

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Puccinia polysora*, AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DO MILHO, QUANTO AOS COMPONENTES DE AGRESSIVIDADE¹

GLADYS ALVARENGA FERREIRA DE ANDRADE²

CARLOS ROBERTO CASELA³

MÁRIO SOBRAL DE ABREU⁴

RESUMO - Foram utilizados neste trabalho vinte isolados monopustulares de *Puccinia polysora* Underw, coletados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, os quais foram caracterizados quanto a agressividade, em um genótipo susceptível de milho (*Zea mays* L.), em casa-de-vegetação. Plântulas, no estágio de quatro a cinco folhas, foram pulverizadas com suspensões uniformes de uredosporos desses isolados. Foram avaliados o período latente médio, o período infeccioso, a produção de uredosporos, o número total de pústulas, o número de

pústulas/cm², o número de uredosporos/pústula e a possível relação entre agressividade e origem dos isolados. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com oito repetições para cada tratamento. As análises de variância dos dados obtidos, baseando-se na produção de uredosporos, número total de pústulas, número de pústulas/cm² e número de uredosporos/pústula, indicaram diferenças significativas entre os isolados, evidenciando variação na agressividade dos mesmos.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Agressividade, *Puccinia polysora*, milho, ferrugem do milho, resistência.

CHARACTERIZATION OF *Puccinia polysora* ISOLATES, THE CAUSAL ORGANISM OF CORN RUST, IN RELATION TO COMPONENTS OF AGGRESSIVENESS

ABSTRACT - Twenty single pustule isolates of *Puccinia polysora* Underw obtained from experiment plots in Southern and Southeastern regions of Brazil, were characterized for aggressiveness to a susceptible maize (*Zea mays* L.) genotype in the greenhouse. Plants in the four to five-leaf stage were sprayed with a uniform spore suspension of each isolated. The latent period, infectious period, urediniospore production, total number of pustules, number of pustules/cm²,

number of urediniospores/pustule and a possible relationship between aggressiveness and origin of isolates were evaluated. A randomized complete block experimental design with eight replications per treatment was used. The analysis of variance indicated significant differences among isolates for urediniospore production, total number of pustules, number of pustules/cm² and number of urediniospores/pustule, which was an indication of variation for aggressiveness among isolates.

INDEX TERMS: Aggressiveness, *Puccinia polysora*, maize, corn rust, resistance.

INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.), não somente no Brasil, mas em todo o mundo, é considerada de suma importância, tanto econômica quanto social. Re-

presentando cerca de 40% da safra de grãos do País, tem sua produtividade ameaçada por um grande número de enfermidades, dentre as quais se destaca a ferrugem polysora, causada por *Puccinia polysora*.

1. Parte da dissertação apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS(UFLA), pela primeira autora, para a obtenção do grau de mestre em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia.

2. Engenheira Agrônoma, M.Sc., Departamento de Fitopatologia/UFLA, Caixa Postal 37, 37.200-000 - Lavras - MG.

3. Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da EMBRAPA/Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, Km 65, MG 424, 35.701970, Sete Lagoas, MG.

4. Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Professor titular do Departamento de Fitossanidade/UFLA.

No Brasil, a ferrugem *polysora* é encontrada em todas as regiões, sendo que sua incidência vem adquirindo caráter epidêmico no Sudoeste de Goiás, Triângulo Mineiro, Noroeste de São Paulo, Oeste e Norte do Paraná e Mato Grosso do Sul, locais onde a produção de milho só tem sido possível com a utilização de cultivares resistentes (EMBRAPA, 1997).

O aumento na incidência e severidade dessa doença pode estar associado a diversas razões, destacando-se a freqüente introdução de cultivares comerciais mais produtivas, porém susceptíveis, e os plantios de safrinha, que podem contribuir para a perpetuação do patógeno e aumento do inóculo (EMBRAPA, 1997).

