

## Métodos de inoculação de *Colletotrichum graminicola* em folhas de milho

### Inoculation methods of *Colletotrichum graminicola* on maize leaves

DOI:10.34117/bjdv8n6-393

Recebimento dos originais: 21/04/2022

Aceitação para publicação: 31/05/2022

#### **Anderson Carlos Finger**

Mestre em Agricultura pela Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, Nº 4748, Ponta Grossa – PR, Brasil, CEP: 84030-900

E-mail: andersonfinger96@gmail.com

#### **Rodrigo Rodrigues Matiello**

Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade de São Paulo

(ESALQ/USP)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Depto. de Fitotecnia e

Fitossanidade (ESALQ/USP)

Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, Nº 4748, Ponta Grossa – PR, Brasil, CEP: 84030-900

E-mail: rrmatiel@uepg.br

#### **Maristella Dalla Pria**

Doutora em Fitopatologia pela Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Depto. de Fitotecnia e

Fitossanidade

Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, Nº 4748, Ponta Grossa – PR, Brasil, CEP: 84030-900

E-mail: mdallapria@uepg.br

### **RESUMO**

A antracnose foliar do milho (*Zea mays*) (*Colletotrichum graminicola*) é considerada uma das principais doenças foliares da cultura. Dentre as estratégias de controle, a utilização de materiais genéticos resistentes é uma das mais eficientes, contudo, para a identificação de novas fontes de resistência, torna-se necessário o desenvolvimento e a padronização de metodologias que permitam a determinação precisa da reação dos genótipos que são avaliados. Considerando a inexistência de métodos padronizados para a reprodução dos sintomas de antracnose foliar, este trabalho teve como objetivo determinar o método mais eficiente e prático para a inoculação de *C. graminicola* em folhas de milho. Para tanto, foi conduzido um experimento em câmara de crescimento, utilizando a linhagem endogâmica (L95-1), considerada suscetível à antracnose foliar e pertencente ao Programa de Melhoramento Genético de milho da Universidade Estadual de Ponta Grossa. As plantas foram cultivadas em vasos individuais, os quais foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, composto por três repetições. A inoculação foi realizada no estágio vegetativo V7, com suspensão de esporos na concentração de  $3,2 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>. Os métodos de inoculação testados foram: pulverização da suspensão de conídios sobre as folhas do cartucho até o ponto de escorrimento; pulverização da suspensão de conídios até o ponto de escorrimento, sobre as folhas do cartucho feridas com lâmina; deposição de 5 mL da suspensão de conídios no cartucho, e plantas sem inoculação (testemunha). A avaliação da severidade da doença foi realizada no estágio vegetativo V13, a partir da

comparação dos sintomas com escala de notas de 0 (lesões necróticas de até 1 mm) a 5 (lesões necróticas de 60 a 150 mm). A partir dos dados de severidade, foi determinado os índices de doença (ID), os quais foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que houve diferença significativa entre os métodos de inoculação testados. A pulverização da suspensão de conídios sobre as folhas do cartucho até o ponto de escoamento não diferiu significativamente da pulverização da suspensão de conídios até o ponto de escoamento, sobre as folhas do cartucho feridas com lâmina, com ID de 29,99 e 28,89%, respectivamente. Conclui-se que o melhor método de inoculação de *C. graminicola* em folhas de milho foi através da deposição da suspensão de conídios no cartucho (ID de 42,22%), pois além de ter culminado numa maior severidade da doença, apresentou maior facilidade, praticidade e rapidez na execução da inoculação.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., antracnose foliar, severidade dos sintomas, índice de doença.

