

FONTES DE RESISTÊNCIA DE HELMINTOSPORIOSE EM MILHO¹

DULCE REGINA NUNES WARWICK² e HERMANN WARREN¹

RESUMO - Foram estudados diferentes tipos de resistência ao *Helminthosporium turcicum* Pass, em milho. Cultivares de milho com resistência monogênica, poligênica e resistência incompleta (HTN), a linhagem Mayorbella e cultivares susceptíveis a helmintosporiose foram comparadas sob condições de campo e em ambiente controlado, após inoculação com *H. turcicum*. Esses estudos compreenderam a comparação entre tamanhos de lesões, número de lesões por folha, desenvolvimento da lesão e formação de conídios nos diferentes hospedeiros. A reação do hospedeiro ao patógeno no campo e no ambiente controlado não foi a mesma. A resistência poligênica foi efetiva no campo, com plantas adultas, porém não nas plântulas. A linhagem Mayorbella foi susceptível no estágio de plântulas. A reação monogênica foi resistente em ambos os ambientes. Existem outros tipos de resistência, como a hipersensível HT₂ e aquela presente na linhagem Mayorbella, que oferece um mecanismo de defesa eficiente, podendo ser usado também no combate à doença.

Termos para indexação: resistência monogênica, resistência poligênica, linhagem Mayorbella, helmintosporiose, resistência incompleta HTN.

SOURCES OF RESISTANCE TO CORN LEAF BLIGHT

ABSTRACT - Different types of resistance to *Helminthosporium turcicum* were investigated. Maize inbreds with monogenic, polygenic, incomplete dominant gene for monogenic resistance (HTN), Mayorbella (a resistant breeding line) as well as inbreds susceptible "northern corn leaf blight" (N.C.L.B.) were compared under field conditions and controlled environmental conditions after inoculation with *H. turcicum*. These studies included a comparison between lesion sizes, number of lesions per leaf, time of lesion development and incidence of conidiation. The host reaction to the pathogen in the field and in the controlled environment room was not the same. Polygenic resistance was effective in the field with adult plants, but not in the seedling stage. Similarly, the resistance breeding line Mayorbella was also susceptible in the seedling stage. Monogenic type of reaction was resistant in both environments. There are other types of resistance; hypersensitive type of reaction, HT₂ and the resistance present in the breeding line Mayorbella which also can provide an effective resistance mechanism being useful disease control.

Index terms: monogenic resistance, polygenic resistance, breeding line Mayorbella, northern corn leaf blight, incomplet resistance HTN.

INTRODUÇÃO

A helmintosporiose, causada por *Helminthosporium turcicum* Pass (*Trichometosphaeria turcica* Luttrell), é uma importante doença fúngica e é encontrada na maioria das áreas úmidas onde se cultiva o milho (*Zea mays* L.).

O patógeno é composto de duas raças fisiológicas que são indistinguíveis em morfologia ou características de cultura (Berquist & Masias 1974). Essas raças, no entanto, diferem quanto à sua patogenicidade (Berquist & Masias 1974). A raça 1 é altamente viru-

lenta em milhos susceptíveis, porém causa uma pequena infecção em milhos contendo o gen HT₁. A raça 2 não é tão virulenta quanto a raça 1, mas é virulenta em milho que contém o gene HT₁.

Sintomas típicos da reação de susceptibilidade consistem em lesões longas e elípticas de 2,5 a 15 cm de comprimento, de cor marrom. Sob condições favoráveis de umidade e temperatura, o patógeno produz muitos conídios.

O primeiro tipo de resistência encontrada a *H. turcicum* foi poligênico, que causa um menor número de lesões e apresenta um pequeno decréscimo no tamanho da lesão e na quantidade de esporulação (Patterson et al. 1963).

Hooker (1961) descreveu um tipo de resistência condicionada por um gene dominante. A reação dos genótipos com este tipo de resistência é caracterizada por lesões pequenas e necróticas rodeadas por halos cloróticos que têm sua esporulação inibida. A resistência monogênica tem sido estudada extensivamente, sendo designada HT; foi determinada a sua

¹ Aceito para publicação em 7 de janeiro de 1981. Parte do trabalho de tese para obtenção do M.Sc. na Universidade de Purdue.

² Eng^o Agr^o, M.Sc. Centro Nacional de Recursos Genéticos - CENARGEN/EMBRAPA. SAIN - Parque Rural - Caixa Postal 10.2372, CEP 70.770 - Brasília, DF.