Os sintomas da infecção por *P. polysora* se assemelham aos sintomas causados por *P. sorghi* Schw, porém, com diferenças marcantes. As urédias são predominantemente circulares, abundantes e uniformemente distribuídas principalmente na face superior das folhas. Os uredosporos são amarelo-avermelhados, ovais a irregulares e relativamente grandes (20-29 x 29-40 μ m). Os uredosporos de *P. sorghi*, por sua vez, são mais escuros, globosos, menores e moderadamente equinulados. As urédias são mais alongadas e encontram-se esparsamente distribuídas pela planta (EMBRAPA, 1997; Shurtleff, 1986 e 1992).

Puccinia polysora geralmente infecta folhas expostas da planta e entre seus danos podem-se incluir a diminuição do vigor das plantas, clorose, seca e morte prematura das folhas, redução na quantidade e peso dos grãos e acamamento (Futrell, 1975). *P. polysora* é considerado um patógeno altamente destrutivo quando comparado com *P. sorghi*, pois pode causar morte precoce da planta infectada (Scott, King e Armour Jr., 1984).

Isolados de um mesmo patógeno, virulentos a um hospedeiro, podem variar em agressividade (Thakur e Shetty, 1993). A agressividade é caracterizada pelo tempo requerido para que os isolados incitem a mesma quantidade de doença e pode ser medida, quantitativamente, pela avaliação de alguns componentes como, por exemplo, período latente, taxa de esporulação, período infeccioso, número de pústulas e número de pústulas/cm² (Bergamim Filho e Kimati, 1995; Nelson, 1973; Van der Plank, 1968).

Segundo Wheeler (1976), a variabilidade dos patógenos é uma grande limitação em programas de melhoramento de plantas para resistência a doenças. As alterações em variedades tidas como resistentes, passando a susceptíveis, são devidas não a mudanças em si mesmas, mas a modificações genéticas no agente causador da doença.

Moncilovic e Jerkovic (1985) encontraram grandes diferenças na patogenicidade de isolados de *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* da América do Norte e Europa. Para eles, análises da patogenicidade de ferrugens podem ter os seguintes objetivos: fornecer informações sobre a patogenicidade de populações de patógenos para guiar programas de melhoramento de plantas e/ou fornecer informações para estudos epidemiológicos. Segundo esses autores, no caso de ferrugens, seu controle deve ser feito pela criação de variedades resistentes, necessitando-se determinar a patogenicidade da população do parasita e, a seguir, procurar incorporar resistência ao hospedeiro.

Hamid, Ayers e Hill (1982) apresentaram uma variação considerável entre isolados da raça 3 de *Cochliobolus carbonum* em relação à eficiência da doença, à capacidade de esporulação e ao número de lesões resultante de uma determinada quantidade de inóculo, mas afirmaram que é de grande importância a avaliação do período latente e do período infeccioso nesse tipo de trabalho.

A variação em patogenicidade também foi relatada em muitos outros patossistemas, como por exemplo, batata-*Phytophthora infestans* (Caten, 1974), milho-*Cercospora zea-maydis* (Bair e Ayers, 1986), arroz-*Pyricularia oryzae* (Bonman et al., 1989), cevada-*Ustilago hordei* (Gaudet e Kiesling, 1991), arroz-*Magnaporthe grisea* (Roumen, 1992 a, b), sorgo-*Colletotrichum graminicola* (Pande et al., 1991; Casela e Fredriksen, 1994), painço-*Sclerospora graminicola* (Thakur e Shetty, 1993), trigo-*Puccinia recondita* (Lehman e Shaner, 1996), entre outros.