### ABSTRACT

Maize (*Zea mays*) leaf anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) is considered one of the main leaf diseases of the crop. Among the control strategies, the use of resistant genetic materials is one of the most efficient, however, in order to identify new sources of resistance, it is necessary to develop and standardize methodologies that allow the precise determination of the reaction of the genotypes that are evaluated. Considering the lack of standardized methods for reproducing the symptoms of leaf anthracnose, the objective of this work was to determine the most efficient and practical method for inoculation of *C. graminicola* in maize leaves. For that, an experiment was carried out in a growth chamber, using the inbred line (L95-1), considered susceptible to leaf anthracnose and belonging to the maize Genetic Improvement Program at the State University of Ponta Grossa. The plants were grown in individual pots, which were arranged in a completely randomized design, consisting of three repetitions. Inoculation was carried out at the vegetative stage V7, with spore suspension at a concentration of  $3.2 \times 10^6$  conidia mL<sup>-1</sup>. The inoculation methods tested were: spraying the conidia suspension on the leaves of the cartridge until the runoff point; spraying the conidia suspension to the point of runoff, on the leaves of the cartridge wound with a blade; deposition of 5 mL of the conidia suspension in the cartridge, and plants without inoculation (control). The evaluation of the severity of the disease was carried out at the vegetative stage V13, from the comparison of the symptoms with a scale of notes from 0 (necrotic lesions up to 1 mm) to 5 (necrotic lesions from 60 to 150 mm). From the severity data, the disease indexes (ID) were determined, which were submitted analysis of variance, and means compared by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The results showed that there was a significant difference between the inoculation methods tested. The spraying of the conidia suspension on the leaves of the cartridge at the runoff point did not differ significantly from the spraying of the conidia suspension up to the runoff point on the leaves of the blade-wounded cartridge, with ID of 29.99 and 28.89%, respectively. It is concluded that the better method of inoculation of *C. graminicola* in maize leaves was through the deposition of the suspension of conidia in the cartridge (ID of 42.22%), because in addition to having resulted in a greater severity of the disease, it presented greater ease, practicality and speed in the execution of the inoculation.

**Keywords:** *Zea mays* L., leaf anthracnose, severity of symptoms, disease index.

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum graminicola* Ces. Wils., conhecido desde 1852, é o agente causal da antracnose foliar, considerada como uma das principais doenças da cultura do milho (*Zea mays* L.) nas regiões produtoras. A antracnose foliar é caracterizada pelo aparecimento de lesões escuras, que se formam na epiderme e nas cavidades subepidérmicas de ambas as faces da folha. No centro das lesões, esse patógeno produz acérvulos, no interior dos quais são produzidos os conidióforos, e na parte terminal desses, os conídios. Em genótipos altamente suscetíveis ao patógeno, essas lesões coalescem e causam a morte prematura das folhas mais velhas das plantas (CASELA; FERREIRA, 1998; FERREIRA; CASELA, 2001; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

A viabilidade dos conídios está diretamente ligada com a umidade relativa do ar, podendo permanecer viáveis de semanas a meses, desde que estejam envoltos por uma matriz mucilaginosa composta por proteínas e polissacarídeos. Essa matriz mucilaginosa, além de estar relacionada com a sobrevivência dos conídios, evitando a dessecação dos mesmos, também está associada com a indução da patogenicidade, aumentando a eficiência na germinação e na penetração do patógeno (NICHOLSON; MORAES, 1980; BERGSTROM; NICHOLSON, 1999).

O *Colletotrichum graminicola* apresenta baixa capacidade de sobrevivência no solo, contudo, pode sobreviver por longo período em restos culturais ou sementes infectadas, na forma de micélio ou conídios. Os conídios produzidos a partir dos restos culturais deixados sobre a superfície do solo, são a fonte de inóculo primário para a próxima cultura, e disseminados geralmente por curta distância, através do vento ou respingos da chuva. A fonte de inóculo secundário, são os esporos oriundos da esporulação das lesões nas folhas, responsáveis tanto pelo desenvolvimento de novas lesões foliares quanto pela infecção do colmo (LIPPS, 1985; FERREIRA; CASELA, 2001; JIRAK-PETERSON; ESKER, 2011).

O sistema de semeadura direta associado a monocultura do milho, favorece consideravelmente o aumento da incidência e da severidade da antracnose foliar, uma vez que a incidência da doença apresenta relação direta com a quantidade de restos culturais acumulados sobre a superfície do solo, e conseqüentemente, com o período de sobrevivência desse patógeno (BYRNES; CARROLL, 1986; JIRAK-PETERSON; ESKER, 2011).

