genético depende do uso de metodologias de seleção e avaliação confiáveis, devidamente testadas. Faz-se necessário um maior esclarecimento da reação das plantas de milho à inoculação de *F. moniliforme*, principalmente no que diz respeito à melhor idade de inoculação e ao nível de concentração de inóculo mais apropriado.

A unidade experimental foi constituída de 2 linhas de 5m de comprimento, espaçamento de 0,80 m entre fileiras e 0,20 m entre plantas, totalizando 50 plantas em cada parcela.

3.4.1 Experimento 1 - Reação de híbridos de milho à inoculação artificial do colmo com *F. moniliforme* realizadas em diferentes idades das plantas

Foram utilizados dois híbridos simples de milho, provenientes da empresa Cargill Agrícola S. A., sendo um considerado resistente à podridão do colmo, o C 333, que apresenta ciclo normal e grãos semi-duros e outro híbrido C901, que além de ser considerado suscetível à podridão de *Fusarium*, apresenta ciclo super precoce e grãos semi-dentados. Os colmos foram inoculados com suspensão de conídios de *F. moniliforme* em diferentes idades: 30, 60, e 80 dias após a semeadura. Para cada híbrido foi utilizada também uma testemunha inoculada com água destilada esterilizada e outra absoluta (sem inoculação). Os tratamentos foram avaliados num delineamento de blocos casualizados, com 4 repetições, em esquema fatorial 5 (idades de inoculação + testemunhas) x 2 (híbridos).

A inoculação foi feita por punção usando-se seringas hipodérmicas de 10 mL e injetando-se um volume de 1mL da suspensão de esporos no centro do segundo internódio alongado acima do solo. Foi fixada uma concentração de 1×10^7 conídios/mL (Munkvold e Carlton, 1997).

3.4.2 Experimento 2 - Reação de híbridos de milho à inoculação artificial do colmo com diferentes concentrações de *F. moniliforme*

Foram avaliados três híbridos simples, sendo dois considerados previamente como resistentes, ou seja, o C333 e o Dina766 (super precoce, grãos semi-duros) e o C901, que é considerado como suscetível à podridão por *Fusarium*. Nesse experimento, foram utilizados também duas testemunhas para cada híbrido, sendo uma absoluta (sem inoculação) e outra inoculada com água destilada esterilizada.

Foram avaliadas três concentrações de inóculo: 1×10^4 , 5×10^5 e 1×10^7 conídios /mL.

As inoculações foram realizadas 55 dias após a semeadura. Para isso, usaram-se seringas hipodérmicas de 10 mL, injetando-se 1mL da suspensão de conídios no centro do segundo internódio alongado acima do solo de cada planta.

Para esse experimento, o delineamento empregado também foi o de blocos casualizados, com 5 repetições, em esquema fatorial 5 (idades de inoculação + testemunhas) x 3 (híbridos).

3.5 Avaliações

Foram feitas avaliações de incidência e severidade da podridão de colmo e podridão de espigas e determinada a produção de grãos. A severidade da podridão de colmo foi avaliada 120 dias após a semeadura, quando metade das plantas de cada parcela (1 fileira) foi removida e os colmos cortados longitudinalmente, avaliando-se os sintomas internos. Colmos com sintomas de infecção por *D. maydis* não foram avaliados. Foi utilizada a escala diagramática desenvolvida por Giglioti e Canteri (1998), usada para avaliação da severidade

do complexo broca-podridões (*Diatraea saccharalis* / *F. moniliforme* Sheld, *Colletotrichum falcatum* Went) em colmos de cana-de-açúcar, com notas de 1 a 9 (Figura 1).

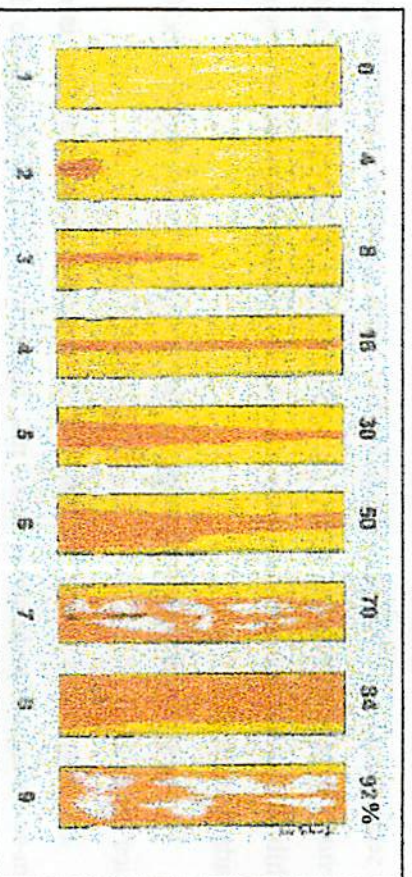


FIGURA 1. Escala diagramática usada na avaliação da severidade de podridão do colmo de milho (Giglioti e Canteri, 1998).

A curva de calibração para converter os índices dessa escala em porcentagem de severidade seguiu o modelo logístico, com ponto de inflexão em 50%. De acordo com a escala, foi feita interpolação dos dados e médias de parcelas para obtenção da porcentagem de área lesionada.

Por ocasião da colheita, 150 dias após a semeadura, na fileira remanescente da parcela, foi quantificado o número de plantas quebradas e acamadas e a produção de grãos, que teve sua unidade medida e posteriormente corrigida para 13% segundo a expressão:

$$PC = PP * (100 - UP) / 87$$

PC = Peso de grãos corrigido por parcela

PP = Peso de grãos da parcela

UP = Umidade dos grãos da parcela

3.6 Reisolamento

Amostras tiradas de cada tratamento, nos dois experimentos, foram usadas no reisolamento. Em câmara de fluxo laminar, parte do internódio inoculado foi desinfestado imergindo-se em hipoclorito de sódio a 2% por 3 min., flambado e cortado longitudinalmente, transferindo-se fragmentos dos bordos da lesão interna para placas de Petri com meio ágar-água (20g de ágar e 1000mL de água) e outras com BDA (batata - dextrose ágar) acrescido de thiabendazole a 0,1%. As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após três dias, as colônias desenvolvidas foram repicadas para placas de Petri com meio BDA, e foi realizada a identificação do fungo, com base em características morfológicas.