³ Professor, Ph.D. ARS, USDA, Lilly Hall of Life Sciences Building, Purdue University, W. Lafayette, 47906, U.S.A.

localização no cromossoma 2 (Patterson et al. 1963).

Num trabalho posterior, Hilu & Hooker (1963) descreveram a resistência HT em plântulas. O número e o tamanho das lesões foi reduzido sensivelmente com este tipo de resistência.

O primeiro relato de virulência de um biótipo de *Helminthosporium turcicum* em plantas possuindo o gene HT foi descrito por Berquist & Masias (1974) no Havai.

HTN, um outro importante gene para resistência a *H. Turcicum*, derivou-se da variedade mexicana Pepitilla e foi descrita por Gevers (1975) na Rodésia.

Hilu & Hooker (1965) descreveram diferente tipo de reação apresentada pela cultivar B1138t. Esta resistência é caracterizada por pequenos pontos demonstrando uma reação altamente incompatível entre o patógeno e o hospedeiro.

Recentemente, um terceiro importante gene foi identificado por Hooker (1977) na cultivar australiana NN14, que possui dois genes para resistência ao *H. turcicum*. Esses dois genes não são ligados, e o gene HT₂ condiciona um tipo de resistência em menor escala que o gene HT₁, mas quando os dois genes são incorporados em plantas, eles proporcionam um maior grau de resistência do que isoladamente.

Com o objetivo de comparar esses vários tipos de resistência a *H. turcicum*, foram realizados experimentos de campo e experimentos em salas com luz e temperatura controladas, que serão aqui relatados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para comparar o desenvolvimento da doença no campo e em outro ambiente onde a temperatura e a luz pudessem ser controladas, foi feito um estudo do processo de infecção nessas duas condições. Essas salas são conhecidas como salas de ambiente controlado.

H. turcicum, isolado de folhas infectadas de milho, foi mantido em LCH (lactose e caseína hidrolizada) em fotoperíodo de doze horas e temperatura de 22°C. Suspensões de esporos foram preparadas usando-se culturas de duas semanas, com a concentração de 3×10^4 esporos/ml e com uma gota de Tween 80 (dispersivo de esporos) para cada 100 ml de suspensão.

Foram inoculadas as seguintes cultivares:

Cultivar	Genealogia	Origem
W64 A	(WF9 x 187-2)	Wis.
Tr	Troyer Reid	Ind.
H60	(Mo 21 Z x C114) (OH 28 x OH 51 AO)	Ind.
H84	(B37 x GE 44) HT HT	Ind.
B1138t		
A632 HTN	(MT 42 x B14) B143 Pepitilla	Minn., Méx.

K64 HTN	Pride of Safina Pepitilla	Kans., Méx.
W22 HTN	2nd cycle (25 x B10) Pepitilla	Wis., Méx.
NN14 A		Austrália
NN14 B		Austrália
Mayorbella 8(x) 56		P. Rico

As plantas foram inoculadas quando estavam com cinco folhas, e, depois, incubadas por 16 horas em câmara úmida. A seguir, foram colocadas em salas de doze horas de fotoperíodo, com intensidade de luz baixa (9.600 lux) a 18 e 25°C, e ainda a 25°C, com intensidade de luz alta (37.600 lux).

As plantas foram observadas diariamente no período de duas semanas. Foram anotados o número, o tamanho de lesões por folha, e as características da pigmentação das lesões. Após quinze dias de inoculação, as folhas foram colocadas em câmaras úmidas para acelerar a formação de conídios.

Após o espaço de três a sete dias em câmara úmida, foi feita a contagem de esporos na área-base de 1 mm².

Testes de campo

Para determinar a reação de cultivares de milho ao *H. turcicum* sob condições de campo, foram plantadas as seguintes cultivares:

Cultivar	Genealogia	Origem
A619	(A171 x OH43) OH43	Minn.
A632	(Mt42 x B14) B143	Minn.
A632 HTN	(Mt42 x B14) B143. Pepitilla	Minn., Méx.
B14	(Cuzco x B14) ^a	Iowa
H84	(B37 x GE440) TH HT	Ind.
NN14		Austrália
H95	(OHb43 x C190A)	Ind.
W64 A	(WF9 x 187-2)	Wis.
W64 A x NN14		Wis., Austrália
H60	(Mo21A x C114) (OH28 x OH 51 A)	Ind.
Mayorbella	Mayorbella	P. Rico

As plantas foram inoculadas com quarenta dias de idade. Como inóculo foi usada uma suspensão de conídios na concentração de, aproximadamente, 50.000 esporos/ml. Cada planta recebeu 5ml de suspensão.

