

DOUGLAS FERREIRA PARREIRA

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E VARIABILIDADE DE *Colletotrichum graminicola*  
EM MILHO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P259m  
2012

Parreira, Douglas Ferreira, 1978-  
Métodos de inoculação e variabilidade de  
*Colletotrichum graminicola* em milho / Douglas Ferreira  
Parreira. – Viçosa, MG, 2012.  
vii, 68f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Laércio Zambolim  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Milho - Doenças e pragas. 2. Antracnose.  
3. *Colletotrichum graminicola*. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 633.159

DOUGLAS FERREIRA PARREIRA

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E VARIABILIDADE DE *Colletotrichum graminicola*  
EM MILHO

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para  
obtenção do título de *Doctor*  
*Scientiae*.

APROVADA: 29 de junho 2012



Dr.<sup>a</sup> Dagma Dionísio da Silva



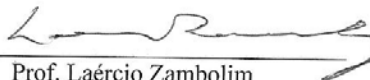
Dr. Luciano Viana Cota  
(Co-orientador)



Prof.<sup>a</sup> Maria Catarina Megumi Kasuya



Dr. Trazilbo Jose de Paula Junior



Prof. Laércio Zambolim  
(Orientador)

Aos meus pais, Cosme Damião e Maria Aparecida, minha base de apoio.  
A minha amada esposa Wania Neves, companheira para toda a vida.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me abençoado e permitido que chegasse tão longe.

À minha esposa Wania Neves pelo apoio, auxílio e colaboração durante essa empreitada.

A meus pais, pela criação amorosa, apoio e companheirismo ao longo de toda minha vida.

Aos meus irmãos Vanessa e Elias.

A meu cunhado Francisco e a minha sobrinha Ingrid pelo carinho.

Ao meu amigo Aloisio Dias pela ajuda nas revisões de inglês.

À Universidade Federal de Viçosa, pela assistência estudantil que na forma de gratuidade de alojamento e de bolsa atividade permitiu-me graduar-me como engenheiro agrônomo, e, ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao Prof. Laércio Zambolim pela orientação e ensinamentos.

Aos Doutores Rodrigo Véras da Costa, Luciano Viana Cota e Dagma Dionísia da Silva pelo apoio, companheirismo e colaboração.

A CAPES, pela bolsa concedida durante o curso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos pesquisadores e funcionários da Embrapa Milho e Sorgo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu sucesso.

## **BIOGRAFIA**

Douglas Ferreira Parreira é filho de Cosme Damião Parreira e Maria Aparecida Ferreira Parreira, nascido em Três Pontas, MG.

Em março de 2007 concluiu o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, concluindo em 2008 o Mestrado em Fitopatologia pela mesma universidade, no programa de Fitopatologia.

No ano de 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em junho de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	04
ARTIGO 01: Douglas Ferreira Parreira, Laércio Zambolim, Wania dos Santos Neves, Rodrigo Véras da Costa, Luciano Viana Cota, Dagma Dionísia da Silva. A Antracnose do Milho : uma revisão. ( <b>normas da revista <i>Tropica</i></b> ).....	06
ARTIGO 02: Parreira, D. F.; Zambolim, L.; Cota, L. V.; Costa, R. V.; Silva , D. D. da.; Marcondes, M. M.; Lanza, F. E.; Neves, W. S. Evaluation of methodologies to inoculate maize stalks with <i>Colletotrichum graminicola</i> .( <b>normas da revista <i>Journal of Plant Pathology</i></b> ).....	23
ARTIGO 03: Douglas F. Parreira, Laércio Zambolim, Rodrigo V. da Costa, Luciano V. Cota, Dagma D. da Silva, Wania dos S. Neves, Ubiraci G. P. Lana ,Eliane A. Gomes. VARIABILIDADE FENOTÍPICA DE <i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) G.W. Wils EM COLMOS DE MILHO NO BRASIL. ( <b>normas da revista <i>Revista Brasileira de Milho e Sorgo</i></b> ).....	41
ARTIGO 04: Douglas F. Parreira, Laércio Zambolim , Eliane A. Gomes, Rodrigo V. Costa, Dagma D. Silva, Luciano V. Cota, Ubiraci G. P. Lana e Wania dos Santos Neves. DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Colletotrichum graminicola</i> ESTIMADA POR MARCADORES ISSR ( <b>normas da revista <i>Revista Brasileira de Milho e Sorgo</i></b> ).....	57
CONCLUSÃO GERAL.....	68

## RESUMO

PARREIRA, Douglas Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012.  
MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E VARIABILIDADE DE *Colletotrichum graminicola* EM MILHO. Orientador: Laercio Zambolim. Coorientadores: Luciano Viana Cota e Rodrigo Vêras da Costa.

Entre as doenças que atacam a cultura do milho, a antracnose do milho causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils é considerada uma das mais importantes no Brasil, principalmente nas áreas onde se utiliza o sistema de plantio direto sem a adoção da rotação de culturas. A doença afeta todas as partes da planta, entretanto, é comumente constatada no campo nas formas de mancha foliar e de podridão do colmo. Considerando que os levantamentos de variabilidade dos organismos, se ocorrem ou não patótipos capazes de suplantar os genes de resistência utilizados, a padronização de metodologias de inoculação e avaliação, permitindo que os resultados obtidos em diferentes regiões possam ser comparados e utilizados nos alinhamentos dos programas de melhoramento genético, são de extrema importância. O presente trabalho abordou 3 frentes, na primeira delas foi feito o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a inoculação em colmos de milho, concluindo que a metodologia TICS palitos imersos em suspensão de esporos com inoculação na fase de pendramento (VT) e avaliando 30 dias após a inoculação; a segunda frente estudou a variabilidade de 95 isolados com os marcadores ISSR onde foi encontrada uma grande variabilidade entre os isolados mas sem uma estruturação geográfica ou da parte da planta de onde o isolado foi retirado; a terceira frente de trabalho consistiu no desafio de

uma série de 10 híbridos comerciais contra 165 isolados em condições de campo, seguindo os procedimentos da primeira etapa, desses resultados identificamos 3 padrões de severidade distintos, alguns isolados de cada padrão foram selecionados para sequenciamento da região ITS. Os isolados se agruparam com a espécie tipo de *C. graminicola* confirmando a espécie dos isolados, um isolado avirulento se agrupou com *C. truncatum* e *C. capsici*. A série diferencial não foi robusta, somente o híbrido 2B710 apresentou resistência à parte dos isolados, devendo ser mantidos em séries futuras os híbridos 2B710 como material resistente, 2B587 ou DKB390 como padrão de suscetibilidade na colonização do entrenó e Attack ou BRS1035 como padrões de susceptibilidade no número de entrenós infectados. Esse é o primeiro estudo apresentando fortes evidências quanto à existência de patótipos de *C. graminicola* no Brasil, na fase de colmo da doença.

## ABSTRACT

PARREIRA, Douglas Ferreira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2012.  
METHODS OF INOCULATION AND VARIABILITY OF *Colletotrichum graminicola* IN CORN. Advisor: Laercio Zambolim. Co-advisors: Luciano Viana Cota and Rodrigo Vêras da Costa.

Among all maize's diseases, anthracnose caused by *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils is considered one of the most important in Brazil especially where the no tillage system doesn't have a proper crop rotation. The disease attacks the whole plant but it is more common as leaf spot and stem rot. It is very important to standardize the methodology for inoculation and evaluation of results as its use in Genetic programs to allow comparison between different regions, once there is no much clue if pathotypes are capable of supplant the resistant genes used. The research developed was addressed to different experimentation where the first focused on the validation of a methodology for inoculation in maize's stalk finding TICS toothpicks immersed in spore suspension one more appropriated inoculating at tasseling stage (VT) with evaluation 30 days after inoculation; the second one studied the variability of 95 isolates with ISSR markers showing a considerable difference between them although with no geographic or plants' infected parts traceability; the third and the last was designed to challenge 10 different commercial hybrids against 165 isolates at field condition, following the first experiment procedure where 3 distinct patterns were identified, some isolates from each one were selected to be sequenced at the ITS. All the isolates grouped with *C. graminicola* species confirmed isolates species, but one avirulent grouped with *C.*

*truncatum* and *C. capsici*. The hybrid 2B710 presented distinct resistance, 2B587 or DKB390 were selected as the susceptible one at its internode compared with Attack or BRS1035 being it considered the standard for susceptibility based on internode infected. This is the first study proving strong evidences of patotype existence of *C. graminicola* in Brazil at disease's stalk stage.

## INTRODUÇÃO GERAL

Hoje no Brasil estima-se que a área plantada de milho em 2011/2012 (primeira e segunda safras) chegue a 15,45 milhões de hectares, com produtividade média prevista de 4.265 kg/ha, resultando em uma produção esperada de 55,02 milhões de toneladas (Conab, 2012). Levando em consideração a importância do cultivo brasileiro de milho, as podridões de colmo têm sido consideradas como uma das principais doenças na cultura do milho, exercendo um impacto negativo na produção, ocorrendo praticamente em todas as regiões produtoras (Costa *et al.*, 2008; 2010). Alguns estudos da ocorrência da doença e seus impactos na cultura do milho nas condições brasileiras tem sido feitos ao longo dos anos destacando os ensaios desenvolvidos pela Embrapa através de seu grupo de pesquisa como os feitos por Cota *et al.*, (2009) com o plantio de cinco híbridos em uma área com histórico de antracnose foram comparadas plantas infectadas e não infectadas, constatando perdas de até 34,5 % no peso dos grãos de plantas com antracnose no colmo, quando comparadas com plantas saudáveis. Segundo Bergstrom & Nicholson (1999) as lesões foliares podem servir como fonte de inóculo para infecções no colmo, que podem causar tombamento da planta, chegando a reduções na produtividade na ordem de 18% a 40% (Callaway *et al.*, 1992; Carson & Hooker, 1981; Smith, 1976).

A maneira ideal para o controle da enfermidade é o uso de materiais com resistência genética a doença, considerada atualmente como o mais eficiente método de controle para a doença e a medida de menor custo para o produtor. No trabalho desenvolvido por Carson *et al.* (1981) cruzando materiais resistentes e suscetíveis encontrou indícios de que os efeitos aditivos na resistência a antracnose do colmo foram responsáveis por mais de 90% da variação total entre as médias, com efeitos dominantes

importantes em algumas populações, concluindo que a dominância parcial para resistência ou suscetibilidade está no mesmo locus, corroborando com os resultados obtidos por Lim & White (1978).