3.7 Análise dos teores de tanino e lignina no colmo de milho como possíveis mecanismos de resistência

Em todos os tratamentos dos dois experimentos realizados, foram analisados os teores de lignina e tanino presentes nos colmos dos híbridos. Para isso, cada tratamento, independente da concentração ou da época de inoculação, foi considerado uma repetição dentro de cada híbrido. Usou-se apenas o nó inoculado dos colmos, que foram submetidos à secagem em estufa ventilada na temperatura de 60°C. Posteriormente, os tecidos internos foram separados da casca, compondo duas amostras distintas, que foram trituradas e analisadas separadamente.

3.7.1 Determinação do teor de lignina

Para determinação do teor de lignina, seguiu-se a metodologia proposta por Silva (1981), baseada no método proposto por Van Soest e Wine (1968). Para esse processo, é necessária a extração da lignocelulose, que é a porção da parede celular mais resistente ao tratamento químico, constituída por celulose, lignina, cutina, minerais e sílica, com exceção da hemicelulose, menos resistente a esse tratamento.

3.7.2 Determinação do teor de tanino

A extração do tanino foi feita de acordo com a metodologia descrita por Swain, *et al* (1959), a qual fundamenta-se na sua solubilização em metanol.

Para o doseamento do tanino, seguiu-se o método Colorimétrico de Folin-Dennis (A. O. A. C. , 1960).

3.8 Análise dos Dados

Para cada experimento, foi realizada uma análise de variância para os dados de produção de grãos e de severidade de podridão. A verificação da distribuição normal dos dados foi feita com o auxílio do programa *SAS for Windows* (SAS Institute, Cary, NC), sendo que os valores de severidade, em porcentagem, sofreram transformação utilizando-se a expressão $\ln(x+1)$. As médias foram comparadas pelo teste Teste de Agrupamento de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados de tanino e lignina do colmo foram analisados comparando-se os híbridos por meio do mesmo teste de médias citado anteriormente.

4 Resultados e Discussão

4.1 Patogenicidade e reisolamento de *F. moniliforme*

O isolado de *F. moniliforme* usado no presente trabalho mostrou-se patogênico num teste preliminar feito em casa de vegetação, inoculando-se colmos de milho. O fungo foi reisolado dessas plantas inoculadas e suas colônias apresentaram alta esporulação, com grande produção de microconídios em cadeia. Nos testes de viabilidade de conídios, feitos com alíquotas das suspensões usadas nas inoculações dos experimentos de campo, encontrou-se alta porcentagem de germinação, entre 90-100%.

A presença de *F. moniliforme* foi detectada em todas as parcelas, de acordo com o isolamento feito a partir das amostras coletadas experimentos de campo. A contaminação dos tecidos internos das testemunhas absolutas pode ser atribuída à colonização endofítica por biótipos que não provocam o desenvolvimento de sintomas, provavelmente provenientes de sementes já infectadas (Munkvold & Carlton, 1994; Munkvold, McGee & Carlton, 1997; Yates, Bacon e Hinton, 1997). O estudo da podridão do colmo de milho é dificultado pelo fato de ser esta uma doença complexa, envolvendo vários patógenos. O uso de thiabendazole adicionado ao BDA conseguiu inibir o crescimento de *F. moniliforme*, permitindo o isolamento de outros patógenos associados às lesões, encontrando-se *C. graminicola* e *D. maydis*. Embora os colmos que apresentavam sintomas característicos de infecção por esses dois últimos fungos não terem sido incluídos nas avaliações, a ocorrência natural deles no experimento pode ter influenciado o comportamento do fungo inoculado.

4.2 Reação de híbridos de milho à inoculação artificial de *F. moniliforme* realizada em diferentes idades das plantas

Na análise de variância dos dados referentes à severidade da podridão do colmo causada por *F. moniliforme*, foram observadas diferenças significativas para os dois híbridos e entre os tratamentos aplicados, não sendo significativa a interação tratamento x híbrido (Tabela 1A).

Pelo teste de médias aplicado, verificou-se que não houve diferença significativa na severidade da podridão do colmo quando foi realizada a inoculação artificial com *F. moniliforme* em diferentes idades das plantas (Tabela 2), independente do nível de suscetibilidade dos híbridos usados.

De acordo com Fernandes (1975), a avaliação da severidade feita antes da 4ª semana após a inoculação pode conduzir a erros, detectando resistência a *F. moniliforme* sem que ela realmente exista. O autor afirma que é preciso dar tempo para que a colonização atinja um determinado grau, a partir do qual os aumentos de sintomas passem a ocorrer de maneira mais lenta. No presente trabalho, os colmos foram avaliados internamente 120 dias após a semeadura, isto é, mais de 4 semanas após ter sido feita a última inoculação (aos 80 dias). As porcentagens de área lesionada encontradas não permitiram diferenciar significativamente as idades de inoculação, apesar de ter havido tempo necessário para se processar a fase de colonização mais ativa do *F. moniliforme*.

Foi encontrada diferença significativa entre as testemunhas e dessas com os tratamentos de inoculações do patógeno. Na maioria das plantas da testemunha absoluta, o colmo mostrava-se sadio sem nenhuma descoloração. O pequeno número de contaminações pode ser atribuído à infecção natural, possivelmente proveniente de sementes infectadas ou por meio de injúrias no colmo por insetos e tratos culturais, como a capina. A testemunha

inoculada com água diferiu significativamente da absoluta, mostrando que o ferimento facilitou a infecção por *F. moniliforme*.

TABELA 2. Médias não transformadas da severidade (% de área lesionada) de podridão do colmo, causada por *F. moniliforme*, nos híbridos C333 e C901 em função do tratamento aplicado.