Uma das principais estratégias de controle da antracnose foliar é a utilização de cultivares e ou híbridos comerciais resistentes, em função de se tratar de um método altamente eficiente, sustentável e econômico (FERREIRA; CASELA, 2001; PROCHNO et al., 2016). No processo de identificação de genótipos resistentes à antracnose foliar, em estudos de

variabilidade patogênica de *C. graminicola*, na avaliação da eficiência de medidas de manejo e da epidemiologia da doença, são fundamentais o desenvolvimento e a padronização de metodologias que permitam a seleção segura de fontes de resistência e a determinação precisa da reação de resistência ou suscetibilidade dos genótipos avaliados. Considerando a inexistência de métodos padronizados para a inoculação de *C. graminicola* em folhas de milho, o presente trabalho objetivou determinar o método mais eficiente e prático para a inoculação do patógeno visando a reprodução dos sintomas da antracnose foliar.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No trabalho foi utilizada a linhagem endogâmica L95-1, suscetível à antracnose foliar (PROCHNO et al., 2016), e pertencente ao Programa de Melhoramento Genético de milho da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG. As plantas da linhagem foram cultivadas em vasos plásticos individuais, com capacidade de 3 L, contendo substrato comercial, e a irrigação foi efetuada manualmente conforme a necessidade da cultura.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento (SS Scientific, SS-CC/245), sob ambiente controlado (UR = 60%; temperatura média diurna de 25°C e noturna de 20°C; fotoperíodo de 12 horas, sob intensidade luminosa de aproximadamente 0,2 cal/cm<sup>2</sup>/min). Foram semeadas quatro sementes/vaso plástico e após a emergência das plântulas, foi realizado o desbaste mantendo uma plântula por vaso. Para cada método de inoculação avaliado foram utilizadas três plantas. Os vasos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

### 2.2 OBTENÇÃO, MULTIPLICAÇÃO E PREPARO DO INÓCULO

O isolado de *C. graminicola* foi cedido pela empresa Dow AgroSciences Ltda. (Jardinópolis, SP). A multiplicação do patógeno (isolado ORI) e o preparo do inóculo, foram realizados no Laboratório de Genética Molecular da UEPG.

Para a produção do inóculo, após o crescimento inicial do *C. graminicola* sobre o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), discos da cultura que continham o micélio do fungo, foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar (40 g de farinha de aveia, 10 g de ágar e 1000 mL de água destilada). Após a repicagem, as placas permaneceram a temperatura ambiente (21 ± 4°C), até a esporulação das colônias.

No dia da inoculação, com as colônias do patógeno completamente esporuladas, foram adicionados aproximadamente 20 mL de água deionizada estéril em cada placa, a fim de

facilitar a liberação dos conídios. A suspensão concentrada de conídios foi filtrada através de uma dupla camada de gaze e a concentração ajustada em câmara de Neubauer para  $3,2 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ .

### 2.3 INOCULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ANTRACNOSE FOLIAR

A inoculação com o *C. graminicola* foi realizada aos 50 dias após a emergência das plantas, no estágio vegetativo V7 (7ª folha completamente expandida) (RITCHIE; HANWAY, 1989), efetuada através dos seguintes métodos: (1) pulverização da suspensão de conídios sobre as folhas do cartucho até o ponto de escurimento; (2) pulverização da suspensão de conídios até o ponto de escurimento, sobre as folhas do cartucho feridas com lâmina de bisturi; (3) deposição de 5 mL da suspensão de conídios no cartucho e (4) plantas sem inoculação (testemunha).

Após a inoculação, cada planta foi envolta por um saco plástico transparente umedecido, simulando uma câmara úmida, mantido por um período de 48 horas, objetivando fornecer as condições ideais de umidade para a infecção do patógeno.

A avaliação da severidade dos sintomas da antracnose foliar foi realizada aos quinze dias após a inoculação, no estágio vegetativo V13 (13ª folha completamente expandida) (RITCHIE; HANWAY, 1989), quando apareceram os primeiros sintomas da doença, com o auxílio de uma escala adaptada de notas (ROMANEK et al., 2017), variando de 0 (lesões necróticas de até 1 mm) a 5 (lesões necróticas de 60 a 150 mm) (Figura 1).

Foram avaliadas as seis últimas folhas emitidas e completamente expandidas de cada planta. A partir dos dados de severidade dos sintomas da antracnose foliar, foi determinado o índice de doença (ID), para cada planta avaliada, através da fórmula de McKinney, a qual é dada pela seguinte equação:  $ID = 100 * \sum (v_i * f_i) / (n * x)$ , sendo  $v_i$ : nota da escala;  $f_i$ : número de folhas com a mesma nota;  $n$ : número total de folhas avaliadas;  $x$ : nota máxima da escala.