Também realizaram-se inoculações a partir de folhas secas infectadas e moídas. O processo utilizado foi o de Robert & Findley Junior (1952), por ser um método simples e prático.

As observações foram realizadas a cada dois dias, e no fim do ciclo da planta, somente uma vez por semana.

Escolheram-se, ao acaso, três plantas de cada cultivar para os estudos. Todas as lesões foram contadas e medidas. A avaliação dos resultados foi expressa em: número de lesões em cada folha, aumento do tamanho da lesão, esporulação em condição de campo e/ou sob condições de câmara úmida, e ain-

da a ocorrência de lesões secundárias. Foram anotadas as temperaturas diárias, a precipitação e a umidade relativa, e relacionadas ao desenvolvimento do processo de infecção.

Esses experimentos foram conduzidos durante os verões de 1976 e 1977 e os métodos usados foram os mesmos em ambas ocasiões.

Processo de infecção sob condições de ambiente controlado

Os sintomas da doença manifestaram-se no espaço de dois a três dias após inoculação, sob condições de ambiente controlado. Observaram-se inicialmente, nos tecidos lesionados da folha da planta inoculada, pequenas pontuações de cor marrom-clara, simultaneamente em folhas susceptíveis assim como nas resistentes. Essas pontuações permaneceram inalteradas por nove dias à temperatura de 25°C, e por onze dias à temperatura de 18°C. Os parâmetros utilizados foram os seguintes:

- O tamanho médio das lesões mostrou claramente a diferença entre as cultivares. Aquelas susceptíveis, como resistência poligênica, e a linhagem Mayorbella mostraram as maiores lesões, com o tamanho médio variando de 110 a 160 mm² (Tabela 1). As lesões das cultivares com resistência monogênica, representadas pelas cultivares H84 e NN14 apresentaram tamanho médio das lesões de 75 mm².

As cultivares B1138t e W22 HTN apresentaram uma reação de hipersensibilidade, caracterizada por pontuações de 2 mm² de tamanho, enquanto que a cultivar K64 apresentou dois tipos de reações: pequenas pontuações e lesões do tipo susceptível.

O desenvolvimento do tamanho da lesão foi medido diariamente, para obter um padrão do desenvolvimento da doença.

A medida da lesão foi tomada sempre no sentido longitudinal, que corresponde ao da maior dimensão. Em cultivares susceptíveis, as lesões mediam de

30 a 45 mm de comprimento, quatorze dias depois da inoculação. A mais óbvia diferença entre os processos de infecção nas temperaturas de 18°C e 25°C foi o aparecimento de sintomas com dois dias de antecedência em plantas que estavam a 25°C.

A formação de lesões na cultivar H60 foi retardada, especialmente a 18°C. As lesões apareceram somente quatorze dias após a inoculação. Este retardamento é considerado como um tipo de resistência.

O tamanho das lesões nas cultivares A632 HTN, NN14 e H84 não aumentou durante o experimento. Também, não houve progresso na reação de hipersensibilidade das cultivares B1138t, W22 HTN e K64 HTN.

- A ausência da formação de conídios do *H. turcicum* é uma importante indicação de resistência. Duas semanas após a inoculação, foram retiradas amostras de área infectada das folhas de cada cultivar e colocadas em câmara úmida em temperatura ambiente. A produção de conídios na área de 1 mm² foi contada com três e sete dias de incubação (Tabela 2).

Nas lesões das cultivares B1138t e W22 HTN, não houve a formação de esporos, e nas cultivares H84 H60, A632 HTN, foi retardada. As lesões de H60 apresentaram uma abundante esporulação, mas os esporos formaram-se sete dias após incubação, com mais demora que as reações susceptíveis das cultivares W64A, Tr e A632 que esporularam após três dias em câmara úmida (Tabela 2).

Processo de infecção sob condições de campo

Duas semanas após a inoculação, foram observadas lesões com coloração verde-escura nas cultivares susceptíveis e, simultaneamente, pequenas lesões cloróticas com halos amarelados foram observadas em cultivares resistentes.

Nas cultivares susceptíveis, as lesões aumentaram rapidamente em tamanho, e houve abundante for-

TABELA 1. Tipo de reação e tamanho médio* das lesões em cultivares, híbridos e linhagens de milho, quatorze dias após a inoculação com *H. turcicum* em ambiente controlado a 18°C.