Para o estudo e uso da resistência genética é fundamental o desenvolvimento e a padronização de metodologias que permitam a seleção segura de fontes de resistência e a determinação precisa da reação, resistência ou suscetibilidade, dos genótipos avaliados. Um fato que exemplifica bem a necessidade de padronização de métodos de inoculação foi o trabalho realizado por Forgey *et al.*(1978), onde os autores propuseram a ocorrência de oito raças de *C. graminicola* utilizando 10 isolados e 10 linhagens de milho, posteriormente Nicholson & Warren (1981) repetiram parte do trabalho de Forgey utilizando sete isolados e as mesmas linhagens utilizadas, concluindo que as diferenças nos sintomas, causados pelos diferentes isolados, não eram suficientes para permitir a sua diferenciação em raças, atribuindo os resultados obtidos por Forgey a não padronização da metodologia de preparo de inoculo e inoculação.

Para o uso de estratégias de manejo integrado na produção de milho é necessário o estudo aprofundado da variabilidade de *C. graminicola* quanto à possível ocorrência de patótipos sendo de vital importância na busca do uso de controle genético para esta enfermidade. No trabalho de Rezende et al. (2004) chegou-se a conclusão que o modelo sobre a herança da resistência à antracnose foliar é um modelo misto de herança com genes de maior e menor efeito. Lim & White (1978) trabalharam com inoculações em colmo e folha encontrando efeitos significantes de resistência e susceptibilidade, nas reações foliares e de colmo indicando que a dominância parcial para resistência ou susceptibilidade se encontra no mesmo locus. Entretanto, nesse trabalho, os autores obtiveram uma baixa correlação entre as reações foliares e de colmo indicando que elas são influenciadas por mecanismos genéticos diferentes. Até o momento nenhum relato da ocorrência de patótipos na fase de colmo da doença havia sido feito, e, segundo Bergstrom e Nicholson (1999), *C. graminicola* exibe uma grande variação em agressividade nas fases de folha e colmo mas, sem evidências consistentes da ocorrência de patótipos. Considerando-se que na literatura foi encontrado somente um gene para resistência na fase de colmo até o momento, apenas dois patótipos poderiam ser diferenciados (Broglie *et al.*, 2009), através de uma metodologia de inoculação capaz de assegurar a integridade dos resultados. Somente com as respostas sobre os níveis de resistência genética dos genótipos de milho e a variabilidade de *C. graminicola*, associados com o histórico das áreas e as condições ambientais da região que

conseguiremos colocar em prática o manejo integrado, que constitui um dos pilares de sustentação da certificação dos produtos de origem vegetal (produção integrada), uma realidade nos dias atuais.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease*, v. 83, p. 596-608. 1999.
- BROGLIE, K. E.; BUTLER, K. H.; BUTRUILLE, M. G.; DA SILVA CONCEICAO, A.; FREY, T. J.; HAWK, J. A.; JAQUETH, J. S.; JONES, E. S.; MULTANI, D. S.; WOLTERS, P. J. C. C. Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. *United States Patent Application 20090035765A1*. 2009.
- CALLAWAY, M. B.; SMITH, M. E.; COFFMAN, W.R. Effect of anthracnose stalk rot on grain yield and related traits of maize adapted to the northeastern United States. *Canadian Journal Plant Science*, v.72, p.1031-1036. 1992.
- CARSON, M. L.; HOOKER, A. L. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, v.71, p.1190-1196. 1981.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março 2011 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2011.
- COSTA, R. V.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 100).
- COSTA, R. V.; SILVA, D. D; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.2, p.122-128. 2010.
- COTA, L.V.; COSTA, R.V.; CASELA, C.R.; LANZA F.E. Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 5 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 120).

- FORGEY, W. M.; BLANCO, M. H.; LOEGERING, W. Q. Differences in pathological capabilities and host specificity of *Colletotrichum graminicola* on *Zea mays*. *Plant Disease Reporter*, v.62, p.573-576. 1978.
- LIM, S. M.; WHITE, D. G. Estimates of heterosis and combining ability for resistance of maize to *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, v.68, p.1336-1342. 1978.
- NICHOLSON, R. L.; WARREN, H. L. The issue of races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to corn. *Plant Disease*, v.65, p.143-145. 1981.
- REZENDE, V. F.; VENCOVSKY, R.; CÁRDENAS F. E. N.; DA SILVA, H. P.; BEARZOTI, E.; CAMARGO, L. E. A. Mixed inheritance model for resistance to anthracnose leaf blight in maize. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.115-122. 2004.
- SMITH, D. R. Yield reduction in dent corn caused by *Colletotrichum graminicola*. *Plant Disease Reporter*, v.60, p.967-970. 1976.

## A antracnose do milho: uma revisão.

Douglas Ferreira Parreira<sup>1</sup>, Laércio Zambolim<sup>1</sup>, Wania dos Santos Neves<sup>2</sup>, Rodrigo Vêras da Costa<sup>3</sup>, Luciano Viana Cota<sup>3</sup>, Dagma Dionísia da Silva<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Proteção de Plantas. Viçosa-MG. E-mail: [douglas2002ufv@yahoo.com.br](mailto:douglas2002ufv@yahoo.com.br); [zambolim@ufv.br](mailto:zambolim@ufv.br).

<sup>2</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional EPAMIG Centro-Oeste. Prudente de Morais, MG. Brasil. [wanianeves@epamig.br](mailto:wanianeves@epamig.br).

<sup>3</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Email: [veras@cnpms.embrapa.br](mailto:veras@cnpms.embrapa.br); [lvkota@cnpms.embrapa.br](mailto:lvkota@cnpms.embrapa.br); [dagma@cnpms.embrapa.br](mailto:dagma@cnpms.embrapa.br).

**Resumo** – A antracnose do milho causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* é uma das principais doenças da cultura no Brasil e no mundo. A doença, no Brasil, ocorre em todas as regiões produtoras e a sua incidência tem aumentado nos plantios de milho, principalmente nos locais onde se utiliza o plantio direto, o que acaba por favorecer o aumento de inóculo na área. Vários trabalhos foram feitos para avaliar a resistência genética e, entre todas as metodologias testadas, o uso de genótipos resistentes é considerado a maneira mais eficaz de controle, mas ainda faltam híbridos com níveis adequados de resistência no mercado. Para o uso de estratégias de manejo integrado na produção de milho faz-se necessário o estudo aprofundado da variabilidade de *Colletotrichum graminicola* quanto a possível ocorrência de patótipos, sendo de vital importância a busca do controle genético desta enfermidade, considerado atualmente como o mais eficiente método de controle para a doença e a medida de menor custo para o produtor. Existem híbridos com resistência à fase foliar da doença, mas essa resistência não tem correlação com a fase de colmo. Sendo assim, a escolha do material a ser plantado com a especificação de resistência a antracnose foliar ou a do colmo, em conjunto com histórico e condições climáticas da área, é de extrema importância.

Palavras-chave: *Colletotrichum graminicola*, podridão de colmo, lesões foliares.

## The corn anthracnose: a review

**Abstract** – The corn anthracnose caused by *Colletotrichum graminicola* is a major disease of this culture in Brazil and worldwide. The disease occurs in all Brazilian regions and its incidence has increased over the plantings, especially in places where no-till were used, increasing inoculums in the area. Several studies have been done regarding the resistance and, among all the methodologies evaluated, the use of resistant genotypes is considered the most effective way to control, but there are not still hybrids with adequate levels of resistance available in the market. For the use of integrated management strategies in corn production is necessary a in-depth study of the

variability of *Colletotrichum graminicola* as the possible occurrence of pathotypes being of vital importance in the search for genetic control of this disease, currently regarded as the most efficient method of control to the extent of disease and lower cost to the producer. There are hybrids with resistance to foliar phase of the disease, but this resistance does not correlate with the stage of stalk disease. Thus, choose the material to be planted with the specification if it is resistant to leaf or stem anthracnose, together with historical and climatic conditions of the area, is extremely important.

Key words: *Colletotrichum graminicola*, stalk rot, leaves spots.

### **Introdução**

Fungos do gênero *Colletotrichum* são reconhecidamente um dos mais importantes grupos de agentes causais de doenças em plantas no mundo todo. Dentre as plantas atacadas por esse patógeno podemos destacar o milho, que é uma cultura de grande importância no cenário agrícola nacional e mundial. Esse fungo pode atacar folhas e colmo, sendo a doença conhecida como antracnose. *C. graminicola* é reconhecido como um dos patógenos que causam sérios problemas para a cultura do milho em áreas que adotam o cultivo de segunda safra ou o sistema de plantio direto (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000). A doença ocorre em todas as principais regiões produtoras de milho do Brasil, seja em plantios tardios ou em plantios efetuados em períodos normais (CRUZ et al., 1996; FERNANDES & BALMER, 1990;). Segundo Bergstrom & Nicholson (1999), as lesões foliares podem servir como fonte de inóculo para infecções no colmo que podem causar tombamento da planta e que, como consequência, reduz a produtividade da cultura entre 18% e 40% (CALLAWAY et al., 1992; CARSON & HOOKER, 1981; COTA et al., 2009; SMITH, 1976). Para diminuir as perdas durante a condução da cultura do milho, métodos de controle de enfermidades são empregados e, para que a eficiência dos métodos seja obtida é fundamental o diagnóstico correto do agente causal.

### **Taxonomia**

A espécie *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils (teleomorfo *Glomerella graminicola* D.J. Politis) foi primeiramente introduzida por Wilson (1914) juntamente com alguns fungos de morfologia semelhante como *Colletotrichum*, *Dicladium*, e *Steirochaete*, incluindo *C. cereale*. Posteriormente, eles foram descritos como espécies distintas de *Colletotrichum* por Crouch et al. (2009 a,b). A espécie *C. graminicola* foi objeto de controvérsia a princípio com os trabalhos de Von Arx, que agrupou espécies

com conídios de morfologia semelhante, capazes de eliciar doenças nas gramíneas dentro do teleomorfo *Glomerella tucumanensis* (VON ARX & MULLER, 1954), incluindo os taxons anteriormente descritos como *C. sublineola*, *C. falcatum* e *C. caudatum*. *Colletotrichum graminicola* sensu lato Arx foi considerado por pesquisadores como um grupo de espécies sendo, posteriormente, dividido em 12 espécies (HYDE et al., 2009). No trabalho de Minussi e Kimati (1979), em teste de inoculação cruzada com isolados de *C. graminicola* provenientes de milho, sorgo, cana-de-açúcar e trigo, a especificidade dos isolados a seus hospedeiros foi constatada e os autores trabalharam então com o conceito de *formae specialis*.

A determinação limitação de espécies e a precisa caracterização da variabilidade em isolados do gênero *Colletotrichum* é, muitas vezes, difícil (CANNON et al., 2000; MENEZES, 2006). Esse fato decorre devido a enorme plasticidade fenotípica exibida por esse gênero, levando, frequentemente a resultados conflitantes e de difícil interpretação. O que dificulta a adoção de estratégias de controle por meio da resistência genética. Em 2006, o USDA (United States Department of Agriculture) em parceria com a NSF (National Science Foundation) lançaram um projeto para o sequenciamento do genoma do isolado M1.001 de *C. graminicola* (também conhecido como M2), sendo este o primeiro membro do gênero *Colletotrichum* a ter o genoma totalmente sequenciado.