Figura 1 - Escala de notas para avaliação da severidade da antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*) em milho (*Zea mays*).



Fonte: Adaptado de Romanek et al. (2017).

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de índice de doença (ID) foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, através do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três métodos de inoculação testados foram eficientes em reproduzir os sintomas da antracnose foliar na linhagem L95-1 suscetível ao *C. graminicola*. Observou-se maior severidade dos sintomas da doença no método da deposição da suspensão de conídios no cartucho (Figura 2). A severidade da doença nesse método de inoculação atingiu um índice de doença de 42,22% (Figura 3).

O maior índice de doença no método da deposição da suspensão, pode ser explicado pela maior fragilidade dos tecidos do cartucho, os quais são mais jovens e conseqüentemente mais tenros, quando comparados com os tecidos do ápice das folhas, que foram inoculados nos demais métodos. Ao estudar o processo de infecção do *Colletotrichum guaranicola* (Albuq.) em plantas de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), Bentes (2000) observou que em folhas

novas o patógeno apresentou maior formação de apressórios, portanto, mostraram maior suscetibilidade à doença, em comparação com as folhas mais velhas.

A composição da cutícula das folhas pode afetar a germinação e a formação de apressórios do patógeno. Tecidos mais velhos atuam como uma superfície hidrofóbica e, desta maneira, dificultam a formação de um filme de água, o qual é necessário para a germinação e consequentemente, para a diferenciação das estruturas de infecção do fungo patogênico (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Ao avaliar a influência da adesão dos conídios de *C. graminicola* no desenvolvimento da antracnose foliar no milho, Mercure; Kunoh e Nicholson (1994) observaram que folhas jovens apresentaram uma maior porcentagem de conídios aderidos, comparativamente as folhas mais velhas. Essa diferença na adesão dos conídios, pode estar relacionada com a deposição de cera sobre as folhas, a qual altera a sinalização topográfica necessária para a diferenciação das estruturas do patógeno. A adesão dos conídios nas folhas, influencia diretamente o desenvolvimento da doença, visto que uma rápida adesão sobre os tecidos do hospedeiro, aumenta consideravelmente a chance de sucesso no estabelecimento do patógeno, resultando em maior severidade da doença.

Os resultados experimentais não demonstraram diferença significativa entre o método de inoculação através da pulverização da suspensão de conídios sobre as folhas do cartucho até o ponto de escorrimento e o método de inoculação através da pulverização da suspensão de conídios até o ponto de escorrimento, sobre as folhas do cartucho feridas com lâmina, os quais apresentaram índice de doença de 29,99 e 28,89%, respectivamente (Figura 3).

De acordo com Bailey et al. (1992), espécies do gênero *Colletotrichum* podem penetrar no hospedeiro através de aberturas naturais ou de ferimentos, contudo, a principal via de penetração é diretamente pela cutícula. Segundo Smith e Spiers (1982), a ocorrência de ferimentos não é imprescindível para que *Colletotrichum fragariae* (Brooks) penetre em pecíolos de plantas de morango. Conforme Ferreira et al. (2009), a penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) em folhas de café (*Coffea arabica* L.), se dá em sua maior parte por via direta.

Figura 2 – Severidade dos sintomas de antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*) em função dos métodos de inoculação testados em plantas de milho (*Zea mays*): (A) pulverização da suspensão de conídios sobre as folhas do cartucho até o ponto de escorrimento; (B) pulverização até o ponto de escorrimento, sobre as folhas do cartucho feridas com lâmina; (C) deposição de 5 mL da suspensão de conídios no cartucho e (D) sem inoculação (testemunha).

