

2.1.3.6.

INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE AVALIAÇÃO
NOS SINTOMAS INTERNOS PRODUZIDOS PELAS
INOCULAÇÕES DE *Diplodia maydis* E
Fusarium moniliforme EM COLMOS DE MILHO

Fernando Tavares Fernandes *

Eric Balmer **

INTRODUÇÃO

Um dos primeiros trabalhos no qual foi utilizada a técnica de inoculação artificial do colmo de plantas de milho, foi realizado em 1909 por HEALD *et alii* (7). Com ligeiras modificações, a inoculação artificial passou a ser utilizada em programas de melhoramento de milho (6,9), tanto no estudo da herança da resistência (1,8) como no estudo da natureza da resistência (4, 10, 20, 25).

Segundo KOEHLER (14) e JUGENHEIMER (11), a inoculação é um método eficiente para selecionar plantas resistentes às podridões do colmo. CLARK (3), embora reconhecendo que este método possa apresentar algumas limitações, considera os dados a serem obtidos como valiosos para os melhoristas.

No Brasil, a literatura revela que PAFADILLA (17) foi o primeiro a utilizar a inoculação artificial, em trabalhos de melhoramento de milho visando obter material resistente às podridões do colmo.

A eficiência da inoculação artificial vai depender de uma série de fatores como método de inoculação do inóculo utilizado, idade da planta na época da inoculação, época de avaliação dos sintomas, local de inoculação no colmo e método de avaliação dos sintomas (2, 5, 13, 15, 16, 23).

HOOKEE (9), fazendo avaliações em período de uma a quatro semanas após as inoculações com *D. zae*, observou que nas variedades suscetíveis

* Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - EMBRAPA - Caixa Postal, 151 CEP 35700 Sete Lagoas, MG

** Professor do Departamento de Fitopatologia de ESALQ/USP - Caixa Postal, 9 CEP 13400 Piracicaba, SP.

ocorria um aumento considerável na severidade dos sintomas de primeira para a segunda semana após as inoculações, sendo que este aumento foi menor para observações feitas nas duas semanas subsequentes. Nas variedades de resistência intermediária, a severidade dos sintomas aumentava muito pouco de semana para semana, enquanto que nas variedades resistentes praticamente não foi observado nenhum aumento para leituras feitas após a primeira semana. O autor concluiu que para a colonização das variedades suscetíveis por *D. zea* são requeridas no mínimo três semanas e que a avaliação deve ser feita, preferivelmente quatro semanas após as inoculações.

WYSONG e HOOKER (9), trabalhando com seis híbridos representando ciclos precoce, médio e tardio, sendo que para cada ciclo foram utilizados híbridos resistentes e suscetíveis, observaram que a maior severidade nos sintomas internos no colmo ocorria duas ou três semanas após as inoculações com *D. maydis*. Depois deste período, o processo de apodrecimento continuava a se desenvolver mas de maneira lenta.

KOEHLER (14) admite que a avaliação dos sintomas internos possa ser feita além da terceira e quarta semanas após as inoculações desde que as plantas testemunhas não tenham começado a morrer como resultado da maturidade. Neste estágio torna-se difícil avaliar a resistência com base na sintomatologia interna.

O presente trabalho teve como finalidade, estudar a melhor época para avaliação dos sintomas internos produzidos pela inoculação dos colmos de milho com *Diplodia maydis* e *Fusarium moniliforme*.

MATERIAL E MÉTODO

Foram instalados três experimentos, cada um correspondente a uma época de avaliação. O delineamento utilizado em cada um foi fatorial 2×3 , com dois cultivares, três tipos de inoculação, com quatro repetições. Foram avaliadas dez plantas por parcela. As cultivares utilizadas foram o Opaco Amarelo e o híbrido Agroceres 504 e os três tipos de inoculação foram:

1. inoculação só com *D. maydis*;
2. inoculação só com *F. moniliforme*;
3. inoculação com água.