Alguns problemas de ordem taxonômica têm sido resolvidos pelo uso de ferramentas moleculares, pois para este grupo de fungo, os critérios taxonômicos geralmente se sobrepõem, tendo ainda algumas espécies uma ampla gama de hospedeiros e, dentre esses hospedeiros, alguns são infectáveis por mais de uma espécie de *Colletotrichum*. Sherriff et al. (1995) separaram pela sequência de rDNA, espécies do gênero *Colletotrichum* causadoras de antracnose em milho e sorgo. Para o sorgo foi caracterizado a espécie como *C. sublineolum* e para o milho permaneceu como *C. graminicola*.

Estudos realizados com espécies de *Colletotrichum* possuidoras de conídios falciformes, utilizando quatro genes: ITS, DNA liase (Apn2), mating tipe (Mat1/Apn2) e manganês superóxido desmutase (Sod2), resultaram na separação das espécies levando em conta caracteres taxonômicos como dimensões e tamanho do apressório (CROUCH et al., 2009b). Segundo Crouch et al. (2009c), a tentativa de separação baseada somente na região ITS não proporcionou a mesma diferenciação. Outro fator importante é a presença de sequências erroneamente depositadas no Genbank, sendo

considerado que, para fungos, mais de 20% das sequências depositadas podem estar comprometidas (BIDARTONDO et al., 2008). Esse problema pode ser remediado nos trabalhos de filogenia com o uso de isolados tipo, provenientes de coleções de culturas internacionais.

### **Histórico, distribuição e importância**

Antes da década de 70 a antracnose do milho não era considerada um problema na cultura do milho. Contudo, a partir de 1970, começaram a ocorrer surtos epidêmicos nas regiões produtoras do centro-norte nos Estados Unidos (HOOKER & WHITE, 1976; PERKINS & HOOKER, 1979). Uma epidemia severa de antracnose no estado de Indiana, no período de dois anos desde a primeira ocorrência, levou o estado a não produzir mais milho doce (WARREN et al., 1973). A ocorrência de *C. graminicola* nos campos de milho dos EUA vem ocorrendo de maneira constante, conforme demonstrado no trabalho de Anderson e White (1987) que, nos anos de 1982 e 1983, isolaram o fungo *C. graminicola* de 34 a 46% dos colmos que apresentavam podridão. Entre os anos de 1980 e 1990, o aumento das epidemias foi associado em parte com o aumento da população da broca européia do milho *Ostrinia nubilalis* (Hübner) que causa perfurações no colmo favorecendo o acesso do fungo *C. graminicola* aos tecidos internos da planta (MUIMBA-KANKOLONGO & BERGSTROM, 1990 e 1992; KELLER et al., 1986).

No Brasil a doença foi relatada pela primeira vez por Silveira et al. (1965), ocorrendo em campos de milho próximos a cidade de Campinas. Posteriormente ao plantio de segunda safra (safrinha), a doença que era tida como secundária, passou a ganhar importância, principalmente em regiões que utilizam plantio direto e cultivos sucessivos de milho, limitando a produtividade nessas áreas. O monitoramento das podridões do colmo em milho no Brasil tem sido feito ao longo dos anos sendo encontrando *C. graminicola* em mais de 62% das plantas doentes nos trabalhos de Costa et al. (2008) e 22,6% na região sul do Brasil por Denti & Reis (2003).

Hoje, no Brasil, estima-se que a área plantada de milho em 2011/2012 (primeira e segunda safras) chegue a 15,45 milhões de hectares, com produtividade média prevista de 4.265 kg/ha, resultando em uma produção esperada de 55,02 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Levando em consideração a importância do cultivo brasileiro de milho, as podridões de colmo têm sido consideradas como uma das principais doenças na cultura do milho, exercendo um impacto negativo na produção,

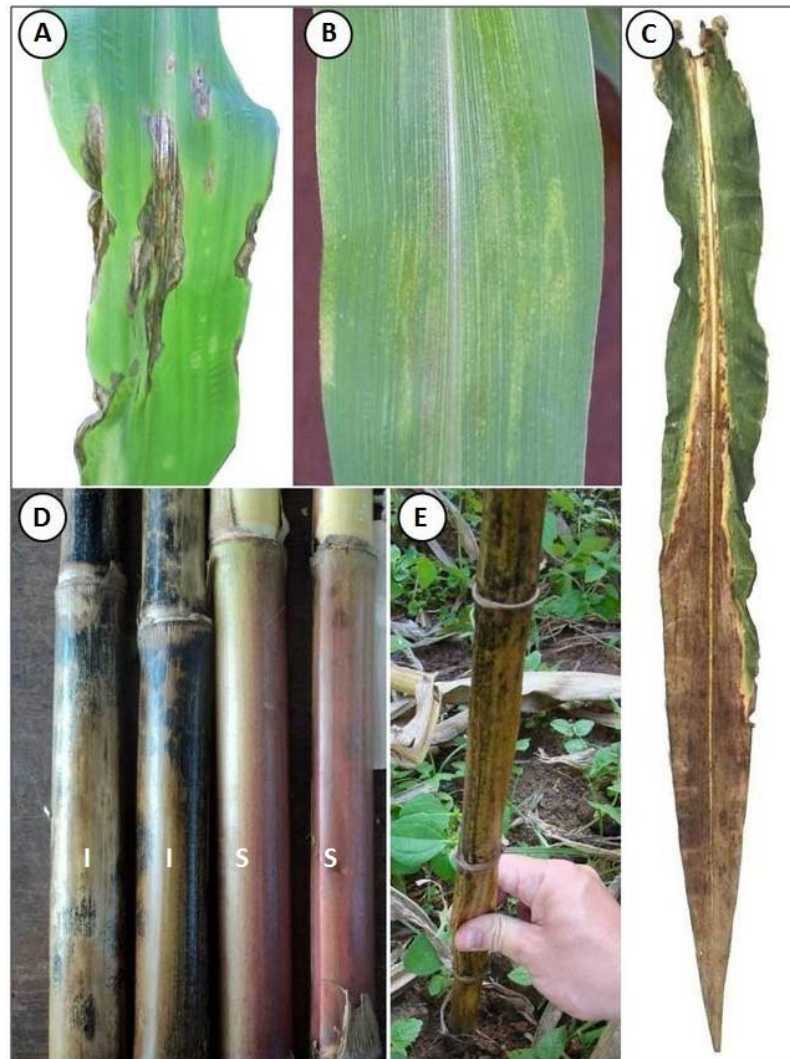
ocorrendo praticamente em todas as regiões produtoras (COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2010). No trabalho de Cota et al. (2009), com o plantio de cinco híbridos em uma área com histórico de antracnose, foram comparadas plantas infectadas e não infectadas, constatando perdas de até 34,5 % no peso dos grãos de plantas com antracnose no colmo, quando comparadas com plantas saudáveis. Segundo Bergstrom & Nicholson (1999) as lesões foliares podem servir como fonte de inóculo para infecções no colmo, que podem causar tombamento da planta, chegando a reduções na produtividade na ordem de 18% a 40% (SMITH, 1976; CARSON & HOOKER, 1981; CALLAWAY et al., 1992).

### **Sintomatologia**

As lesões foliares e a podridão do colmo são os sintomas mais comuns vistos no campo, mas o fungo infecta sementes e raízes também. As folhas podem ser infectadas em qualquer estágio de desenvolvimento e os sintomas variam bastante dependendo do genótipo, da idade da folha e das condições ambientais (WHITE & YANNEY, 1978). Em plantas suscetíveis, as lesões são castanho claro, de ovais a alongadas, podendo algumas lesões apresentar bordas vermelho alaranjadas, que podem expandir e coalescer, tomando toda a folha (Figura 1A). Em genótipos resistentes, as lesões são geralmente menores, variando de cloróticas a necróticas (Figura 1B). Em condições de seca, as lesões ficam restritas a pontuações necróticas, podendo expandir, caso as condições ambientais sejam favoráveis ao desenvolvimento do fungo (WHITE & YANNEY, 1978). Normalmente, os sintomas começam pelas folhas baixas, se movendo progressivamente em direção ao ápice da planta. Quando as lesões começam na nervura, ocorre a seca da folha a partir do ponto onde está a lesão em direção ao ápice, formando uma lesão em “v”, sendo comum a presença de lesões elípticas com acérvulos (Figura 1C).

Infecções no colmo podem ser visíveis em vários estágios de crescimento. Cultivares altamente suscetíveis, infectados no início do seu desenvolvimento, podem morrer antes de completar o ciclo. As plantas infectadas nas fases iniciais do seu desenvolvimento podem não apresentar uma sintomatologia de fácil detecção, mas, após o florescimento, podem ser observadas lesões encharcadas elípticas de coloração escura de marrom avermelhadas a negras. Essas lesões podem coalescer formando extensas áreas necrosadas (Figura 1D), o tecido do colmo infectado fica escuro e degenerado, os entrenós ficam flácidos, sendo facilmente detectado com uma leve pressão entre os dedos (Figura 1E). Esse enfraquecimento dos entrenós pode resultar na morte prematura

da parte superior da planta ou no tombamento, o que dificulta a colheita mecânica e, conseqüentemente, redução de produtividade da lavoura (BERGSTROM & NICHOLSON, 1999; CASELA et al., 2006; COSTA et al., 2008).