Cultivar	Tipo de reação	Tamanho médio da lesão em mm ²
W64A	Lesões necróticas	160
Tr	Lesões necróticas	120
H60	Pequenas lesões	8
H84	Lesões cloróticas	75
B1138t	Pequenas pontuações	2
K64 HTN	Pequenas pontuações e lesões	2 e 130
W22 HTN	Pequenas pontuações	2
A632 HTN	Lesões necróticas	120
A632 HTN	Lesões cloróticas	30
NN14	Lesões cloróticas	36
Mayorbella 8 (x)56	Lesões necróticas	110

* Tamanho médio tomado de 10 lesões.

mação de conídios, quando em presença de ambiente úmido. Nas cultivares e híbridos resistentes, porém, as pequenas lesões aumentaram pouco em tamanho, e a produção de conídios foi escassa mesmo após longos períodos com umidade favorável.

Foram usados os seguintes parâmetros para caracterizar o processo de infecção nas condições de campo: percentagem de área infectada, tamanho das lesões, esporulação nas condições de campo e infecções secundárias.

a. A percentagem da área infectada foi usada pa-

TABELA 2. Número de esporos produzidos por *Helminthosporium turcicum* em câmara úmida em folhas de milho susceptíveis e resistentes.

Cultivar	Número médio de esporos*	
	3 dias**	7 dias
W64A	+50	+50
Tr	+50	+50
H84	-	2
B1138t	-	-
A632 (HTN(s))	+50	+50
A632 HTN	-	-
W22 HTN	-	-
K64 HTN	12	30
NN14	-	10
H60	-	30
Mayorbella 8(x)56	24	+50

* O número é a média de conídios em mm² de área infectada

** Dias em câmara úmida

ra observar o desenvolvimento diário do processo de infecção do *H. turcicum*. As cultivares A619, A632, B14, H95, W64A e NN14 (Tabela 3) tiveram um aumento rápido na área infectada, enquanto na cultivar H60 a formação de lesões foi retardada.

b. O tamanho da lesão foi usado para classificar as cultivares em resistentes e susceptíveis.

As lesões foram medidas utilizando-se um planímetro, um mês após a inoculação. As cultivares susceptíveis mostraram as maiores lesões, e as resistentes monogênicas, as menores (Tabela 4); as cultivares B1138t e linhagem MB 8(x)56, sob condições de campo, apresentaram pequenas pontuações menores de 1 cm².

c. A habilidade que algumas cultivares têm para formar conídios sob condições de campo foi também usada para classificar as cultivares. As contagens foram realizadas quando as condições de umidade eram favoráveis ao aparecimento de esporos; na Tabela 5, observa-se que as cultivares susceptíveis e com resistência poligênica tiveram abundante esporulação, enquanto cultivares com o gene HT₁, HT₂, HTN e a linhagem Mayorbella não mostraram esporulação.

d. Anotações sobre infecção secundária foram tomadas dois meses após a inoculação, e observou-se uma maior área atacada nas plantas susceptíveis em razão da infecção secundária, do que nas cultivares resistentes.

As reações susceptíveis no campo em plantas adultas mostraram-se mais definitivas que as reações

TABELA 3. Percentagem de área infectada de milho* inoculado com *H. turcicum* em condições de campo

Cultivares	Dias após a inoculação									
	15	19	23	27	31	35	39	43	47	51
A619	14,7	22,3	23,7	36,7	60,1	68,3	86,0	86,7	88,0	94,0
A632	14,0	18,0	19,7	50,5	65,0	85,0	95,0	-	-	-
A632 HTN	5,0	5,0	6,0	6,5	-	-	-	-	-	-
B14	17,3	24,3	35,7	65,0	71,7	73,3	81,7	-	-	-
B1138t	-	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	6,3	6,3	6,7
H84	6,3	7,3	8,7	8,7	9,7	11,7	-	-	-	-
NN14	-	21,7	23,0	24,7	24,7	40,0	46,7	-	-	-
H95	-	-	11,3	14,7	21,3	25,0	45,0	70,2	70,2	90,0
W64A	-	-	3,3	10,7	15,0	33,0	63,5	85,4	85,4	100,0
W64A x NN14	3,7	4,0	4,3	6,0	7,3	9,7	9,7	-	-	-
H60	-	-	-	-	-	-	-	7,1	7,1	33,2
Mayorbella	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Para cada cultivar foi observada a área foliar de cada cinco folhas

nas plântulas; as reações susceptíveis foram de 20 a 30 vezes maiores que as reações resistentes. A formação de conídios foi abundante quando a umidade se aproximou do índice de 100% por mais de sete horas.