Em relação a *Puccinia polysora*, a variação em patogenicidade foi primeiramente observada por Storey e Ryland (1954). Esses autores identificaram três raças fisiológicas, EA1, EA2 e posteriormente a EA3. Robert (1962) diferenciou mais seis novas raças (PP3, PP4, PP5, PP6, PP7 e PP8). Foi encontrada resistência para

todas essas raças, entretanto, esta era tão facilmente quebrada que linhagens ditas resistentes nunca chegaram a ser comercializadas, nem mesmo melhoradas. Ullstrup (1965) identificou mais uma raça, em Indiana, EUA, denominada PP9. Yeh (1986), em Taiwan, identificou outras seis raças, as quais denominou PP10, PP11, PP12, PP13, PP15 e PP16, confirmando, assim, a alta variabilidade desse patógeno.

O levantamento da agressividade de isolados de *Puccinia polysora* é uma etapa de grande importância para se traçar estratégias em programas de melhoramento visando à resistência a essa doença. Contudo, ainda é escasso o número de trabalhos neste sentido, apesar de essa doença estar alcançando uma posição de destaque na cultura de milho. O objetivo deste trabalho foi caracterizar vinte isolados de *Puccinia polysora* em relação aos componentes da agressividade.

Foi utilizado neste trabalho uma cultivar de milho selecionado com base na sua suscetibilidade a *P. polysora*, apresentada tanto em observações feitas em experimentos de campo quanto em inoculações artificiais, com diferentes isolados do patógeno, em casa-de-vegetação. Plântulas desse material foram inoculadas com vinte isolados monopustulares de *P. polysora*, provenientes de lavouras comerciais das Regiões Sul e Sudeste do Brasil (Capinópolis-MG, Sete Lagoas-MG, Jacarezinho-PR e Cascavel-PR), onde a ferrugem *polysora* tem sido observada. Esses isolados foram coletados no verão de 1994/1995 e de 1995/1996 e multiplicados em casa-de-vegetação, na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas.

Foram semeadas sete sementes da cultivar, selecionadas por vaso, contendo solo de campo adubado segundo resultados da análise de solo. Dois dias após a emergência das plantas, foi feito o desbaste, deixando-se quatro plantas por vaso.

O inóculo foi produzido a partir de uredosporos coletados em folhas de uma cultivar susceptível, em casa-de-vegetação. Os uredosporos foram coletados com o auxílio de espátulas e transferidos para vidros de relógio flambados, sendo, em seguida, armazenados em microtubos Eppendorf.

Para o preparo do inóculo, os uredosporos de cada isolado foram colocados em 40ml de água destilada na qual foi adicionada uma gota de Tween 20. Logo após, procedeu-se à agitação da suspensão em agitador magnético, por um período de três a cinco minutos.

A concentração da suspensão obtida foi determinada em câmara de Neubauer e padronizada para 2×10^4 uredosporos/ml de água destilada (Zummo, 1988).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, sendo vinte isolados de *P. polysora* e uma cultivar de milho, totalizando vinte tratamentos, repetidos oito vezes. Cada vaso, contendo quatro plantas, foi considerado como uma unidade experimental.

As inoculações foram feitas em plântulas no estádio de quatro a cinco folhas ao entardecer (Zummo, 1988). Antes da inoculação, foi retirada manualmente a cerosidade existente na superfície das folhas para aumentar a aderência das suspensões a serem inoculadas. Foram pulverizados 10ml de suspensão por vaso. Após a inoculação, os vasos foram colocados em câmara úmida com 100% de umidade relativa, por um período de 14 horas, a uma temperatura de 25 a 30°C. Depois desse período, os vasos foram transferidos para as bancadas da casa de vegetação, a uma temperatura de 25 a 45°C e 80 a 100% de umidade relativa.

As avaliações foram feitas na primeira folha, abaixo da folha mais nova, de dois em dois dias, sempre a mesma hora. Foram avaliadas áreas de dezoito centímetros de comprimento, sendo desprezadas as extremidades das folhas.

Foram considerados como componentes da agressividade o período latente médio, o período infeccioso, o número total de pústulas, o número de pústulas/cm², a produção de uredosporos e o número de uredosporos/pústula, definidos a seguir. Também foi avaliada a relação entre agressividade e origem dos isolados pela observação dos dados da Tabela 1.