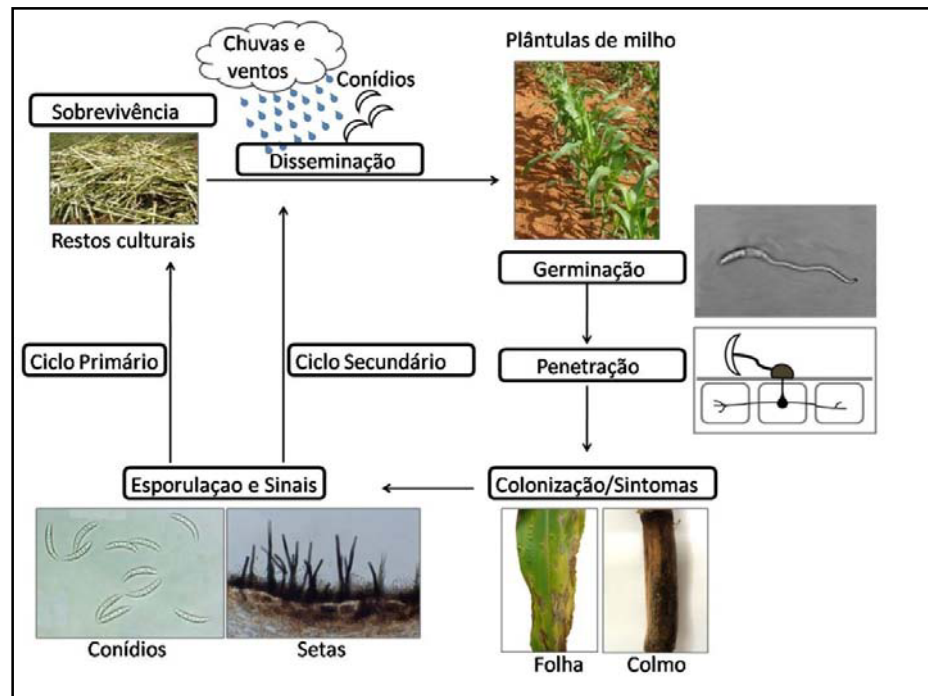


**Figura 1** Sintomatologia da antracnose: a) folhas com lesões típicas, b) “lesões” de resistência, c) infecção da nervura com necrose em “v”, d) colmos infectados (I) com acérvulos emergindo do tecido do hospedeiro a esquerda e colmos saudáveis (S) a direita, e) avaliação da ocorrência de apodrecimento do entrenó através da pressão feita entre o polegar e o indicador.

#### **Ciclo da doença**

O ciclo da doença é, segundo Bergstrom & Nicholson (1999), dividido em cinco etapas (Figura 2): inóculo primário, fase de queima das plântulas, fase de queima foliar, colonização sistêmica (fase do colmo) e fase saprofítica. O inóculo primário constitui estruturas do patógeno presente nos restos culturais da lavoura, de maneira que

cultivos contínuos de milho resultam no aumento da doença no campo ao longo do tempo. As infecções iniciais das folhas das plântulas ocorrem com a deposição dos conídios produzidos nos restos culturais infectados, onde os conídios são arremessados pelo impacto das gotas de água (BERGSTRON & NICHOLSON, 1999). O fungo pode colonizar sistematicamente a planta através das raízes, sendo esse mecanismo elucidado por Sukno et al. (2008), através de estudos ultraestruturais, onde foi comprovada a infecção das raízes seguido por colonização sistêmica da plântula de milho. Ao colonizar raízes, algumas estruturas comuns a patógenos radiculares são formadas, como por exemplo, hifopódio, hifa de corrida (runner hyphae) e microescleródios comuns a patógenos como *Gaeumannomyces graminis*, mas que antes deste trabalho não haviam sido relatados em *C. graminicola*. Já que essas estruturas não são encontradas na colonização foliar, foi descoberto, desta maneira, outra importante porta de entrada do fungo para o estabelecimento da infecção.



**Figura 2:** Ciclo de *Colletotrichum graminicola* em milho

### Sobrevivência

A permanência do inóculo no campo está associada aos restos culturais. O fungo sobrevive como saprófita, desde que os tecidos da planta tenham sido previamente colonizados, por até nove meses no campo, quando enterrados. Existem relatos de sobrevivência do fungo nos tecidos da planta que pode chegar a 18 meses

(VIZVARY & WARREN, 1982). Caso os restos culturais sejam enterrados, a capacidade de sobrevivência reduz devido à baixa capacidade de competição do fungo com a microbiota do solo. Conídios e micélio de *C. graminicola* sobrevivem menos de 20 dias a temperaturas no solo maiores ou iguais a 16°C (VIZVARY & WARREN, 1982; LIPPS, 1985).

### **Variabilidade entre espécies diferentes**

Desde a década de 70, a variabilidade de *C. graminicola* tem sido estudada e, alguns trabalhos caracterizaram isolados e separaram os patótipos que atacavam cana-de-açúcar, sorgo e milho em três diferentes espécies (MINUSSI et al., 1979; JAMIL & NICHOLSON, 1989). Minussi et al. (1979) realizaram comparações patogênicas e morfológicas entre isolados de *C. graminicola* de cana-de-açúcar, milho, sorgo e trigo. Nesse trabalho foi demonstrado que o patógeno somente causava sintomas nos hospedeiros dos quais foram isolados. Os autores também observaram divergências entre isolados quanto ao crescimento em função do meio de cultura utilizado, variando na velocidade de crescimento, coloração da colônia, formato e tamanho de hifas. Além disso, os autores destacaram a diferença significativa entre o comprimento e a largura dos conídios e entre o formato e o tamanho dos apressórios.

Um estudo envolvendo a patogenicidade, especificidade e distribuição de *C. graminicola* foi realizado por Wheler et al. (1974), onde os autores testaram vinte e seis isolados oriundos de plantas de milho e dos gêneros *Avena*, *Medicago*, *Hordeum*, *Bromus*, *Triticum*, *Calamagrostis*, *Festuca*, *Sorghum* e *Danthonia*. Nesse estudo foi observado que apenas isolados do próprio milho foram patogênicos a ele. Nem mesmo isolados de *C. falcatum*, que são muito próximos a *C. graminicola*, foram patogênicos ao milho. Porém, dois isolados obtidos do milho infectaram plantas de sorgo. Houve diferença entre a suscetibilidade das cultivares de sorgo utilizadas, sendo que alguns isolados foram mais agressivos que outros, causando em algumas cultivares lesões diminutas, sem esporulação, enquanto que em outras cultivares a severidade da doença foi maior utilizando-se o mesmo isolado. Os autores sugeriram a possibilidade de existência de raças do patógeno em milho, já que os isolados obtidos nesse trabalho diferiram dos isolados descritos por Williams (1963) e por Dale (1963), com relação à capacidade de infectar plantas de milho sem ferimentos e plantas de sorgo. Entretanto, Nicholson & Warren (1981), Jenns et al. (1982) e White et al. (1987), realizaram estudos de virulência e agressividade de *C. graminicola* em milho e concluíram que existem diferenças na agressividade do patógeno porém, não há essa diferença em

relação à virulência, o que caracterizava a inexistência de raças. Esses últimos autores também estudaram a variação na patogenicidade, virulência e agressividade de quatorze isolados de *Colletotrichum*, sendo 12 de milho e dois de sorgo, em três linhagens de milho, com graus variáveis de resistência, e dois cultivares de sorgo. Com base nos resultados obtidos, os isolados puderam ser separados em grupos com base na patogenicidade, virulência e agressividade, porém sem ser suficiente para diferenciação em raças já que, de acordo com o trabalho, o critério foi baseado na diferença entre descoloração do colmo em relação à testemunha inoculada com água. Os autores também concluíram que a virulência de isolados mantidos em meio de cultura pode diminuir. Três dos isolados utilizados neste trabalho, que causaram descoloração do entrenó em todas as linhagens no ano de 1979, não obtiveram a mesma resposta dos sintomas no ano seguinte.

Um dos primeiros trabalhos feitos com diversidade de *C. graminicola* foi realizado por Forgey et al., (1978) utilizando dez isolados e dez progênies de milho. Nesse trabalho, os autores propuseram a ocorrência de 8 raças fisiológicas do patógeno, baseados nos resultados obtidos do teste de inoculação cruzada, onde cada um dos isolados foi inoculado nas dez progênies de milho. Posteriormente Nicholson & Warren (1981), utilizando sete dos dez isolados empregados no trabalho de Forgey contestaram a presença de raças, atribuindo a diferença quanto à sintomatologia ao fato dos autores não terem padronizado a concentração do inóculo no experimento. Segundo Bergstrom & Nicholom (1999), existe uma grande variabilidade quanto à agressividade da antracnose em folhas e colmo de milho, mas a determinação de raças ainda não foi comprovada.

A variabilidade de um organismo pode ser obtida também com o uso de marcadores moleculares, diferenciando os indivíduos com base em seu material genético. Ratanacherdchai et al. (2010) trabalharam com variabilidade de *C. gloeosporioides* e *C. capsici* com três genótipos de pimenta utilizando marcadores ISSR. O dendrograma obtido correlacionou os isolados quanto a sua origem geográfica, propondo assim o uso de marcadores ISSR no estudo da diversidade genética em *Colletotrichum* spp, afirmando ainda que tais técnicas ajudam no estudo da dinâmica populacional do patógeno, permitindo estratégias de controle com uma melhor eficiência.

No trabalho desenvolvido por Sugui & Deising (2002), estudando as interações na antracnose do milho, foram identificados 13 genes envolvidos: 6 da

planta, 3 do fungo e 4 de origem desconhecida. No trabalho de Wargas et al.(2012) foram encontrados mais de 200 genes no milho e 50 de *C. graminicola*. Wargas et al.(2012) abordou o fato de *C. graminicola* não suprimir a expressão dos genes de defesa da planta nos primeiros estágios de infecção através do estudo de mRNA, encontrando mudanças metabólicas na planta e no fungo. Espécies reativas de oxigênio foram formadas e ocorreu a ativação de rotas metabólicas ativadas por ABA em resposta a infecção, induzindo as respostas clássicas de defesa da planta durante a fase biotrófica, um numero significativo de cDNA codificando proteínas foi detectado, permitindo aos autores concluir que a estabilidade das proteínas da planta é comprometida durante o ataque, motivo pelo qual a planta começa a produzir e reciclar proteínas para garantir o funcionamento dos mecanismos de defesa. Entre os 10 materiais utilizados no trabalho, o híbrido 2B710 se destacou dos demais pela restrição da doença (Figuras 1 e 2), podendo ter suas respostas de defesa ao ataque do patógeno reguladas de maneira mais eficiente, visto que no trabalho de Wargas et al.(2012) os autores sugerem que a fase necrotrófica é a resposta do fungo às defesas da planta para minimizar o efeito dos compostos de defesa sobre o micélio fungico. As plantas de milho produziram nas células vesículas oxidativas contra a infecção, mas o efeito dessas estruturas deve ser melhor elucidado em trabalhos futuros. A diferenciação da hifa primária para a secundária permite ao patógeno matar as células vegetais evitando o contato direto com as defesas dos tecidos vivos, sendo explicada pela alta suscetibilidade da hifa primária às defesas da planta, de *C. graminicola*.

#### **Avaliação da resistência e inoculação**

Para tais fins, é fundamental o desenvolvimento e a padronização de metodologias que permitam a seleção segura dessas fontes de resistência e a determinação precisa da reação, resistência ou suscetibilidade, dos genótipos avaliados. Um fato que exemplifica bem a necessidade de padronização de métodos de inoculação foi o trabalho realizado por Forgey (1978). O autor apontou a ocorrência de oito raças de *C. graminicola*, utilizando 10 isolados e 10 progênies de milho. Entretanto, Nicolson & Warren (1981) repetiram suas avaliações utilizando sete isolados e as mesmas linhagens utilizadas por Forgey, e concluíram que as diferenças nos sintomas, causados pelos diferentes isolados, não eram suficientes para permitir a sua diferenciação em raças, atribuindo os resultados obtidos por Forgey a não padronização da metodologia de preparo do inóculo e inoculação.