Tratamentos	Médias (%)*
Inoculação aos 30 dias	22,71 a
Inoculação aos 55 dias	21,04 a
Inoculação aos 80 dias	24,66 a
Testemunha inoculada com água	6,78 b
Testemunha absoluta	2,93 c

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As médias de severidade da doença nos dois híbridos mostraram claramente a diferença do nível de suscetibilidade. O híbrido C333 apresentou uma média de 5,6% de área lesionada no internódio inoculado, enquanto no C901 a porcentagem média foi de 25,11% (Tabela 3). Verifica-se também, pela Figura 2, que a podridão no colmo do híbrido C901 foi muito mais pronunciada.

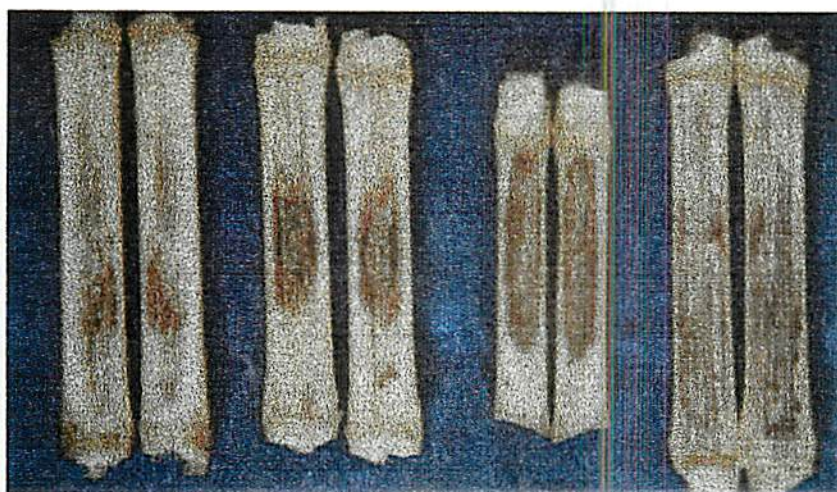
TABELA 3. Médias não transformadas da severidade (% de área lesionada) de podridão do colmo, causada por *F. moniliforme*, nos híbridos C333 e C901.

Híbridos	Médias (%)*
C333	5,60 a
C901	25,11 b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Observando-se a Figura 3, apesar de ser uma diferença pequena e não significativa, a severidade da doença nos dois híbridos foi menor na inoculação feita aos 55 dias. Já as inoculações aos 30 dias e aos 80 dias resultaram em médias de áreas lesionadas mais próximas, considerando-se a avaliação no final do ciclo da cultura. Diversos fatores podem estar atuando nessa pequena diferença, dentre eles a quantidade de substâncias fungistáticas nas distintas fases de desenvolvimento da planta e a influência de outros fungos que possam estar envolvidos nesse patossistema. Segundo Johann e Dickson (1945), Whitney e Mortimore (1960 e 1962), citados por Fernandes (1975) e Barnes (1959), a quantidade de substância fungistáticas encontradas em extratos de colmos de milho diferem de acordo com a idade da planta e seu nível de resistência.

Apenas uma avaliação no final do ciclo da cultura não permitiu diferenciar os tratamentos com inoculação do fungo em diferentes idades seriam necessários mais estudos, aliando-se várias épocas de avaliação, procurando acompanhar o desenvolvimento conjunto patógeno-hospedeiro.



A



B

FIGURA 2. Severidade de podridão do colmo em internódios inoculados com *F. moniliforme*, aos 55 dias após a semeadura, nos híbridos C901 (A) e C333 (B).

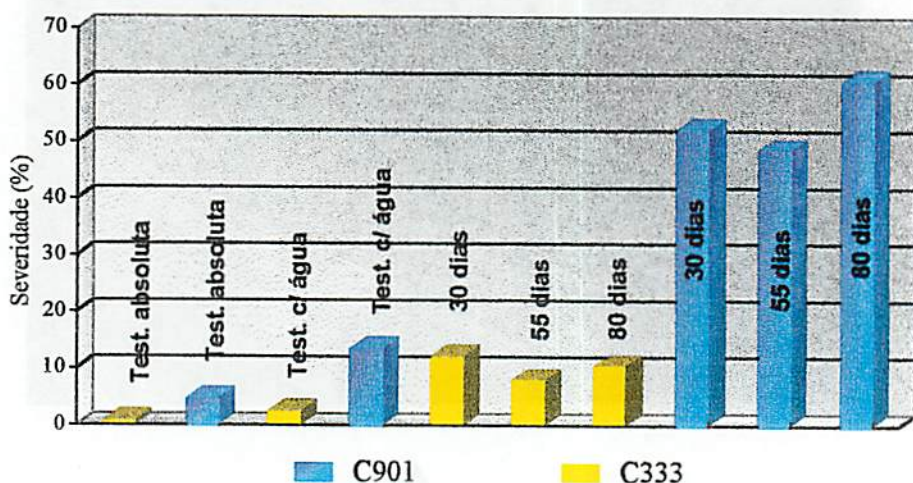


FIGURA 3. Severidade (% de área lesionada) de podridão causada por *F. moniliforme* nos colmos dos híbridos C333 e C901 nas diferentes idades de inoculação e nas testemunhas (absoluta e inoculada com água).

Com relação à produção de grãos, não houve diferença significativa para nenhuma das fontes de variação (Tabela 2A). Segundo Littlefield e Wilcoxson (1962), citados por Fernandes (1975), a influência da podridão do colmo na má granação das espigas é pouco freqüente, porém ocorre se mais de 50% do entrenó forem comprometidos nessa fase de desenvolvimento da planta. O híbrido o C901 mostrou uma maior suscetibilidade a *F. moniliforme*, apresentando uma menor produção nos tratamentos com inoculações mais precoces, ou seja, aos 30 e 55 dias após a semeadura, quando comparada à inoculação aos 80 dias. O menor nível de resistência desse híbrido provavelmente permite que o fungo dê início a sua colonização após a infecção, e

se isso ocorrer nas fases mais jovens da planta, os danos causados ao colmo repercutirão na produção de grãos.