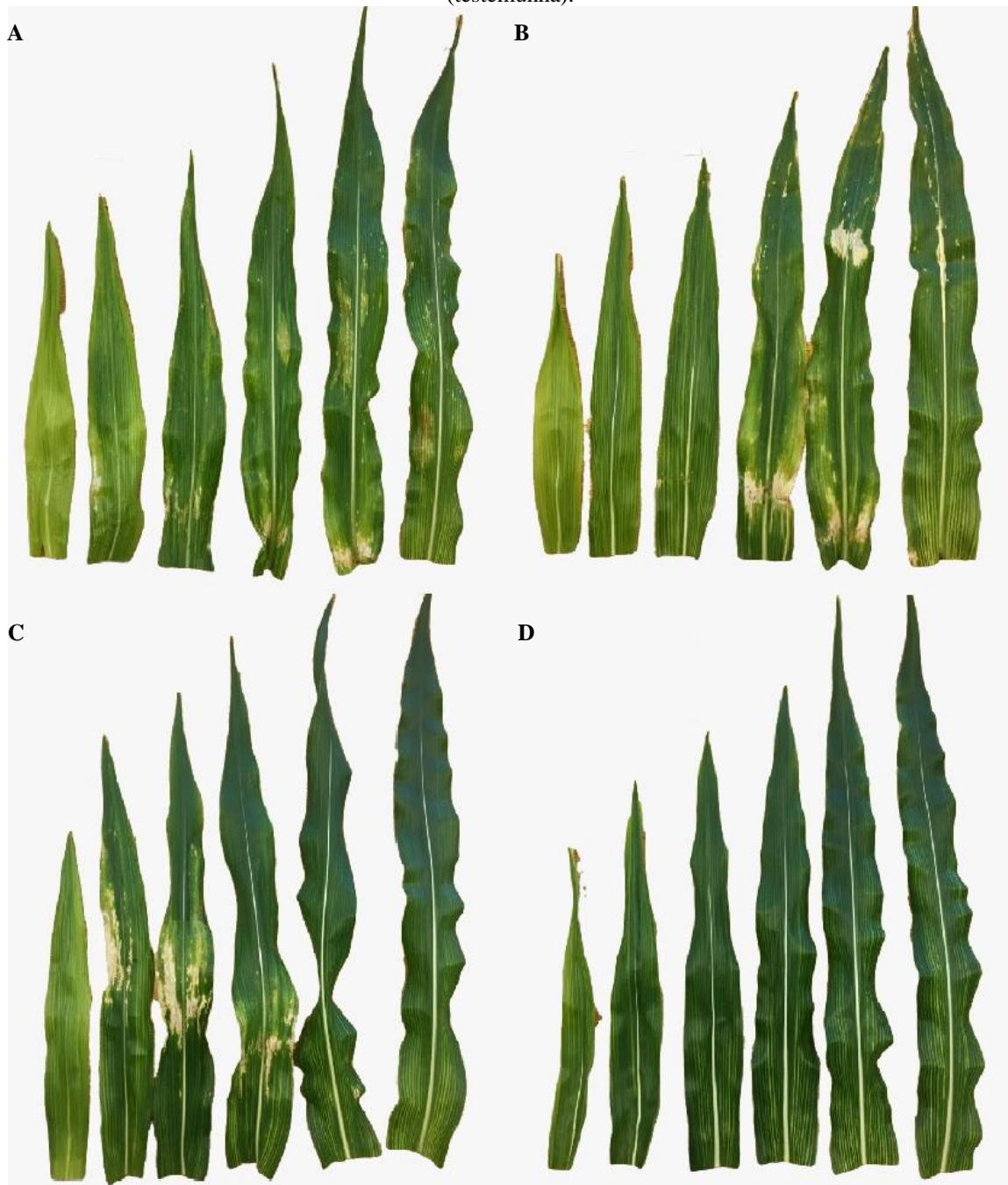
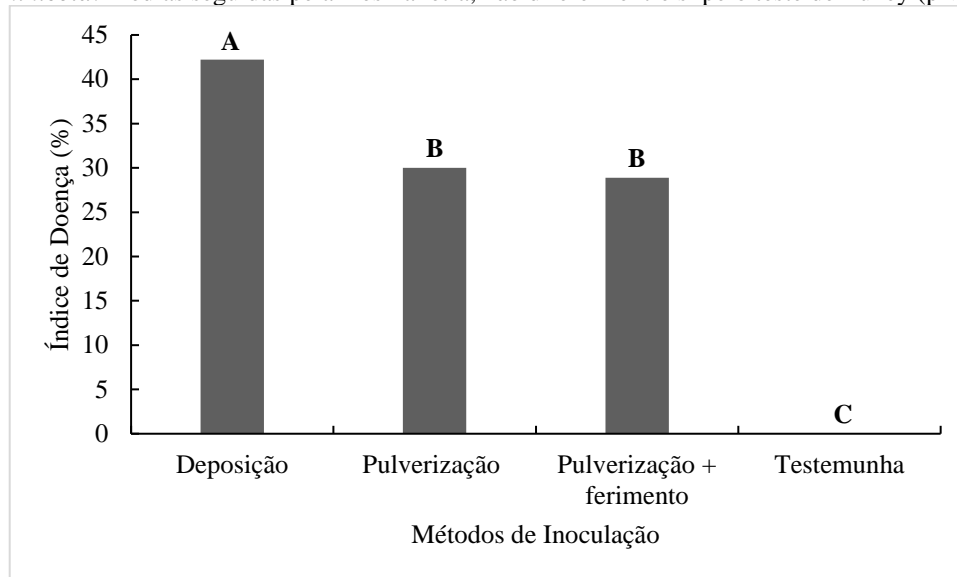