Considerando que são inúmeras as técnicas utilizadas para esse tipo de caracterização, é necessário um trabalho que possa abranger os detalhes e peculiaridades desse patossistema. Seguindo esta demanda, os objetivos deste trabalho foram determinar o método mais eficiente e prático para a inoculação de *C. graminicola* em colmos de plantas de milho, determinar o momento adequado para avaliação da severidade dos sintomas após a inoculação artificial, determinar qual o melhor estágio fenológico, entrenó da cultura para a inoculação e posteriormente testar a eficiência das metodologias escolhidas em um ensaio de campo.

### **Resistência a antracnose foliar**

Badu-Apraku et al. (1987b) identificou dois genes co-dominantes para a resistência a antracnose foliar em plântulas e plantas adultas, baseado em linhagens tropicais de milho resistentes e susceptíveis, F1, F2 e retro cruzamentos. Em outro trabalho, Badu-Apraku et al. (1987a) identificaram a ocorrência de um gene de efeito maior controlando a antracnose foliar. Coelho et al. (2001) identificaram resistência monogênica em genótipos de milho relativo a antracnose foliar, com ausência de sintomas ao inocular *C. graminicola* sugerindo, para trabalhos futuros de melhoramento, o uso de marcadores moleculares para a introgressão de genes de resistência. No trabalho de Rezende et al. (2004), chegou-se a conclusão de que o modelo sobre a herança da resistência à antracnose foliar é um modelo misto de herança com genes de maior e menor efeito. Lim & White (1978) trabalharam com inoculações em colmo e folha, encontrando efeitos significantes de resistência e susceptibilidade nas reações foliares e de colmo, indicando que a dominância parcial para resistência ou susceptibilidade se encontra no mesmo locus. Entretanto, nesse trabalho, os autores obtiveram uma baixa correlação entre as reações foliares e de colmo, indicando que elas são influenciadas por mecanismos genéticos diferentes.

### **Resistência a antracnose do colmo**

No trabalho desenvolvido por Carson et al. (1981), com os resultados do cruzamento de 4 materiais resistentes com 2 suscetíveis, foram encontrados indícios de que os efeitos aditivos na resistência a antracnose do colmo foram responsáveis por mais de 90% da variação total entre as médias, com efeitos dominantes importantes em algumas populações, concluindo que a dominância parcial para resistência ou suscetibilidade está no mesmo locus, corroborando com os resultados obtidos por Lim

& White (1978). Em outro trabalho, Carson et al. (1982) trabalhando com um material com alto nível de resistência, discorreram sobre a facilidade na transferência e fixação da resistência mediada por poucos genes maiores por retrocruzamento. Badu-Apraku et al. (1987), através de cruzamentos de uma material altamente resistente com um material suscetível, concluíram que a resistência a antracnose na fase de colmo era governada por um gene de efeito maior.

White et al. (1987) utilizaram 14 isolados de *Colletotrichum*, sendo 12 de milho e dois de sorgo, para avaliação do número de entrenós com descoloração e o número de entrenós com severidade acima de 70%, considerando como um isolado patogênico aquele que diferisse da testemunha (injeção de água). Os isolados foram agrupados, mas os autores consideraram que os grupos formados não poderiam ser considerados como raças diferentes, já que o estudo se baseou em dados quantitativos como severidade e tempo para a morte das plantas e, a diferença das linhagens quanto à resistência se baseou mais em resistência quantitativa do que qualitativa, não permitindo o uso dos materiais como série diferenciadora. A variação de virulência e agressividade dos isolados empregados no estudo na antracnose do colmo já foi reportada em outros trabalhos para a antracnose foliar (FORGEY, 1978; NICHOLSON & WARREN, 1976; WHEELER et al., 1974). White et al. (1987) consideraram que o aumento da severidade da antracnose ao longo de 25 anos (1962-1987) nos EUA pode ter como uma das explicações a ocorrência de isolados mais agressivos.

### **Considerações finais**

Para o uso de estratégias de manejo integrado na produção de milho, faz-se necessário o estudo aprofundado da variabilidade de *Colletotrichum graminicola* quanto a possível ocorrência de patótipos, sendo de vital importância na busca do controle genético desta enfermidade, considerado atualmente como o mais eficiente método de controle para a doença e a medida de menor custo para o produtor. Existem híbridos com resistência à fase foliar da doença, mas essa resistência não tem correlação com a fase de colmo. Sendo, dessa maneira, importante a escolha do material a ser plantado com a especificação se é resistente a antracnose foliar ou a do colmo em conjunto com histórico e condições climáticas da área.

### **Referências Bibliográficas**

ANDERSON, B.; WHITE, D.G. Fungi associated with cornstalks in Illinois in 1982 and 1983. **Plant Disease**, v.71, p.135-137, 1987.

BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V.E.; BERGSTRON, G.C. A major gene for resistance to anthracnose leaf blight in maize. **Plant Breeding**, v.98, ed.3, p.194-199, 1987a.

BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V.E.; BERGSTRON, G.C. A major gene for resistance to anthracnose stalk rot in maize. **Phytopathology**, v.77, p.957-959, 1987b.

BADU-APRAKU, B.; GRACEN, V.E.; BERGSTRON, G.C. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot and leaf blight in a maize inbred derived from a temperate by tropical germplasm combination. **Maydica**, v.32, p. 221-237, 1987c.

BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v.83, p. 596-608, 1999.

BIDARTONDO, M.I. et al. Preserving Accuracy in GenBank. **Science** v. 319(5870), p.1616<sup>a</sup>, 2008.

BROAD INSTITUTE. Acessado em 02 dezembro de 2009. Disponível em:

[http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum_group/MultiHome.html)).

BROGLIE, K.E.; BUTLER, K.H.; BUTRUILLE, M.G.; DA SILVA CONCEICAO, A.; FREY, T.J.; HAWK, J.A.; JAQUETH, J.S.; JONES, E.S.; MULTANI, D.S.; WOLTERS, P.J.C.C. **Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens**. United States Patent Application 20080022426. 2008.

CALLAWAY, M.B.; SMITH, M.E.; COFFMAN, W.R. Effect of anthracnose stalk rot on grain yield and related traits of maize adapted to the northeastern United States. **Canadian Journal Plant Science**, v.72, p.1031-1036, 1992.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Liking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: Prusky, D.; Freeman, S; Dickman, M.B. *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. St. Paul: APS Press, cap.5, p.1-20, 2000.

CARSON, M.L.; HOOKER, A.L. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v.71, p.1190-1196, 1981.

CARSON, M.L.; HOOKER, A.L. Reciprocal translocation testcross analysis of genes of anthracnose stalk rot resistance in a corn inbred line. **Phytopathology**, v.72, p.175-177, 1982.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S.; PINTO, N.F.J.A. **Doenças na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 83).

COELHO, R.M.S.; SILVA, H.P.; BRUNELLI, K.R.; CAMARGO, L.E.A. Controle genético da antracnose foliar em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.640-643, 2001.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março 2011 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2011.

COSTA, R.V.; FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R.; SILVA, D.D. **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 100).

COSTA, R.V.; SILVA, D.D.; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.122-128, 2010.

COTA, L.V.; COSTA, R.V.; CASELA, C.R.; LANZA F.E. **Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 5 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 120).

CROUCH, J.A., CLARKE, B.B., WHITE, J.F.; HILLMAN, B.I. Systematic analysis of falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. **Mycologia**, v.101, p.717-732, 2009b.

CROUCH, J.A.; BEIRN, L.A.; CORTESE, L.M.; BONOS, S.B.; CLARKE, B.B. Anthracnose disease of switchgrass caused by the novel fungal species *Colletotrichum navitas*. **Mycological Research**, v.113, p.1411-1421, 2009a.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, v.101, p.648-656, 2009c.

CRUZ, J.C.; MONTEIRO, J.A.; SANTANA, D.P.; GARCIA, J.C.; BAHIA, F.G.F.T.C.; SANS, L.M.A.; PEREIRA FILHO, I.A. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Serviço de produção de informação. 2ª edição. 1996.

DALE, J.L. Corn anthracnose. **Plant Disease Reporter**, v.27, p.245-249, 1963.

DENTI, E.A.; REIS, E.M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do planalto médio gaúcho e dos campos gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.585-590, 2003.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária. 2000.

FERNANDES, F.T.; BALMER, E. Situação das doenças de milho no Brasil. **Informe Agropecuário**, v.14, p.35-37, 1990.

FORGEY, W.M.; BLANCO, M.H.; LOEGERING, W.Q. Differences in pathological capabilities and host specificity of *Colletotrichum graminicola* on *Zea mays*. **Plant Disease Reporter**, v.62, p.573-576, 1978.

HOOVER, A.L.; WHITE, D.G. Prevalence of corn stalk rot fungi in Illinois. **Plant Disease Reporter**, v.60, p.1032-1034, 1976.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v.39, p.147-182, 2009.

JAMIL, F.F.; NICHOLSON, R.L. Cultural studies on *Colletotrichum graminicola* isolates from shattercane, sorghum and corn. **Mycological Research**, v.93, n.1, p.63-66. 1989.

JENNS, A.E.; LEONARD, K.J.; MOLL, R.H. Variation in the expression of specificity in two maize diseases. **Euphytica**, v.31, p.269-279, 1982.

KELLER, N.P.; BERGSTROM, G.C.; CARRUTHERS, R.I. Potential yield reductions in maize associated with an anthracnose/ European corn borer pest complex in New York. **Phytopathology**, v.76, p.586-589, 1986.

LIM, S.M.; WHITE, D.G. Estimates of heterosis and combining ability for resistance of maize to *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v.68, p.1336-1342, 1978.

LIPPS, P.E. Influence of inoculums from buried and surface corn residues on the incidence of corn anthracnose. **Phytopathology**, v.75, p.1212-1216, 1985.

MATIELLO, R.R. **Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativas de danos na produção**. 2004. 128 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, vol.3, p.170-179, 2006.

MINUSSI, E.; KIMATI, H. Taxonomia de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu Arx, 1957). **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v.9, p.171-187, 1979.

MUIMBA-KANKOLONGO, A.; BERGSTROM, G.C. Reduced anthracnose stalk rot in resistant maize is associated with restricted development of *Colletotrichum graminicola* in pith tissues. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.329-341, 2011.