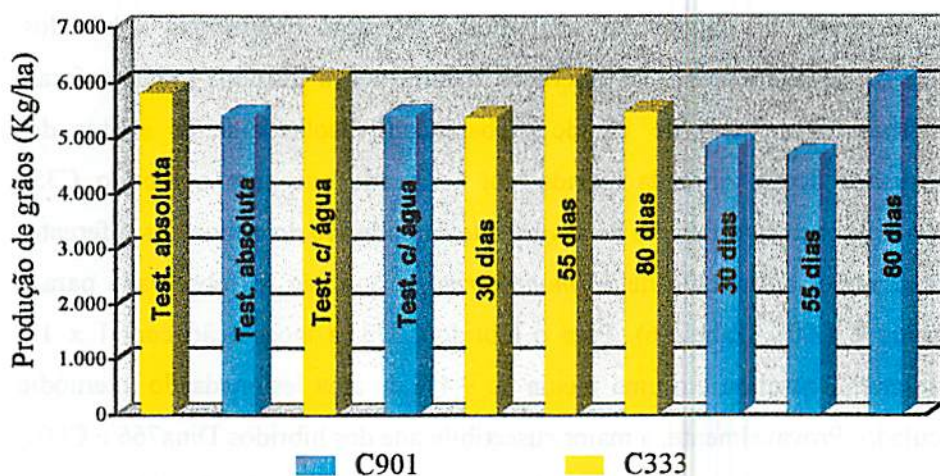


FIGURA 4. Produção de grãos (Kg/ha) dos híbridos C333 e C901 em função das diferentes idades de inoculação após a semeadura e nas testemunhas (absoluta e inoculada com água).

4.3 Reação de híbridos de milho à inoculação artificial do colmo com diferentes concentrações de *F. moniliforme*

Na análise de variância dos dados relativos à severidade de podridão do colmo causada por *F. moniliforme*, foram encontradas diferenças significativas para os efeitos de tratamentos, híbridos e interação tratamentos x híbridos. Todos os desdobramentos da interação tratamentos x híbridos também foram significativos ao nível de 1% de probabilidade. Isolando-se os efeitos dos tratamentos dentro de cada híbrido, foi verificado que para o híbrido C333 houve diferença significativa na severidade da podridão do colmo nas diferentes concentrações de inóculo de *F. moniliforme*, o que não foi observado para o Dina766 e C901 (Tabela 6). Para o híbrido C333, a inoculação com 1×10^4 conídios/mL resultou em uma média de 9,4% de área lesionada do internódio inoculado. Provavelmente, a maior suscetibilidade dos híbridos Dina766 e C901, conforme relatado anteriormente, tinha sido a responsável pela não diferenciação das médias dos tratamentos. Entretanto observa-se, na Figura 5, uma tendência de aumento na severidade das lesões com o aumento na concentração de inóculo, independente do híbrido usado.

Com base na severidade obtida nos tratamentos testemunhas, confirmase, mais uma vez, que o ferimento provocado pela inoculação com água possibilita o aumento das infecções por *F. moniliforme* (Tabela 6). Verifica-se que a média das áreas lesionadas da testemunha inoculada com água do híbrido Dina766 foi maior que a do C901, contrapondo-se às médias dos tratamentos com inoculação do fungo, que apesar de não terem sido significativamente diferentes das médias do C901, sempre foram menores (Figura 5).

TABELA 6. Médias não transformadas da severidade (% de área lesionada) de podridão do colmo, causada por *F. moniliforme*, nos híbridos C333, Dina766 e C901 em função do tratamento aplicado.

Tratamentos	Híbridos		
	C333	Dina766	C901
Conc. de 1×10^4 conídios/mL	9,40 b B	42,29 a A	51,58 a A
Conc. de 5×10^5 conídios/mL	26,23 a B	48,26 a A	58,72 a A
Conc. de 1×10^7 conídios/mL	28,35 a B	61,07 a A	65,13 a A
Test. inoculada com água	3,59 c B	14,60 b A	11,74 b A
Test. absoluta	1,50 d B	1,15 c B	4,69 c A

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Diferença significativa na severidade da doença nesses dois híbridos é observada na testemunha absoluta. Já para o híbrido C333, os resultados obtidos reafirmam a menor suscetibilidade, uma vez que, em todos os tratamentos, a severidade da doença foi sempre significativamente menor que a obtida nos outros híbridos (Tabela 6).

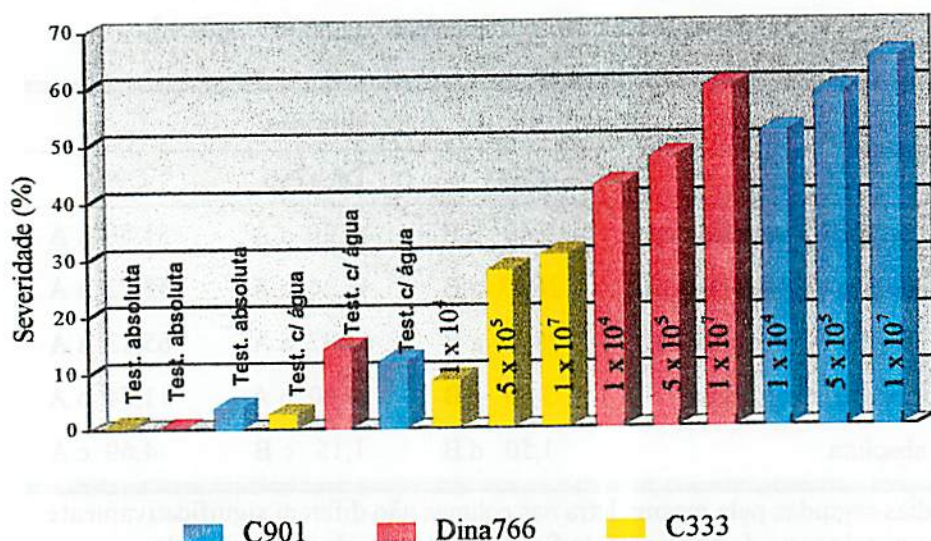


FIGURA 5. Severidade (%) de podridão de colmo causada por *F. moniliforme* nos colmos dos híbridos C333, Dina766 e C901 com aplicação de diferentes concentrações de inóculo e nas testemunhas, absoluta e inoculada com água.