Período latente médio (PL₅₀): considerou-se como PL₅₀ o tempo médio requerido entre a inoculação e a presença de cinquenta por cento das pústulas em esporulação; para isso, contou-se o número de pústulas até que todas estivessem rompidas.

Número total de pústulas: foi determinado paralelamente à avaliação do PL₅₀, contando-se o número de pústulas em esporulação, até que este se mantivesse constante.

Número de pústulas/cm² (P/cm²): foram feitas cinco contagens, ao acaso, por folha, no primeiro dia após o rompimento de todas as pústulas, com o auxí-

lio de uma régua de cartolina contendo um orifício em formato quadrado, com área de um centímetro quadrado.

Produção de uredosporos: os uredosporos foram coletados com o auxílio de uma espátula e armazenados em copos plásticos, à medida em que se procedia à contagem das pústulas. Um mililitro de água destilada com Tween 20 (quatro gotas por litro de água destilada) foi adicionado em cada copo plástico. Após agitação, a quantidade de uredosporos presente na suspensão foi determinada pela contagem de três amostras, em câmara de Neubauer.

Número de uredosporos/pústula: foi obtido pela razão entre o número de uredosporos pelo número total de pústulas.

Período Infecioso (PI): foi determinado como sendo o período de tempo em que as urédias permaneceram esporulando.

Os dados obtidos para todos esses componentes foram transformados por $\log(x+2)$ e submetidos a análises de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *P. polysora* apresentaram diferenças entre si quando se avaliaram o número total de pústulas, número de pústulas/cm², produção de uredosporos e número de uredosporos/pústula. Essas diferenças ocorreram não apenas entre locais, mas também dentro de um mesmo local de origem dos isolados (Tabela 1).

Os isolados não apresentaram diferenças significativas quando se consideraram o período infeccioso e o período latente médio, ou seja, os componentes da agressividade relacionados ao tempo não foram bons critérios para diferenciação dos isolados em plântulas de milho no estádio de quatro a cinco folhas (Tabela 1). Entretanto, pelo menos para o PI, há uma tendência de diferenciação entre os isolados. Esse resultado deve ser cautelosamente observado, pois em se tratando de um patógeno de infecção policíclica, um acréscimo de 3,75 dias na produção de uredosporos pode significar um grande aumento na quantidade de doença no campo, ou seja, deve-se considerar a hipótese do efeito cumulativo do PI por vários ciclos da infecção, da mesma forma

como ressaltado por Statler e Parlevliet (1987). Segundo Parlevliet (1975) e Zadoks e Schein (1979), para doenças policíclicas, como a ferrugem, pequenas diferenças em resistência podem beneficiar programas integrados de controle de doenças.

Um isolado de um fungo fitopatogênico é tido como mais agressivo em relação a outros isolados, se ele for capaz, em um determinado hospedeiro, de produzir mais uredosporos, mais pústulas, mais uredosporos/pústula, mais pústulas/cm², e se tiver um período latente mais curto e um período infeccioso mais longo (Nelson, 1973). O presente trabalho mostrou que há diferenças em agressividade entre os isolados de *Puccinia polysora*, quando, pelo menos, algumas dessas características são consideradas, e que a variação entre os isolados não foi associada aos seus locais de origem. Esses resultados indicam que os isolados de *Puccinia polysora* podem estar diferentemente adaptados aos genótipos hospedeiros no campo.

Pesquisas visando à identificação de resistência à ferrugem *polysora* têm indicado a existência de linhagens, híbridos e genótipos que diferem quanto ao nível de resistência à doença. Contudo, ainda são poucos os trabalhos que caracterizam a variabilidade entre isolados de *P. polysora*, aspecto importante para a criação de estratégias para controle dessa doença. Os resultados sugerem que a seleção de material resistente a isolados mais agressivos, como o 8.96 (Jacarezinho) e o 34.96 (Capiópolis), seria de grande utilidade na identificação de uma resistência estável a populações do patógeno, pelo menos nesses locais.