- MUIMBA-KANKOLONGO, A.; BERGSTROM, G.C. Transitory wound predisposition of maize to anthracnose stalk rot. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p.1-10, 1990.
- MUIMBA-KANKOLONGO, A.; BERGSTROM, G.C. Wound predisposition of maize to anthracnose stalk rot as affected by internode position and inoculum concentration of *Colletotrichum graminicola*. **Plant Disease**, v.76, p.188-195, 1992.
- NICHOLSON, R.L.; WARREN, H.L. The issue of races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to corn. **Plant Diseases**, v.65, p.143-145, 1981.
- PERKINS, J.M.; HOOKER, A.L. The effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. **Plant Disease Reporter**, v.63, p.26-30, 1979.
- RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H-K.; LIN, F-C.; KASEM SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, p.076-083, 2010.
- REZENDE, V.F.; VENCOVSKY, R.; CÁRDENAS F.E.N.; DA SILVA, H.P., BEARZOTI, E.; CAMARGO, L.E.A. Mixed inheritance model for resistance to anthracnose leaf blight in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p.115-122, 2004.
- SHERRIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; BAILEY, J.A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, v.99, p.475-478, 1995.
- SILVEIRA, A.P.; FIGUEIREDO, M.F.; CRUZ, B.P. Ocorrência de antracnose do milho no Estado de São Paulo. **O Biológico**, v.31, p.192-194, 1965.
- SMITH, D.R. Yield reduction in dent corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Plant Disease Reporter**, v.60, p.967-970, 1976
- SUKNO, S.A.; GARCÍA, V.M.; SHAW, B.D.; THON, R.M. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.823-832, 2008.
- SUTTON, B.C. *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Fr.) Grove and *C. trichellum* (Fr. ex Fr.) Duke. **Transactions of the British Mycological Society**, v.45, p.222-232, 1962.
- TARR, S.A.J. **Diseases of Sorghum, Sudan grass and broom corn**. Kew, Survey, The Commonwealth Mycological Institute. 380p. 1962.
- VIZVARY, M.A.; WARREN, H.L. Survival of *Colletotrichum graminicola* in soil. **Phytopathology**, v.72, p.522-525, 1982.
- VON ARX, J.A & MÜLLER, E. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz. v. 11, ed. 1, p.195-196, 1954.

WARREN, H.L.; NICHOLSON, R.L.; ULLSTRUP, A.J.; SHARVELLE, E.G. Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.143-144, 1973.

WHEELER, H.; POLITIS, D.J.; PONELEIT, C.G. Pathogenicity, host range and distribution of *Colletotrichum graminicola* on corn. **Phytopathology**, v.64, p.293-296, 1974.

WHITE, D.G.; YANNEY, J.; ANDERSON, B. Variation in pathogenicity, virulence and aggressiveness of *Colletotrichum graminicola* on corn. **Phytopathology**, v.77, p.999-1001, 1987.

WILLIAMS, L.E.; WILLIS, G.M. Disease of corn caused by *Colletotrichum graminicolum*. **Phytopathology**, v.53, p.364-365, 1963.

WILSON, G.W. The identity of the anthracnose of grasses in the United States. **Phytopathology**, v.4, p.112-116, 1914

# Evaluation of methodologies to inoculate maize stalks with *Colletotrichum graminicola*

Douglas F. Parreira<sup>1</sup>, Laércio Zambolim<sup>1</sup>, Luciano V. Cota<sup>2</sup>, Rodrigo V. da Costa<sup>2</sup>, Dagma D. da Silva<sup>2</sup>, Mariele M. Marcondes<sup>3</sup>, Fabricio E. Lanza<sup>1</sup> and Wania dos S. Neves<sup>4</sup>.

Authors' addresses: <sup>1</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, 36.570-000, Brazil. <sup>2</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), EMBRAPA, Sete Lagoas, Minas Gerais, 35.701-970, Brazil. <sup>3</sup> Universidade do Meio Oeste, Guarapuava, Paraná, Brazil. <sup>4</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG), Prudente de Morais, Minas Gerais, Brazil. (Correspondence to L. Zambolim. E-mail: [zambolim@ufv.br](mailto:zambolim@ufv.br))

## Abstract:

Maize stalk rot caused by *Colletotrichum graminicola* is an important disease in Brazil, with a great impact on maize yield. However, there is no informative comparison among inoculation methods to evaluate its disease on maize resistance. The aim of this study was to determine the best method to inoculate and evaluate infections in several maize genotypes, where comparisons were made based on their practicability, using a diagrammatic scale from 0 (no necrotic spots) to 5 (100 % severity). The best method observed was infecting third elongated internodes from bottom up at tasseling stage, evaluated 30 days after inoculation, using toothpicks immersed in conidial suspension (TICS). This methodology was tested in greenhouse and under field conditions aiming to ensure efficiency and reproducibility to be employed in works for studies of genetic resistance in corn and variability of the pathogen.

Key words: *Zea mays*, internodes position, phenological stage, stalk rot.

## 1. Introduction

Today, Brazil estimated that the maize planted area in 2011/2012 (first and second seasons) reaches 15.45 million hectares, with the productivity average of 4265 kg / ha, resulting in an expected production of 55.02 million tons (CONAB, 2012).

Given the importance of Brazilian corn, the stalk rot have been considered as a major disease in corn exerting a negative impact on production, virtually occurring in all regions (COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2010). At Cota et al. (2012), the damage caused in productivity with 7 different hybrids in two crops (first and second) showed significant reduction in grain weight, comparing healthy and diseased plants, considering that corn yield is affected by the occurrence of anthracnose. Maize anthracnose caused by *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils (teleomorph *Glomerella graminicola* D.J. Politis) is an important disease throughout the world (Bergstrom & Nicholson, 1999). This disease affects all parts of the plant, however, it is commoner as leaf spots and stalk rot in the field. The pathogen is able to survive in crop debris or seeds, in the form of mycelium and conidia. The life's cycle of *C. graminicola* can be divided into five phases such as: a) From previous crop it produces and disperses primary inoculums on crop residues; b) Seedling leaf lesions; c) Leaf spots with production of secondary inoculums; d) Systemic colonization resulting in stalk rot, and e) Survival in plant debris (Bergstrom & Nicholson, 1999). The pathogen is able to colonise stem tissues before the reproductive phase in vigorous plants. In this case, direct damage is caused by stem's colonization in the vascular tissues reducing the absorption of water and nutrients. As a consequence the grains' maturation is reduced resulting in size and weight losses accounting for a worse scenario - premature plant's death (Bergstrom & Nicholson, 1999).

Before the 1970's, maize's anthracnose was not considered an important disease; however, it became important after an outbreak in the north-central regions of the United States in 1970 (Hooker & White, 1976; Perkins & Hooker, 1979). A severe anthracnose epidemic in Indiana devastated the production of sweet corn (Warren *et al.*, 1973). Successive plantation adopting a no-tillage system, without crop rotation and use

of susceptible genotypes, contributed to spread the disease in the field. Due to pathogen high ability to survive on soil and crops debris, there was a fast inoculums' accumulation on maize fields.

The presence of anthracnose in stalks can reduce ear weight and grain yield by as much as 40%, depending on the interactions among genotype, environmental conditions and pests, such as *Diatraea saccharalis* Fabr., that is frequently found in corn crops (Cota et al., 2012; Dodd, 1980; Gallo et al. 2002; Keller et al., 1986; Perkins & Hooker, 1979; Smith, 1976). Costa et al. (2010) found *C. graminicola* broadly occurring across the entire stalk causing early dryness following the evaluation of 18 commercial hybrids during three years under natural infection conditions, that the stem rot was related to the susceptible genotype and environmental conditions of each season. No resistant maize hybrid could be found, concluding, the stalk rot incidence is related to the genotype and environmental conditions at each harvest. In susceptible genotypes, *C. graminicola* occurred widely throughout extension stem causing premature death of the plant. Despite the variation observed among genotypes in different planting dates on the incidence of anthracnose stalk, no hybrid could be considered resistant to the pathogen. On the whole, identifying new sources of resistant genotypes for anthracnose stalk rot associated with variability of *C. graminicola* pathogen is fundamental to obtain high productivity in maize fields with low phytosanitary costs.

The aim of this work was to determine which inoculation method was the most efficient and feasible to evaluate the reaction at maize stalks with *C. graminicola*. Likewise we determined under field conditions: a) disease severity most appropriate time assessment after inoculation, b) the best inoculation's phenological stage and c) internodes position.

## 2. Material and Methods

The experiments were led at the National Research Centre for Maize and Sorghum – CNPMS - EMBRAPA, Sete Lagoas municipality, in the state of Minas Gerais (Brazil), from March 2009 to November 2010. A total of 12 maize genotypes: 2B587, 2B710 (Dow Agrosience), 30F35, 30P70, 30F80 (Pioneer), TRACKTOR, ATTACK (Syngenta), BRS1001 , BRS1010, BRS1030, BRS1035 (EMBRAPA), and DKB390 (Monsanto) were used in this work, conducted in greenhouses. All of them, except BRS1001 and 30F35, were tested under field conditions. In field trials, a coverage 8-28-16 NPK formulation of 300 Kg/ha were used for plant's fertilization with 100 kg of N (urea) after 25 and 45 days after planting. The experiments were set up with tillage 0.9 m spacing between rows and five plants per meter, average for each 3m line. The negative control was the last 3 plants at the end of each line. The greenhouse's test was performed in 20-L-clay pots with four seeds each. Fifteen days after planting only one seedling was kept. Ten monosporic isolates of *C. graminicola*, (6.08M, 14.04M, 16.04M, 37.09M, 114.09M, 130.09M, 132.09M, 150.09M, 152.09M, and 155.04M ), belonging to EMBRAPA's Maize and Sorghum Culture Collection. They were used in the experiments in which each isolate was grown on 5 Petri dishes containing OMA (60 g of oatmeal, 15 g agar and 1000 mL of deionised water), kept in a growth chamber at  $28 \pm 2$  °C under continuous fluorescent light. After five days, all isolates mycelia were scarified inducing sporulation.

All conidial suspensions were prepared in Petri dishes with Tween 0,02% in sterile deionised water and the isolate scrapped from the culture calibrated in Neubauer chamber to the final concentration of  $1.0 \times 10^6$  conidiam.L<sup>-1</sup> (Muimba-Kankolongo & Bergstrom, 1992). For TCMP (toothpick colonised by pathogen mycelium) method,

sterilized toothpicks were placed in sterilized plates containing OMA, inoculated same as TICS (toothpicks immersed in conidial suspension) methodology. The sterilization of toothpicks consisted in boiling them twice (Crall, 1952), dried in an oven at 60 °C and autoclaved at 121 °C for 15 min.