A produção média de grãos mostrou diferenças significativas somente entre os diferentes híbridos (Tabela 4A). O C333, juntamente com o Dina766, diferiram do C901, sendo suas médias, respectivamente, 4,520, 4,300 e 3,971 Kg/ha (Tabela 8). As médias de produção considerando os diferentes tratamentos são mostradas na Figura 6. Os dados, principalmente das testemunhas não inoculadas, não permitem afirmações da influência direta da podridão do colmo na produção de grãos. Porém, a menor produção do C901 nos tratamentos inoculado com o fungo sugere que, para esse híbrido, os danos causados pela doença refletiu na granação. De modo geral, o nível de resistência dos híbridos pode estar relacionado com a produção de forma indireta, melhorando a qualidade do colmo.

TABELA 8. Médias da produção de grãos (Kg/ha) dos híbridos C333, Dina766 e C901.

Híbridos	Médias (%)*
C333	4,520 a
D766	4,300 a
C901	3,971 b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

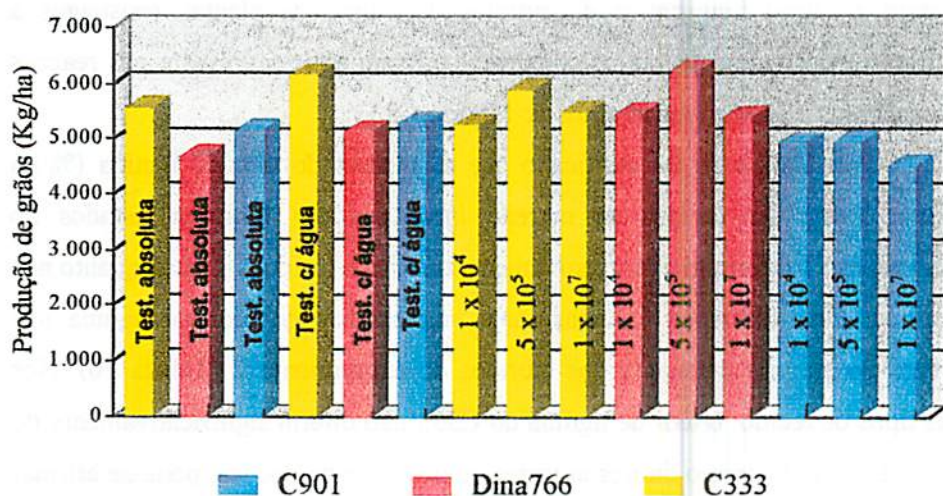
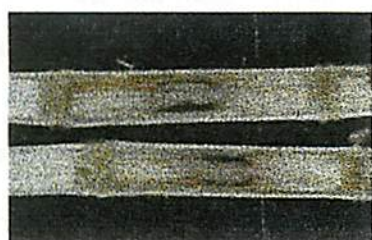


FIGURA 6. Produção de grãos (Kg/ha) dos híbridos C333, Dina766 e C901 com a utilização de diferentes concentrações de inóculo e nas testemunhas (absoluta e inoculada com água).

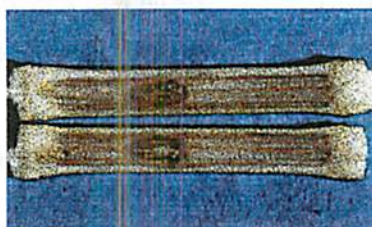
4.4 Tanino e lignina como possíveis mecanismos de resistência do colmo à podridão do colmo de milho

As análises de variância dos dados relativos aos teores de tanino no entrenó inoculado, tanto interna como externamente, não foram significativas para nenhum dos híbridos, nos dois experimentos (Tabelas 5A, 6A, 7A e 8A). Porém, o híbrido C333 mostrou reação à colonização por *F. moniliforme*. Os tecidos dos entrenós inoculados exibiram uma coloração avermelhada que não foi observada nas plantas sadias das testemunhas absoluta desse híbrido, nem nos colmos do Dina766 e do C901 (Figura 8). Barnes (1959) e Johann e Dickson (1945), Whitney e Mortimore (1962, 1960), citados por Fernandes (1975), relatam a ação fungistática de extratos de colmo de plantas resistentes à podridão. Possivelmente, outros compostos possam estar envolvidos nas reações apresentadas pelos tecidos internos do híbrido C333.

Pela Tabela 9, foi verificado que as médias do teor de lignina (% na matéria seca) dos tecidos do entrenó inoculado dos híbridos testados no experimento 1 diferiram significativamente tanto nos tecidos internos quanto nos externos. Essa diferença foi confirmada nas médias do teor de lignina nos tecidos do entrenó inoculado dos híbridos do experimento 2 (Tabela 10). Nos dois tipos de tecido, o teor de lignina do C333 não diferiu significativamente do D766. De acordo com o fatores atuantes no processo da doença, pode-se afirmar que do teor de lignina dos tecidos externos tem uma influência indireta, conferindo maior resistência ao colmo, conseqüentemente dificultando a penetração de *F. moniliforme*. Considerando-se os resultados de área lesionada nos híbridos testados, provavelmente um maior teor de lignina nos tecidos internos pode também estar contribuindo para um maior nível de resistência.



A



B

FIGURA 8. Reação dos tecidos internos do colmo dos híbridos C333 (A) e C901 (B) à colonização por *F. moniliforme* inoculado artificialmente.

TABELA 9. Médias do teor de lignina (% n matéria seca) nos tecidos do entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901, no experimento 1.