As plantas deste último tratamento foram consideradas como testemunhas. Um outro tratamento também considerado como testemunha, consistiu de plantas que não foram nem inoculadas nem receberam ferimentos. Estas, por não terem apresentado sintomas, não entraram na análise estatística.

As plantas foram inoculadas utilizando-se uma suspensão de conídios na concentração de 8×10^6 conídios/ml, no centro do primeiro entrenó alongado acima do solo, 15 dias após 50% das plantas apresentarem pendão. A inoculação foi feita utilizando-se a bengala de inoculação descrita por KOEHLER (14).

Os conídios de *Fusarium* foram obtidos em BDA enquanto que os de *Diplodia* o foram em meio de sementes brancas de sorgo (19). As culturas apresentavam 23 dias de idade quando de sua utilização.

As plantas foram avaliadas com base nos sintomas internos, três, quatro e cinco semanas após as inoculações, respectivamente. A escala de notas utilizada foi a de DeVAY *et alii* (5) onde a nota 1 corresponde de 0 a 25% da área do entrenó inoculado apresentando sintomas; nota 2, de 26 a 50%; nota 3, de 51 a 75%; nota 4, de 76 a 100% e nota 5 quando os sintomas se estendiam aos entrenós vizinhos. As plantas apresentando ocorrência de broca não foram avaliadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância dos dados (Tabela 1) mostrou que as cultivares comportaram-se de maneira diferente, tendo o teste de Tukey a 1% de probabilidade revelado diferença significativa entre suas médias. A menor intensidade dos sintomas para o Opaco Amarelo se deve provavelmente à sua maior variabilidade genética a qual permitiu a detecção de plantas resistentes e suscetíveis enquanto que o híbrido, devido à sua menor variabilidade, apresentou reações mais ou menos uniforme de suscetibilidade.

Procurando-se estudar o efeito das inoculações dentro de cada época de avaliação, foi feito o desdobramento dos graus de liberdade para inoculações e a interação inoculações x épocas de avaliação.

As médias dos três tipos de inoculações, dentro de cada época foram:

Tipo de inoculação	3 semanas	4 semanas	5 semanas
Inoculação com <i>Diplodia</i>	3,210	3,396	3,451
Inoculação com <i>Fusarium</i>	2,519	3,421	3,337
Testemunha com fermento	1,490	2,381	3,036

O teste de Tukey a 1% de probabilidade mostrou que as médias das lesões obtidas para *D. maydis* e *F. moniliforme* e a testemunha não diferiram significativamente entre si para avaliações feitas três semanas após as inoculações, tendo *D. maydis* produzido sintomas mais severos que *F. moniliforme*. Nas demais épocas de avaliação, as médias dos sintomas produzidos pelas inoculações dos dois patógenos não diferiram significativamente entre si.

Considerando-se que, a metodologia empregada nas inoculações e o potencial de inóculo foram os mesmos para os dois patógenos e que o mecanismo de resistência à colonização por *D. maydis* e *F. moniliforme* parece

ser o mesmo (10, 21, 22), o desenvolvimento mais rápido das lesões para *D. maydis* nas avaliações feitas tres semanas após as inoculações se deve provavelmente a uma maior patogenicidade deste microorganismo quando comparada com a de *F. moniliforme*.

Pelos dados obtidos observa-se também que uma avaliação feita com base nos sintomas internos antes de decorridas quatro semanas após as inoculações, poderá conduzir ao erro de se detectar resistência a *F. moniliforme* onde ela realmente não existe. É preciso, portanto, dar tempo para que a colonização do colmo alcance um determinado grau, a partir do qual os aumentos passem a ocorrer de maneira mais lenta. Isto aconteceu quatro semanas após as inoculações.

É interessante observar a analogia dos resultados obtidos neste trabalho para *D. maydis* com aqueles obtidos por HOOKER (9). Segundo este autor, para a colonização das variedades suscetíveis, são requeridas, no mínimo três semanas e que a avaliação deve ser feita, preferivelmente, quatro semanas após as inoculações.