All stalks were harvested between the first internodes and the ear insertion with all leaves and sheaths removed. The evaluations consisted in cutting longitudinally harvest stalks, the extent injuries (necrosis) of inoculated internode were assessed using a diagrammatic scale (Figure 1), adapted from Christensen & Wilcoxon (1966), where intermediary grades were set to improve assessment's accuracy in severity evaluation (colonized area) of the inoculated internodes and number of adjacent internodes with injuries were counted. Statistics analyzes were performed with the SISVAR®-Version 5.3 software (Build 75; Ferreira, 2008).

### **2.1. Method's Evaluation**

The genotypes BRS1010, DKB390, 2B710 and 30F35 were submitted to three different inoculation methods: 1) TICS (toothpicks immersed in a conidial suspension) adapted from the Wernham "pipe cleaner" method (Christensen & Wilcoxon, 1966); 2) TCMP adapted from Young (1943); 3) ICS (injection of conidial suspension into stems) adapted from White & Humy (1976). The negative control of methods 1 and 2 were sterile toothpicks inserted in the third internode, for method 3 it was used sterilized water injection. The combination of 6 repetitions with each treatment resulted in a total of 30 plants, where all inoculations were done at the tasseling stage (VT), with three leaves and its sheath removed from the base of each plant, exposing the internodes, and disinfecting with 70% alcohol. For treatments TICS and TCMP, a hole was made using a sterilized awl and the toothpick was inserted approximately 1/3 of its length (2.7 cm)

which can carry in TICS method a volume of 0.03 mL of suspension (30,000 conidia). For ICS method, maize stems were injected with approximately 0.5 mL of conidial suspension using a 2 mL syringe and the holes were sealed with silicone glue.

### **2.1.1 Method TICS' Evaluation**

To evaluate the best interval of evaluation it was used six periods of days after inoculation (DAI), influence of phenology and internodes position by inoculation on disease severity, and a field evaluation, TICS was selected. Three hybrids (BRS1001, 2B710 and Attack) were submitted to inoculation with isolate 16.04 M, which has been used by EMBRAPA in recent years as standard tests of corn genotypes for anthracnose assessment (unpublished data), and a negative control, as previously described at VT in a greenhouse and evaluated in 5, 10, 15, 20, 25 and 30 DAI. The 10 maize genotypes used in field conditions described above were evaluated in: A) phenological stages with *C. graminicola* at the inoculation on A.1) seventh leaf (V7), A.2) tenth leaf (V10) and A.3) at VT; B) Internodes inoculation were evaluated at the first, third and fifth position.; C) On a final field experiment TICS was tested by its efficiency, functionality and practicability () using 10 different isolates of *C. graminicola* at third internodes in VT stage, evaluated at 30 DAI. (A) and (B) had a completed randomized block design with treatments arranged in a double factorial. Another part of the validation test consisted by inoculating isolate 16.04M at 10 different dates: 13 April, 20 April, 27 April, 29 July, 4 May, 26 August, 3 September, 9 September, 16 September and 23 September in 2010 year. Inoculations were avoided when environmental conditions, such as low temperatures, did not allow the full plant's development.

### **3. Results**

#### **3.1 Greenhouse Trials**

The three tested inoculation methods produced characteristic lesions in the inoculated internodes, but it was TICS which showed the highest level of severity and lowest average deviation followed by ISS and TCPM (Table 1).

The best and the most efficient period between inoculation and evaluation among genotypes were 30 DAI with distinction among the levels of resistance or susceptibility of genotypes, although with 10 DAI stem rot symptoms were observed in linear regressions (Fig.2). A comparison between cultivars BRS1010 (moderately resistant) and ATTACK (susceptible) showed at 30 DAI that the stems of both cultivars became widely colonised by the pathogen while with cultivar 2B710 the same didn't happened, considering that its linear regression was parallel to the negative control (Figure 2).

#### **3.2 Field Trials**

The stalk rot was influenced by the stage of plant where the highest averages based on the 10 maize genotypes evaluated, were obtained with inoculations performed in the VT stage (Table 2) and yet, a better distinction between the cultivars was obtained with the tasseling stage (VT). In the first and second phenological stages (V7 and V10) only cultivar 2B710 showed significant differences in severity compared with the other cultivars. In VT, cultivar 2B710 had low severity, cultivar BRS1010 had intermediate severity and the other eight cultivars had severity at high levels.

Regarding internodes positions, at the fifth internodes the highest average severity was observed considering 10 hybrids, the third internodes had intermediate

levels of severity, and the first internodes showed the lowest severity average (Table 03).

For field validation tests, TICS method (VT stage, third internodes, 30 DAI) was effective with 10 different isolates (Figures 3) showing high levels of severity in all materials as the isolate 16.04 M in different dates (Table 4), except the cultivar 2B710.

#### **4. Discussion**

TICS was revealed to be the best method due to its lower cost, easier, faster execution, easy standardisation, resulting in a lower standard deviation (Table 1), even when inoculations were performed by different applicants. TCMP method, although efficient, it generated difficulties to inoculate due to toothpicks' rigidity loss hindering its insertion process caused by fungal colonization. This method has been successfully used for other pathogen systems, such as the sudden death syndrome, caused by *Fusarium solani* f. sp. *glycines* (Gásperi *et al.*, 2003), and the soybean stem canker, caused by *Diaporthe phaseolorum* (Keeling, 1982). The ICS method has been widely used when one or a few isolates were assessed (Badu-Apraku *et al.*, 1987; Carson *et al.*, 1981; Keller & Bergstrom, 1988; Muimba-Kankolongo & Bergstrom, 2011; Reid & Zhu, 2005; Toman & White, 1993 and White *et al.*, 1987). The ICS method had the largest standard deviation difficulting to standardise the injected inoculums' amount varying with different applicators because the volume injected is direct related with equipment user. Another issue was the necessity to use a larger number of isolates being needed to clean the entire equipment for each change having the process cumbersome, time-consuming and prone to contamination.

Results showed that the interval time to evaluate and assess disease with the highest level of severity was 30 DAI (Figure 2), even though Muimba-Kankolongo &

Bergstrom (1992) assessed severity at 21 DAI showing total reducing interval time to evaluate and assess could underestimate the disease severity.

The severity at different phenological stages showed differences where with the highest severity mean was on VT 81.43% of severity average (Table 2), these results corroborate with those obtained by Keller & Bergstrom (1988) who found a significant increase in anthracnose stalk inoculated stages of VT and reproductive 1 (R1). In VT stage, the hybrid TRACTOR reached 100% severity. In addition, the severity average at V7 and V10 were statistically equal (Table 2). It is desirable that the stalk rot experiments was made in less time, reducing the period of evaluation and made inoculation in earlier stages of seedlings, this aim is not achieved inoculating in VT and evaluating at 30 DAI.

Inoculation in three different internodes positions (1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup>) showed good results (Table 3) although the fifth, despite achieving the greatest severity, was not effective due to characteristics of the stem's portion such as its thinness making it to prone and breakage during leaf removal and inoculation. In some cases, the same one coincided with the insertion point of the ear, becoming inappropriate to perform inoculations. The third internodes was considered the best position for inoculation being possible to assess the number of internodes colonised above or below where the severity average was equal in eight of the 10 genotypes. The first one resulted in minor severity and operational difficulties were found during inoculation and harvest for stalk evaluations due to the proximity with soil level. In the first position above adventitious roots the lesions were restricted to the internodes itself, while the two others caused adjacent, up and down infections. The results obtained under field conditions were consistent with those obtained in greenhouses. Thus, our methodology might be considered successful for breeding programs aimed at phenotyping maize strains and for

studies in which a large number of isolates needs to be inoculated. Currently, the most commonly used methodology in field inoculations is the injection of spores in the first or second internodes, just above adventitious roots (Keller & Bergstrom, 1988; Muimba-Kankolongo & Bergstrom, 2011; Nyhus *et al.*, 1989). In these cases, inoculations are made with one or a few isolates.

Several inoculations made with isolate 16.04M were efficient and had a small standard deviation (Figure 4), which ensures the repeatability of the chosen methods. The combination of methods, i.e. TICS in the third internodes at VT and assessed at 30 DAI, was practical and easy to use for inoculations under field conditions; all isolates infected the inoculated stems, and no contamination problems were found in controls, enabling the use of this methodology in assessing genetic resistance of corn materials to anthracnose, in study of the pathogen population and the effectiveness of control strategies under field conditions.

### **Acknowledgements**

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior - CAPES, Embrapa Milho e Sorgo and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

### **References**

Badu-Apraku B, Gracen VE, Bergstrom GC. (1987) A major gene for resistance to anthracnose stalk rot in maize. *Phytopathology*. **77**: 957–959.

Bergstrom GC, Nicholson RL. (1999) The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease*. **83**: 596–608.

Carson ML, Hooker AL. (1981) Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. **71**:1190–1196.

Christensen JJ, Wilcoxson RD. (1966) *Stalk rot of corn*. Saint Paul: The American Phytopathological Society.

Costa RV, Silva DD, Cota LV, Parreira DF, Ferreira AS, Casela CR. (2010) Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. *Summa Phytopathologica*. **36**(2): 122–128.

Cota LV, Costa RV, Silva DD, Casela CR, Parreira DF. (2012) Quantification of Yield Losses Due to Anthracnose Stalk Rot on Corn in Brazilian Conditions. *Journal of Phytopathology*. doi: 10.1111/jph.12008.

Crall JM. (1952) A toothpick tip method of inoculation. *Phytopathology*. **42**: 5–6.

Dodd JL. (1980) Grain sink size and predisposition of *Zea mays* to stalk rot. *Phytopathology*. **70**: 534–535.

Ferreira DF. (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*. **6**: 36–41.

Gásperi AC, Prestes AM, Costamilan LM. (2003) Reação de cultivares de soja à podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Fitopatologia Brasileira*. **28**: 544–547.

Hooker AL, White DG. (1976) Prevalence of corn stalk rot fungi in Illinois. *Plant Disease Reporter*. **60**: 1032–1034.

Keeling BL. (1982) A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology*. **72**: 807–809.

Keller NP, Bergstrom GC. (1988) Developmental predisposition of maize to anthracnose stalk rot. *Plant Disease*. **72**: 977–980.

Keller NP, Bergstrom GC, Carruthers RI. (1986) Potential yield reductions in maize associated with an anthracnose / european corn borer pest complex in New York. *Phytopathology*. **76**: 586–589.

Muimba-Kankolongo A, Bergstrom GC. (2011) Reduced anthracnose stalk rot in resistant maize is associated with restricted development of *Colletotrichum graminicola* in pith tissues. *Journal of Phytopathology*. **159**: 329–341.

Muimba-Kankolongo A, Bergstrom GC. (1992) Wound predisposition of maize to anthracnose stalk rot as affected by internode position and inoculum concentration of *Colletotrichum graminicola*. *Plant Disease*. **76**: 188–195.