Híbridos	Médias (%)	
	tecidos internos	tecidos externos
C333	7,14 a	15,24 a
C901	6,32 b	12,22 b

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

TABELA 10. Médias do teor de lignina (% na matéria seca) nos tecidos do entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901, no experimento 2.

Híbridos	Médias (%)	
	tecidos internos	tecidos externos
C333	7,17 a	14,88 a
D766	6,68 a	14,74 a
C901	5,76 b	11,68 b

* Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5 CONCLUSÕES

- a) O nível de resistência à podridão do colmo, causada por *F. moniliforme*, foi maior no híbrido Cargill 333, seguido pelo Dina 766 e Cargill 901;
- b) Não foi possível diferenciar uma melhor idade para inoculação artificial do colmo com *F. moniliforme*; as diferentes idades refletiram em semelhantes severidades de podridão do colmo na avaliação no final do ciclo;
- c) A menor concentração de inóculo usada, 1×10^4 conídios de *F. moniliforme* por mL, permitiu a exteriorização do nível de suscetibilidade nos híbridos testados;
- d) Os teores de tanino não foram significativamente diferentes entre os híbridos, o que sugere a não influência desse composto na resistência à podridão do colmo causada por *F. moniliforme*;
- e) O híbrido Cargill 333 apresentou maior teor de lignina nos tecidos internos e externos do entrenó inoculado, sendo seguido pelo Dina 766; esses diferiram significativamente do Cargill 901, que mostrou teores menores; portanto, o nível de lignificação dos tecidos está provavelmente relacionado com resistência à podridão do colmo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agricultura moderna enfrenta diversos problemas. No cultivo de milho, a tecnologia aplicada buscando maior produtividade traz conseqüências indesejáveis como, por exemplo, o aumento da incidência de doenças muito destrutivas, como a podridão do colmo. Portanto, o processo de melhoramento genético dessa cultura carece de conhecimentos mais aprofundados sobre a podridão do colmo para que a obtenção de materiais resistentes seja mais rápida e eficiente.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que a idade de inoculação da planta com *F. moniliforme*, acima dos 30 dias após plantio, não influenciará significativamente a severidade de podridão do colmo no final do ciclo da cultura, considerando-se que foi feita apenas uma avaliação. Essa severidade e sua influência na produção de grãos ficarão na dependência do nível de suscetibilidade do material. Para um melhor esclarecimento do comportamento de *F. moniliforme* na colonização do colmo e sua interferência na produção, devem ser desenvolvidos estudos combinando diferentes épocas de inoculação e diferentes épocas de avaliação.

Verificou-se, nos experimentos, grande ocorrência de colmos com sintomas de podridão característicos de infecções por *D. maydis* e *C. graminicola*. Seria interessante um estudo comparativo envolvendo os principais fungos responsáveis por essa doença e as metodologias aplicadas na avaliação de genótipos de milho.

Outro aspecto relevante relacionado à essa doença é a necessidade de conhecer mais sobre os mecanismos de resistência, principalmente no que diz respeito à especificidade ou não quanto ao agente patogênico, o que permitirá

um melhor direcionamento no melhoramento genético é, até mesmo, a obtenção de marcador bioquímico, otimizando o processo de seleção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. **Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 9th ed.**, Washington, 1960, p.111.
- ABNEY, T. S.; FOLEY, D. C. Influence of nutrition on stalk rot development of *Zea mays*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, p. 1125-1129. 1971.
- AZEVEDO, L. A. S. **Manual de quantificação de doenças de plantas**. 114p. São Paulo. 1998.
- BACON, C. W.; HINTON, D. M.; RICHARDSON, M. D. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n° 3, p. 302-305. 1994.
- BEMILLER, J.N.; PAPPELIS, A.J. 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside in corn. I. relation of water-soluble, 1-butanol-soluble glycoside fraction content of pith cores and stalk rot resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, p. 1237-1240. 1965.
- BEMILLER, J.N.; PAPPELIS, A.J. Relationship of glycoside content to corn stalk rot resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, p. 888. 1964.
- CASA, R. T., *Diplodia maydis e Diplodia macrospora* associados à semente de milho. Viçosa: UFV, 1997. (Dissertação de Mestrado).
- CRAIG, J.; HOOKER, A.L. Relation of sugar trends and pith density to *Diplodia* stalk rot in dent corn. **Phytopathology**, St. Paul, v. 51, p. 376-382. 1961.

- DEACON, J. W. *Modern Mycology*. ed. 3. Ed. Blackwell Science 1997, 293p.
- DJORDJEVIC, J. S.; IVANOVIC, M. R. Genetic analysis for stalk lodging resistance in narrow-base maize synthetic population ZPS14. *Crop Science, Madison*, v. 36, p. 909-913. 1996.
- DREPPER, W. J.; RENFRO, B. L. Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease, St. Paul*, v. 74, n° 12, p. 952-956. 1990.
- FAO PRODUCTION YEARBOOK. Vol. 50, Roma: FAO, 1996. (FAO Statistics Series, n° 135).
- FERNANDES, F. T. Avaliação de cultivares de milho (*Zea mays* L) quanto à suscetibilidade a *Fusarium moniliforme* e *Diplodia maydis* após inoculação artificial dos colmos. Piracicaba, ESALQ, 1975. 52p.(Tese MS).
- FOLEY, D. C. A response of corn to inoculation with *Diplodia zeae* e *Gibberella zeae*. *Phytopathology, St. Paul*, v. 50, p. 146-150. 1960.
- FOLEY, D. C. Stalk deterioration of plants susceptible to corn stalk rot. *Phytopathology, St. Paul*, v. 59, p. 620-626. 1969.
- FOLEY, D. C.; WERNHAM, C. C. The effect of fertilizers on stalk rot of corn in Pennsylvania. *Phytopathology, St. Paul*, v. 47, p. 11-12. 1957.