TABELA 4. Tamanho médio* das lesões em cm², 30 dias após a inoculação em condições de campo, com *H. Turcicum*.

Cultivar	Reação	Tamanho de lesão em cm ²
A619	Lesões necróticas	6,30
A632	Lesões necróticas	5,90
A632 HTN	Lesões cloróticas	-
B14	Lesões necróticas	7,60
B1138t	Pequenas pontuações	40,00
H80	Lesões cloróticas	1,80
NN14	Lesões cloróticas	1,60
H95	Lesões necróticas	4,50
W64A	Lesões necróticas	10,10
W64A x NN14	Pequenas lesões	3,60
H60	**	-
Mayorbella	Pequenas pontuações	20,00

* Média tomada de 10 lesões.

** A primeira lesão da cultivar H60 apareceu 40 dias após a inoculação.

TABELA 5. Número médio de conídios de *H. turcicum* contados em 1 mm² de área infectada*. Essas contagens foram somente feitas quando as condições de umidade no campo foram favoráveis à esporulação.

Cultivares de milho	2 semanas**	Nº de esporos 4 semanas	6 semanas**
A619	25	28	50
A632	1	70	60
A632 HTN	-	-	-
B14	40	51	30
B1138	-	-	-
H84	-	-	-
W64A	-	-	-
W64A x NN14	-	25	30
H60	-	2	5
Mayorbella	-	-	-

* As contagens foram repetidas cinco vezes.

** Semanas após a inoculação

Gevers (1975) descreveu o HTN "como um gene dominante mas não completamente estável". Uma das explicações oferecidas para as diferentes reações observadas nos híbridos com HTN é que existiria mais de um gene dominante nesses híbridos. Ou então esse gene não oferece uma completa barreira contra o fungo.

A cultivar H60 demonstrou, em condições de campo, um desenvolvimento da doença mais tardio que as cultivares susceptíveis; esse tipo de resistência é considerado como poligênico.

A linhagem Mayorbella, que ainda não foi descrita, apresentou resistência de campo, ou seja, somente foi resistente em condições naturais, mas como plântula demonstrou susceptibilidade.

CONCLUSÕES

1. Os estudos referentes à resistência de cultivares de milho não podem ser realizados apenas em salas de ambiente controlado e usando-se apenas plantas jovens.

2. A resistência da linhagem Mayorbella e da cultivar Tr (com resistência poligênica) não foi efetiva quando a planta encontrava-se no estágio de plântula; esta resistência só é efetiva quando a planta encontra-se em estágio adulto.

3. É suficientemente claro que o mecanismo de resistência a *H. turcicum* não é ativado no começo do processo de infecção, mas deve ocorrer mais tarde.

4. A reação à infecção de *H. turcicum* mostrada pela cultivar B1138t foi a de pequenas pontuações. Este tipo de resistência pode ser utilizado nos programas de melhoramento, porém esta cultivar apresentou baixo vigor.

5. O cruzamento entre Mayorbella e a cultivar H60 demonstrou ser altamente resistente; portanto, pesquisas poderão ser conduzidas em ordem de diferentes genótipos para uma resistência mais efetiva em vez de se basearem num simples gene para os vários programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

- BERQUIST, R.R. & MASIAS, O.R. Physiologic specialization in *Trichometasphaeria turcica* f. sp. *zea* and *T. turcica* f. sp. *sorghii* in Hawaii. *Phytopathology*, 64:645-9, 1974.
- GEVERS, H.D. A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize. *Plant. Dis. Rep.*, 59:295-9, 1975.
- HILU, H. & HOOKER, A.L. Localized infection by *Helminthosporium turcicum* on corn leaves. *Phytopathology*, 55:189-92, 1965.

- HILU, H. & HOOKER, A.L. Monogenic chlorotic lesion resistance to *Helminthosporium turcicum* in corn seedlings. *Phytopathology*, 53:909-12, 1963.
- HOOKER, A.L. A new type of resistance in corn to *Helminthosporium turcicum*. *Plant. Dis. Rep.*, 45:780-1, 1961.
- HOOKER, A.L. A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop. Sci.*, 17:132-5, 1977.
- PATTERSON, E.B.; HOOKER, A.L. & HAGAN, W. L. Location of a dominant gene in maize for resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Maize Genet. Coop. News Letter*, 37:45, 1963.
- ROBERT, A.L. & FINDLEY JUNIOR, W.R. J. Diseased corn leaves as a source of infection in artificial and natural epidemics of *Helminthosporium turcicum*. *Plant. Dis. Rep.*, 36:9-10, 1952.