CONCLUSÕES

a) Considerando-se a produção de uredosporos, número total de pústulas, número de uredosporos/pústula e número de pústulas/cm², os vinte isolados de *Puccinia polysora*, coletados em Jacarezinho, Cascavel, Capiópolis e Sete Lagoas, apresentaram diferenças em agressividade.

b) Os componentes da agressividade relacionados ao tempo, como o PL e o PI, não foram bons critérios para diferenciar isolados de *Puccinia polysora* em plântulas de milho no estádio de quatro a cinco folhas.

TABELA 1 - Número total de pústulas (NP), número de pústulas/cm² (P/cm²), produção de uredosporos (PE), número de uredosporos/pústula (PE/NP), período infeccioso (PI) e período latente (PL) de vinte isolados (ISO) de *Puccinia polysora* em plântulas de milho, em casa de vegetação. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 1997.

ISO	ORIGEM	NP	P/cm ²	PE	PE/NP	PL	PI
4	Jacarezinho	5,06 d *	1,41 c	13.042 c	5.409	10,50 a	15,25 a
7	Jacarezinho		3,53 c	24.056 c	1.886 b	9,50 a	16,50 a
8	Jacarezinho	63,84 a	16,22 a	157.703 a	2.754 a	9,63 a	19,00 a
9	Jacarezinho	30,38 b	8,56 b	56.789 b	2.208 b	10,25 a	17,00 a
13	Jacarezinho	21,53 c	4,44 c	47.326 c	2.147 b	9,38 a	17,50 a
15	Jacarezinho	23,78 c	3,66 c	62.716 c	2.554 a	8,88 a	17,25 a
22	Cascavel	14,44 c	2,25 c	27.045 c	1.866 b	10,00 a	16,75 a
23	Cascavel	22,53 c	6,34 b	36.282 c	1.723 b	10,75 a	17,75 a
24	Cascavel	13,31 c	3,66 c	33.603 c	2.579 a	10,75 a	17,00 a
26	Cascavel	10,50 c	2,69 c	21.768 c	2.139 b	10,75 a	18,25 a
27	Cascavel	11,28 c	2,72 c	30.914 c	2.745 a	10,00 a	18,25 a
28	Cascavel	13,41 c	2,78 c	33.544 c	2.831 a	9,88 a	17,50 a
30	Cascavel	16,75 c	3,63 c	24.910 c	1.598 b	10,38 a	16,75 a
34	Capinópolis	35,00 b	6,97 b	70.214 b	2.143 b	10,38 a	19,00 a
35	Capinópolis	14,50 c	3,38 c	36.619 c	2.358 a	9,63 a	17,75 a
36	Capinópolis	14,34 c	3,25 c	28.971 c	2.258 a	10,75 a	16,50 a
11B	Capinópolis	19,13 c	3,78 c	31.107 c	1.634 b	10,50 a	17,50 a
13B	Capinópolis	20,66 c	6,84 b	60.436 b	3.121 a	9,75 a	18,75 a
6B	Sete Lagoas	32,31 b	7,22 b	63.946 b	2.021 b	10,00 a	18,00 a
6C	Sete Lagoas	23,34 c	4,88 c	52.076 b	2.490 a	9,63 a	18,50 a
CV (%)		16,82	25,18	5,67	5,41	5,08	3,88