Avaliações feitas além da quarta semana não afetariam os resultados, uma vez que os aumentos verificados nas lesões foram pequenos. É interessante observar a semelhança entre as recomendações feitas por KOEHLER (14) e os resultados obtidos no presente trabalho. Segundo este autor, as avaliações com base na sintomatologia interna podem ser feitas além da quarta semana, desde que sejam feitas antes das plantas começarem a morrer como resultado da maturidade.

Com relação aos sintomas apresentados pela testemunha, estes não diferiram significativamente daqueles produzidos pela inoculação dos dois patógenos, para avaliações feitas cinco semanas após as inoculações. Deve ser ressaltado que após a quarta semana, algumas plantas testemunhas apresentaram contaminações naturais com *F. moniliforme*. Fato semelhante foi relatado por SUMMER (18) e KINGSLAND e WERNHAM (12). Provavelmente estas contaminações sejam responsáveis pelo aumento ocorrido nas lesões nas plantas testemunhas.

CONCLUSÕES

1. A avaliação da resistência de colmos de milho a *D. maydis* e *F. moniliforme* com base na sintomatologia interna, não deve ser feita antes de decorridas quatro semanas após as inoculações, quando estas são realizadas aproximadamente duas semanas após 50% das plantas apresentarem pendão.
2. Avaliações feitas além da quarta semana após as inoculações, não afetariam os resultados.
3. *D. maydis* mostrou-se mais patogênico que *F. moniliforme*.

TABELA 1. Análise de variância para a sintomatologia interna de colmos de milho, avaliada em diferentes épocas após as inoculações com *F. moniliforme* e *D. maydis* e inoculação com água, em plantas testemunhas com ferimento.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	F
Repetições dentro de época	9	0,3914	0,0435	
Cultivares	1	1,9405	1,9405	9,76 **
Inoculações	2	13,6038	6,8019	34,21 **
Inoculações x épocas	4	4,4866	1,1217	5,64 **
Inoculações dentro época 1	2	11,9855	5,9927	30,14 **
Inoculações dentro época 2	2	5,6332	2,8166	14,17 **
Inoculações dentro época 3	2	0,4717	0,2358	1,19 ns
Épocas de avaliação	2	10,3273	5,1637	25,97 **
Cultivares x inoculações	2	0,2370	0,1185	0,60 ns
Cultivares x épocas	2	0,6899	0,3450	1,73 ns
Cultivares x inoculações x épocas	4	0,6438	0,1610	0,81 ns
Resíduo	45	8,9478	0,1988	
Total	71	41,2681		
CV = 15,27%				

** Significância ao nível de 1% de probabilidade.

ns = não significante.

LITERATURA CITADA

- BANSAL, R. K. Study of the factors associated with resistance to stalk rot *Diplodia zeae* (Shw. Lev. in corn (*Zea mays* L.). Diss. Abstr. 29 (8):2712. In: REVIEW OF APPLIED MYCOLOGY, England, 49:86, 1970.
- CAPPELINI, R. A. A comparison of techniques and sites of inoculation in fields corn artificially inoculated with *Gibberella zeae* (Shw.) Petch. Plant Dis. Rep., Beltsville, 43(2):177-9, feb. 1959.
- CLARK, R. L. Resistance to *Diplodia* stalk rot in plant introduction corn (*Zea mays* L.), 1966-1968. Plant Dis. Rep., Beltsville, 54(7): 624-6, july, 1970.