- FUTRELL, M. C. & KILGORE, M.** Poor stands of corn and reduction of root growth caused by *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease*, St. Paul, v. 53, 213-215. 1969.
- GIGLIOTI, E. A.; CANTERI, M. G.** Desenvolvimento de software e escala diagramática para seleção e treinamento de avaliadores da severidade do colmo do complexo broca-podridões em cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, n. 3. p. 359-363. 1998.
- HEADRICK, J.M., AND PATAKY, J. K.** Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, p. 268-274. 1991.
- HEADRICK, J.M.; PATAKY, J. K.; JUVIK, J.A.** Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernel by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 80, p. 487-494. 1990.
- HOOKEER, A. L.** Association of resistance to several seedling, root, stalk and ear diseases in corn. *Phytopathology*, St. Paul, v. 46, p. 379-384. 1956.
- HOOKEER, A. L.** Factors affecting the spread of *D. zea* in inoculated corn stalks. *Phytopathology*, St. Paul, v. 47, p. 196-199. 1957.
- HSIEH, W. H.; SNYDER, W. C.; SMITH, S. N.** Influence of carbon sources, amino acids, and water potential on growth and sporulation of *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 69, n. 6, p. 602-604. 1979.

IBGE (Rio de Janeiro). Anuário estatístico do Brasil. v. 56, 1996.

KANG, M. S.; PAPPELIS, A. J.; ZUBER, M. S. Effect of stalk inoculation (*Diplodia maydis*) on parenchyma cell death in cob and stalk internodes of maize. Cereal Research Communications. v. 14, n. 3, p. 267-272. 1986.

KAPPELMAN, A. J.; THOMPSON, D. L. Inheritance of resistance to *Diplodia* stalk-rot in corn. Crop Science, Madison, v. 6, p. 288-290. 1966.

KEDERA, C. J., LESLIE, J. F., E CLAFLIN, L. E. Systemic infection of corn by *F. moniliforme*. (Abstr.) Phytopathology, St. Paul, v. 82, p. 1138. 1992.

KEDERA, C. J.; LESLIE, J. F.; CLAFLIN, L. E. Genetic diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. Phytopathology, St. Paul, v. 84, p. 603-607. 1994.

KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. Identification of a second mating population within the *F. moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. Mycologia, v. 84, n. 4, p. 541-547, 1992.

KUCHAREK, T. A., AND KOMMEDAHL, T. Kernel infection and corn stalk rot caused by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology, St. Paul, v. 56, p. 983-984. 1966.

MANUAL TÉCNICO PARA A CULTURA DO MILHO NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO. Vitória, ES. 168p. il. (EMCAPA. Documentos, 77). 1996.

- MARTIN, M.J.; RUSSELL, W.A. Correlated responses of yield and other agronomic traits to recurrent selection for stalk quality in a maize synthetic. *Crop Science*, Madison, v. 24, p. 746-750. 1984a.
- MARTIN, M.J.; RUSSELL, W.A. Response of a maize synthetic to recurrent selection for stalk quality. *Crop Science*, Madison, v. 24, p. 331-337. 1984b.
- MICHAELSON, M. E. Factors affecting development of stalk rot of corn by *Diplodia zea* and *Gibberella zea*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 47, p. 499-503. 1957.
- MUNKVOLD, G. P.; CARLTON, W. M. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plants grown from infected seeds. *Plant Disease*, St. Paul, v. 81, n. 2, 211-216. 1997.
- MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in Maize. Can we reduce their occurrence?. *Plant Disease*, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565. 1997.
- MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D.C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n. 2, p. 209-217. 1997.
- NAZARENO, N. R. X. Avaliação de perdas por podridão de colmo de milho (*Zea mays*) no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 14, n.1, p. 82-84. 1989.

- NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, v 117, p. 29-36. 1992.
- OOKA, J. J.; KOMMEDAHL, T. Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology*, St. Paul, v. 67, p. 1023-1026. 1977.
- PAPPELIS, A. J. Effect of root and leaf injury on cell death and stalk rot susceptibility in corn. *Phytopathology*, St. Paul, v. 60, p. 355-357. 1970.
- PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; GALLI, F. Manual de Fitopatologia; doenças das plantas cultivadas. São Paulo, SP: ed. Agrônômica Ceres, v. 2, p. 87-101. 1997.
- PEREIRA, O. A. P.; PEREIRA, W. S. P. Estudo de *Diplodia zea* (Shw) Lev. e *Fusarium moniliforme* Seldon em colmo de milho. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 2, n. 3, p. 157-165, 1976.
- PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays*) Controle de doenças. In: Vale, F. C. R. do, Zambolim, L. ed. Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa - MG: UFV, Dep. de Fitopatologia; Brasília - DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2v. il. 1997.
- REHN, P. N.; RUSSELL, W.A. Indirect response in yield and harvest index to recurrent selection for stalk quality and corn-borer resistance in maize. *Revista Brasileira de Genética*, v.: 9 , n. 1, p. 41-53, 1986.

- RUSSELL, W.A.** A comparison of five types of testers in evaluating the relationship of stalk rot resistance in corn inbred lines and stalk strength of the lines in hybrid combinations. **Crop Science, Madison, v. 1, p. 393-397, 1961.**
- SILVA, D. J. da.** **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).** Viçosa, UFV, Impr. Univ., 166p., 1981.
- SUMMER, D. R.** Ecology of corn stalk rot in Nebraska. **Phytopathology, St. Paul, v. 58, p. 755-760. 1968.**
- TANAKA, M. A. S.; BALMER, E.** Efeito da temperatura e dos microrganismos associados ao tombamento na germinação de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 5, p. 87-93. 1980.**
- TODD, L. R.; KOMMEDAHL, T.** Image analysis and visual estimates for evaluating disease reactions of corn to *Fusarium* stalk rot. **Plant Disease, St. Paul, v. 79, n. 9, p. 876-878. 1994.**
- TSUNECHIRO, A.** Milho, **Prognóstico Agrícola, v.2, p. 233-240. São Paulo, 1998.**
- WYSONG, D. S.; HOOKER, A. L.** Relation of soluble solids content and pith condition to *Diplodia* stalk rot in corn hybrids. **Phytopathology, St. Paul, v. 56, p. 26-35. 1966.**