* Médias com a mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIR, W.; AYERS, J.E. Variability in isolates of *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, n.2, p.129-132, Feb. 1986.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H; AMORIM, L. Controle Genético. In: MONTEIRO, A. R.; BERGAMIN FILHO, A.; LEITE, B.; et al. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. Cap.37, v.1, p.732-733.
- BONMAN, J.M.; BANDONG, J.M.; LEE, Y.H.; LEE, E.J.; VALENT, B. Race-specific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, n.6, p.496-499, June 1989.
- CASELA, C.R.; FREDRIKSEN, R.A. Pathogenic variability in monoconidial isolates of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola* from single lesions and from monoconidial cultures. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.149-153, jun. 1994.
- CATEN, C.E. Intra-racial variation in *Phytophthora infestans* and adaptation to field resistance for potato blight. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.77, p.259-270, 1974.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1997. 80p. (Circular Técnica, 26).
- FUTRELL, M.C. *Puccinia polysora* epidemics on maize associated with cropping practice and genetic homogeneity. **Phytopathology**, St. Paul, v.65, n.9, p.1040-1042, Sept. 1975.
- GAUDET, D.A.; KIESLING, R.L. Variation in aggressiveness among and within races of *Ustilago hordei* on barley. **Phytopathology**, St. Paul, v.81, n.11, p.1385-1390, Nov. 1991.
- HAMID, A.H.; AYERS, J.E.; HILL Jr., R.R. Host X isolate interactions in corn inbreds inoculated with *Cochliobolus carbomum* race 3. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, n.9, p.1169-1173, Sept. 1982.
- LEHMAN, J.S.; SHANER, G. Genetic variation in latent period among isolates of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* on partially resistant wheat cultivars. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.5, p.633-641, May 1996.
- MOMCILOVIC, V.; JERKOVIC, Z. Inheritance of resistance to *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* form four resistance sources. **Zast-Belja-Plant-Protection**, Beograd, v.36, n.1, p.13-17, 1985.
- NELSON, R.R. **Breeding plants for disease resistance: concepts and applications**. Pennsylvania: State University, 1973. 401p.
- PANDE, S.; MUGHOGHO, L.K.; BANDYOPADHYAY, R.; KARUNACAR, R.I. Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.8, p.778-783, 1991.
- ROUMEN, E.C. Effect of leaf age on components of partial resistance in rice to leaf blast. **Euphytica**, Dordrecht, v.63, p.271-279, 1992a.
- ROUMEN, E.C. Small differential interactions for partial resistance in rice cultivars to virulent isolates of the blast pathogen. **Euphytica**, Dordrecht, v.64, p.143-148, 1992b.
- ROBERT, A.L. Host ranges and races of the corn rusts. **Phytopathology**, St. Paul, v.52, p.1010-1012, Oct. 1962.
- SCOTT, G.E.; KING, S.B.; ARMOUR Jr., J.W. Inheritance of resistance to southern corn rust in maize populations. **Crop Science**, Madison, v.24, n.2, p.265-267, Mar./Apr. 1984.
- SHURTLEFF, M.C. (ed). **Compendium of corn diseases**. 2.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1986, Rusts, p.41-42.
- SHURTLEFF, M.C. (ed). **Compendium of corn diseases**. 2.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. 105p.
- STOREY, H.H.; RYLAND, A.K. Resistance to the maize rust, *Puccinia polysora*. **Nature**, London, v.173, n.4408, p.778-779, 1954.
- THAKUR, R.P.; SHETTY, K.G. Variation in pathogenicity among single-oospore isolates of *Sclerospora graminicola*, the causal organism of downy mildew in pearl millet. **Plant Pathology Harpenden**, v.42, p.715-721, 1993.
- ULLSTRUP, A.J. Inheritance and linkage of a gene determining resistance in maize to an american race

- of *Puccinia polysora*. **Phytopathology**, St. Paul, v.55, n.4, p.425-428, Apr. 1965.
- VAN DER PLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. New York: Academic Press, 1968. 205p.
- WHEELER, B.E.J. **An introduction to plant diseases**. London: J. Wiley, 1976. 374p.
- YEH, C.C. Studies on rusts of maize. **Journal of Agricultural Research of China**, Wufeng, v.35, n.1, p.81-93, 1986.
- ZUMMO, N. Components contributing to partial resistance in maize to *Puccinia polysora*. **Plant Disease**, St. Paul, v.72, n.2, p.157-160, Feb. 1988.