- CRAIG, J. Physiological, chemical and morphological plant factors in *Zea mays* L. associated with *Diplodia* stalk-rot reaction. Diss. Abstr. 21 (6):1322, dec. 1960. In: REVIEW OF APPLIED MYCOLOGY, England, 40:678, 1961.
- DEVAY, J. E.; COVEY, R. P.; LINDEN, D. B. Methods for testing for diseases resistance in the corn disease nurseries at St. Paul and comparison of 110 lines of corn for resistance to diseases important in the North Central Region. Plant Dis. Rep., Beltsville, 41(8):699-702, aug. 1957.
- GRISENKO, G. W. Some properties of *Diplodia* resistance in maize. In: ALL UNION CONFERENCE ON IMMUNITY IN AGRICULTURAL PLANTS, 4., Kisinev, Rus. 1965. p.217-8.
- HEALD, F. D.; WILCOX, E. M.; POOL, V. W. The life history and parasitism of *Diplodia zeae* (Shw.) Lev. Neb. Agric. Exp. Sta. Ann. Rep., 22:1-7, 1909. Citado por: KOEHLER, B. Cornstalk rots in Illinois. Illinois, Agricultural Experiment Station, 1960. (Bulletin, 655).
- HOFFBECK, L. J. Inheritance of resistance to *Diplodia zeae*, *Gibberella zeae* on stalk breakage in corn. Diss. Abstr., 22(9):2951-2, mar. 1962. In: REVIEW OF APPLIED MYCOLOGY, England, 42:17, 1963.
- HOOKE, A. L. Factors affecting the spread of *Diplodia zeae* in inoculated corn stalks. Diss. Abstr., St. Paul, 47:196-9, 1957.
- JOHANN, E. & DICKSON, A. D. A soluble substance in corn stalks that retards growth of *Diplodia zeae* in culture. J. Agr. Res., Washington, 71:89-110, 1945.
- JUGENHEIMER, R. W. Hybrid maize breeding and seed production. Rome Food and Agricultural Organization of the United Nations, 1958, 63p.
- KINGSLAND, G. C. & WERNHAN, C. C. Etiology of stalk rots in corn in Pennsylvania. Phytopathology. St. Paul, 52(6):519-23, june 1962.
- KOEHLER, B. Corn ear rots in Illinois. Illinois, Agricultural Experiment Station, 1959. 89p. (Bulletin, 639).
- _____. Illinois, Agricultural Experiment Station, 1960. 90p. (Bulletin, 658).
- MICHAELSON, M. E. Factors affecting development of stalk rot of corn by *Diplodia zeae* and *Gibberella zeae*. Phytopathology, Saint Paul, 47(8): 499-503, aug. 1957.
- PAPPELIS, A. J. Relationship of seasonal changes in fifth condition ratings and density to *Gibberella* stalk rot of corn. Phytopathology, St. Paul, 55(6):623-6, june 1965.

PARADELLA FILHO, G. Avaliação do comportamento de populações de milho (*Zea mays* L.) inoculadas artificialmente com agentes das podridões do colmo e da espiga. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1972. 44p. (Tese de mestrado).

SUMMER, D. R. Ecology of corn stalk rot in Nebraska. Phytopathology, St. Paul, 58(6):755-60, June 1968.

WHITHEAD, M. D. Sorghum grain, a medium suitable for the increase of the inoculum for studies of soil borne and certain other fungi. Phytopathology, St. Paul, 47(7):450, July 1957.

WHITNEY, M. J. Evaluation of a bio-assay of ether extracts from inbreds for resistance to root and stalk rot. Can. J. Plant Sci., Ottawa, 42(2):302-7, Apr. 1962.

_____. Isolation of the antifungal substance, 6-methoxybenzoxazolinone, from field corn (*Zea mays* L.) in Canada. Nature, London, 184:1320, 1960.

_____ & MORTIMORE, C. G. An antifungal substance in the corn plant and its effect on growth of two stalk-rotting fungi. Nature, London, 183(4557):341, Jan. 1959.

WILLIAMS, L. E. & MENON, S. K. A corn borer technique of inoculation for plants with stalk-rot fungus. Plant Dis. Rep., Beltsville, 41(2):111-4, Feb. 1957.

ZUBER, M. S.; CROGAN, G. O.; MICHAELSON, M. E.; GEHRKE, C. W.; MONGE, J. F. Studies of the interrelation of field stalk lodging, two stalk rotting fungi, and chemical composition of corn. Agron. J., Madison, 49(6):328-31, June 1957.