Figura 3 - Índice de doença (ID) para os métodos de inoculação das folhas de milho com *Colletotricum graminicola*. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Apesar de todos os métodos de inoculação de *C. graminicola* em folhas de milho terem reproduzido os sintomas da antracnose foliar, o método de inoculação através da deposição da suspensão de conídios na folha do cartucho foi o mais efetivo, em função de ter culminado em maior índice de doença (ID). Esse método foi considerado o melhor, pois além de ocasionar uma maior severidade da antracnose foliar, o mesmo apresentou maior praticidade e rapidez na execução da inoculação das plantas, em comparação com os demais métodos de inoculação avaliados.

#### 4 CONCLUSÃO

O melhor método de inoculação de *C. graminicola* em folhas de milho foi através da deposição da suspensão de conídios na folha do cartucho, pois possibilitou o maior desenvolvimento da antracnose foliar na linhagem suscetível. O método de deposição de conídios do patógeno apresenta grande potencial de utilização pelos programas de melhoramento genético de milho para fins de identificação de novas fontes de resistência, estudos de variabilidade patogênica de *C. graminicola* e na avaliação da eficiência de medidas de manejo e da epidemiologia da antracnose foliar em milho.

## REFERÊNCIAS

- BAILEY, J. A. *et al.* Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford, U. K.: CAB International, 1992. p. 88 – 120.
- BENTES, J. L. S. **Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. 2000. 62 f. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose. **Plant Disease**, v. 83, n. 7, p. 596 - 608, 1999.
- BYRNES, K. J.; CARROLL, R. B. Fungi causing stalk rot of conventional-tillage and no-tillage corn in Delaware. **Plant Disease**, v. 70, n. 3, p. 238 - 239, 1986.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **Antracnose do sorgo (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1998. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 28).
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 83).
- FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. **Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 13).
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p. 255 - 258.
- FERREIRA, J. B. *et al.* Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 273 - 281, 2009.
- JIRAK-PETERSON, J. C.; ESKER, P. D. Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 601 - 610, 2011.
- LIPPS, P. E. Influence of inoculum from buried and surface corn residues on the incidence of corn anthracnose. **Phytopathology**, v. 75, n. 11, p. 1212 - 1216, 1985.
- MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 45, n. 6, p. 407 – 420, 1994.
- NICHOLSON, R. L.; MORAES, W. B. C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v. 70, n. 3, p. 255 - 261, 1980.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, p. 417 – 453.

PROCHNO, H. C. *et al.* Genetic resistance of maize inbred lines to anthracnose leaf blight. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 55 - 61, 2016.

RITCHIE S.; HANWAY J. J. How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology/Cooperative Extension Service, Ames, 21 p. (Special Report, 48), 1989.

ROMANECK, C. *et al.* QTL mapping to anthracnose leaf blight resistance in tropical maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 390 – 398, 2017.

SMITH, B. J.; SPIERS, J. M. Evaluating techniques for screening strawberry seedlings for resistance to *Colletotrichum fragariae*. **Plant Disease**, v. 66, p. 559 - 561, 1982.