[REDACTED]

YATES, I. E.; BACON, C. W.; HINTON, D. M. Effects of endophytic by
Fusarium moniliforme on Corn Growth and cellular morphology. **Plant
Disease, St. Paul, v. 81, n° 7 723-728. 1997.**



ANEXO A

	Página
TABELA 1A Resumo da análise de variância para os dados transformados $[\ln(x+1)]$ de severidade da podridão do colmo, causada por <i>F. moniliforme</i> , em diferentes tratamentos de inoculação em dois híbridos de milho.....	46
TABELA 2A Resumo da análise de variância para a produção de grãos (Kg/parcela) de dois híbridos de milho submetidos a diferentes tratamentos de inoculação.....	46
TABELA 3A Resumo da análise de variância para os dados transformados $[\ln(x+1)]$ de severidade da podridão do colmo, causada por <i>F. moniliforme</i> , em diferentes tratamentos (concentração de inóculo e testemunhas) em três híbridos de milho.....	47
TABELA 4A Resumo da análise de variância para a produção de grãos (Kg/parcela) de três híbridos de milho submetidos a diferentes tratamentos de inoculação.....	47
TABELA 5A Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.....	48
TABELA 6A Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos externos no entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.....	48
TABELA 7A Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.....	48
TABELA 8A Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos externos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.....	49
TABELA 9A. Resumo da análise de variância para os dados de teor de lignina (% de matéria seca) dos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.....	49

TABELA 10A. Resumo da análise de variância para os dados de teor de lignina (%) dos tecidos externos do entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.....	49
TABELA 11A. Resumo da análise de variância para os dados de teor de lignina (% de matéria seca) dos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.....	50
TABELA 12A. Resumo da análise de variância para o teor de lignina (% de matéria seca) nos tecidos externos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.....	50

TABELA 1A. Resumo da análise de variância para os dados transformados $[\ln(x+1)]$ de severidade da podridão do colmo, causada por *F. moniliforme*, em diferentes tratamentos de inoculação em dois híbridos de milho.

F.V.	GL	QM	F
Blocos	3	0,27258	NS
Tratamentos (T)	4	7,09710	**
Híbridos (H)	1	22,49745	**
T x H	4	0,17591	NS
Erro	27	0,11821	
Média	2,473		
CV (%)	13,90		

NS – Não significativo; * e ** - Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

TABELA 2A. Resumo da análise de variância para a produção de grãos (Kg/parcela) de dois híbridos de milho submetidos a diferentes tratamentos de inoculação.

F.V.	GL	QM	F
Blocos	3	0,21873	NS
Tratamentos (T)	4	0,36164	NS
Híbrido (H)	1	1,39652	NS
T x H	4	0,59243	NS
Erro	27	0,85350	
Média	4,419		
CV (%)	20,90		

NS – Não significativo

TABELA 3A Resumo da análise de variância para os dados transformados $[\ln(x+1)]$ de severidade da podridão do colmo, causada por *F. moniliforme*, em diferentes tratamentos (concentração de inóculo e testemunhas) em três híbridos de milho.

F.V.	GL	QM	F
Blocos	4	0,07467	NS
Tratamentos (T)	4	26,80582	**
Híbridos (H)	2	8,48626	**
T x H	8	0,85944	**
Erro	56	0,10460	
Média	2,752		
CV (%)	11,74		

NS - Não significativo; ** - Significativo a 1% de probabilidade.

TABELA 4A. Resumo da análise de variância para a produção de grãos (Kg/parcela) de três híbridos de milho submetidos a diferentes tratamentos de inoculação.

F.V.	GL	QM	F
Blocos	4	0,61186	NS
Tratamentos (T)	4	0,62951	NS
Híbrido (H)	2	1,89582	*
T x H	8	0,54803	NS
Erro	56	0,44831	
Média	4,263		
CV (%)	15,70		

NS - Não significativo; * significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 5A. Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	1	23250,710	NS
Erro	8	9409,213	
Média	746,2490		
CV (%)	12,998		

NS – Diferença não significativa a 5% de probabilidade.

TABELA 6A. Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos externos no entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	1	357,2440	NS
Erro	8	3098,749	
Média	752,4510		
CV (%)	7,398		

NS – Diferença não significativa a 5% de probabilidade.

TABELA 7A. Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	2	29747,97	NS
Erro	12	7957,059	
Média	677,0440		
CV (%)	13,175		

NS – Diferença não significativa a 5% de probabilidade.

TABELA 8A. Resumo da análise de variância para o teor de tanino (mg/100g) nos tecidos externos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	2	2812,887	NS
Erro	12	1294,750	
Média	780,2126		
CV (%)	4,612		

NS – Diferença não significativa a 5% de probabilidade.

TABELA 9A. Resumo da análise de variância para os dados de teor de lignina (% de matéria seca) dos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	1	1,681000	**
Erro	8	0,1125000	
Média	6,730000		
CV (%)	4,984		

** Significativo 1% de probabilidade.

TABELA 10A. Resumo da análise de variância para os dados de teor de lignina (%) dos tecidos externos do entrenó inoculado dos híbridos C333 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	1	22,80100	**
Erro	8	0,4675002	
Média	13,73000		
CV (%)	4,980		

** Significativo 1% de probabilidade.

TABELA 11A. Resumo da análise de variância para os dados de teor de lignina (% de matéria seca) dos tecidos internos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	1	2,594000	**
Erro	12	0,2090000	
Média	6,540000		
CV (%)	6,990		

**** Significativo 1% de probabilidade.**

TABELA 12A. Resumo da análise de variância para o teor de lignina (% de matéria seca) nos tecidos externos no entrenó inoculado dos híbridos C333, Dina766 e C901.

F.V.	GL	QM	F
Híbridos	2	16,35267	**
Erro	12	0,3606659	
Média	13,76667		
CV (%)	4,362		

**** Significativo 1% de probabilidade.**