Nicholson RL, Warren HL. (1981) The issue of races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to corn. *Plant Disease*. **65**: 143–145.

Nyhus KA, Russell WA, Guthrie WD, Martinson CA. (1989) Reaction of two maize synthetics to anthracnose stalk rot and northern corn leaf blight following recurrent selection for resistance to *Diplodia* stalk rot and European corn borer. *Phytopathology*. **79**:166–169.

Perkins JM, Hooker AL. (1979) The effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. *Plant Disease Reporter*. **63**: 26– 30.

Reid LM, Zhu X. (2005) *Screening corn for resistance to common diseases in Canada*. Agriculture and Agri-Food Canada Central Experimental Farm Ottawa, Ontario.

Smith DR. (1976) Yield reduction in dent corn caused by *Colletotrichum graminicola*. *Plant Disease Reporter*. **60**: 967–970.

Toman JJr, White DG. (1993) Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot of corn. *Phytopathology*. **83**: 981–986.

Warren HL, Nicholson RL, Ullstrup AJ, Sharvelle EG. (1973) Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. *Plant Disease Reporter*. **57**: 143–144.

White DG, Humy C. (1976) Methods for inoculation of corn stalks with *Colletotrichum graminicola*. *Plant Disease Reporter*. **60**: 898–899.

White DG, Yaney J, Anderson B. (1987) Variation in pathogenicity, virulence and aggressiveness of *Colletotrichum graminicola* on corn. *Phytopathology*. **77**: 999–1001.

Young HCJr. (1943) The toothpick method of inoculating corn for ear and stalk rot. *Phytopathology*. **33**: 16.

## Tables

**Table 1** Severity of anthracnose stalk rot on corn genotypes, inoculated with the isolate 16.04M of *C. graminicola*, using three methods of inoculation.

Genotypes	Methods of inoculation		
	TCMP <sup>1</sup>	ICS <sup>2</sup>	TICS <sup>3</sup>
2B710	40.25 (32.25) <sup>4</sup>	51.50 (26.50)	53.50 (30.25)
30F35	77.00 (20.25)	64.00 (22.75)	90.25 (18.00)
BRS 1010	80.25 (17.00)	80.25 (26.75)	82.75 (17.50)
DKB 390	60.50 (22.50)	80.50 (17.25)	73.25 (20.25)
Average (ASD)	64.50 (23.00) <sup>5</sup>	69.06 (23.31)	74.94 (21.50)

### Footnotes

1Toothpick colonized by mycelium of the pathogen (TCMP); 2toothpick immersed in a conidial suspension (TICS); 3injection of conidial suspension (ICS); 4Standard deviation; 5Average standard deviation.

**Table 2.** Influence of phenological stages development of corn plants on severity of anthracnose stalk rot (%) on ten corn genotypes inoculated with toothpick immersed in a conidial suspension of *C. graminicola*.

Genotype	Phenological Stage		
	V7	V10	VT
2B587	59,0	61,3	87,5
2B710	13,5	20,3	38,8
30F80	46,0	57,5	96,3
30P70	57,5	40,0	80,0
ATTACK	43,3	46,5	88,8
BRS 1010	58,8	38,8	64,3
BRS 1030	60,0	49,5	86,3
BRS 1035	58,5	44,8	91,3
DKB 390	65,0	48,8	81,3
TRACKTOR	44,5	50,8	100,0
Average	50,6 A	45,8 A	81,4 B

### Footnotes

Means followed by same capital letters in lines do not differ significantly among themselves by Tukey test at 1% probability (p-value < 0,01).

**Table 3** Influence of internodes positions severity of stalk rot (%) on ten corn genotypes. The stalks were inoculated at VT with TICS method. The internodes inoculate were: 1 (the first), 3 (third) and 5 (fifth) expanded.

Genotypes	Position of inoculated internodes		
	1	3	5
2B587	82,8	87,5	93,8
2B710	32,5	38,8	47,5
30F80	82,5	96,3	89,0
30P70	51,3	80,0	94,5
ATTACK	56,3	88,8	100,0
BRS 1010	48,3	64,3	90,0
BRS 1030	43,8	63,8	92,3
BRS 1035	57,1	89,5	86,0
DKB 390	77,5	81,3	95,4
TRACKTOR	87,5	100,0	100,0
Average	61,9 A	79,0 AB	88,8 B

#### Footnotes

Means followed by same capital letters in lines do not differ significantly among themselves by Tukey test at 1% probability (p-value < 0,01).

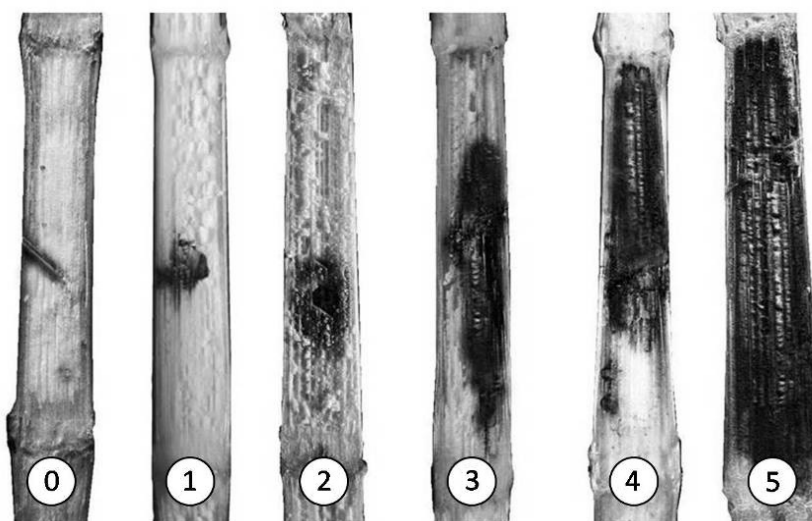
**Table 4** Severity mean (%) of stalk rot in ten corn cultivars, inoculated in ten different, with the isolate 16.04M of *C. graminicola*, bars are average standard deviation.

Inoculation dates	Hybrid									
	2B587	2B710	30F80	30P70	Attack	BRS1010	BRS1030	BRS1035	DKB390	Tracktor
13-Apr	90,0	27,5	72,5	70,0	67,5	60,0	55,0	70,0	87,5	57,5
20-Apr	97,5	32,5	87,5	75,0	90,0	60,0	90,0	85,0	90,0	75,0
27-Apr	87,5	27,5	75,0	52,5	70,0	57,5	70,0	67,5	85,0	67,5
29-July	95,0	22,5	90,0	77,5	82,5	75,0	87,5	65,0	90,0	70,0
4-May	81,0	41,3	62,5	62,8	65,6	88,1	62,5	92,5	90,0	71,3
26-Aug	86,1	24,5	65,0	65,3	63,8	70,0	72,5	60,0	65,8	72,0
3-Sept	71,3	16,3	52,5	77,5	70,0	70,0	66,3	70,0	78,8	60,0
9-Sept	92,5	34,0	77,8	95,0	90,0	77,8	85,0	79,2	95,0	77,5
16-Sept	98,2	31,4	83,9	82,1	98,2	92,9	95,8	100,0	83,9	89,3
23-Sept	88,8	35,6	75,0	83,8	93,8	78,8	68,8	85,0	82,5	84,7
Average	29,3	79,1	84,8	74,2	72,5	74,2	88,8	77,4	73,0	75,3
SD <sup>1</sup>	7,2	13,1	8,2	12,0	9,9	11,7	8,1	13,0	11,9	13,4

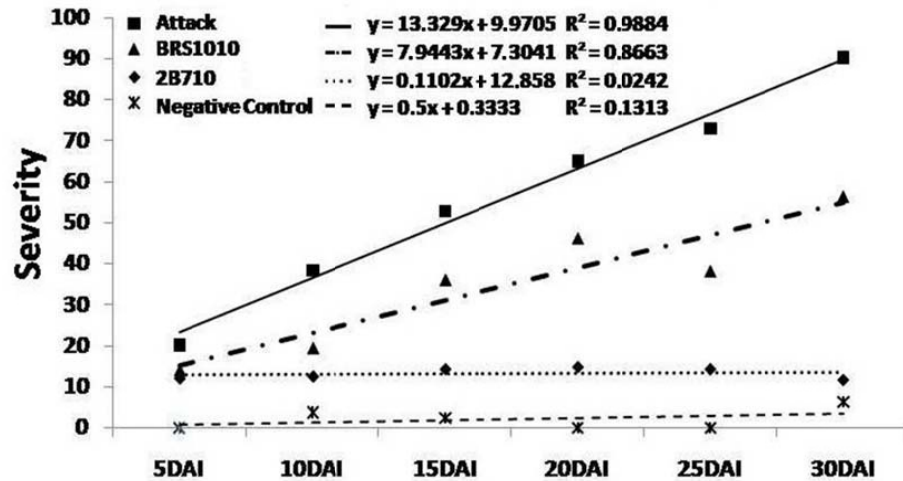
## Footnotes

1 Standard deviation

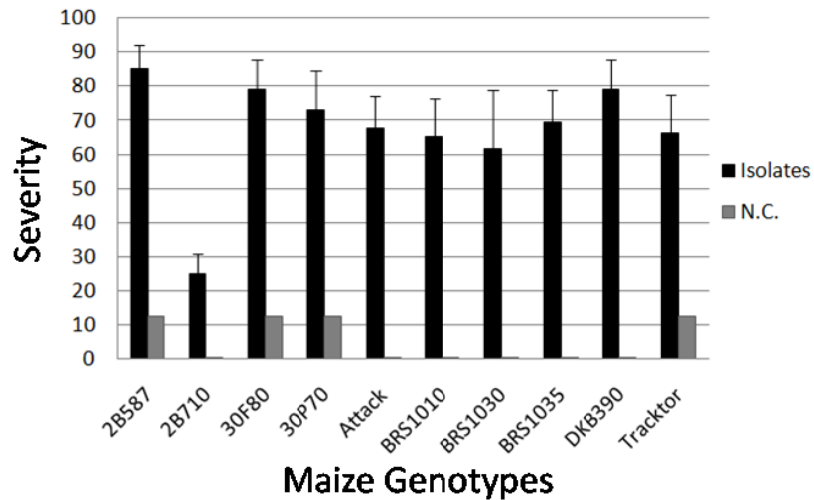
## Figures captions



**Figure 1** Rating scale used to evaluate stalk rot severity on the corn internodes. Rating 0 (0% necrotic tissue); rating 1 (12.5% diseased tissue); rating 2 (25% diseased tissue); rating 3 (50% diseased tissue); rating 4 (75% necrotic tissue) and rating 5 (100% necrotic tissue).



**Figure 2** Linear regression of stalk rot caused by *Colletotrichum graminicola*, in three corn genotypes, and Negative Control (mean of control of three genotypes) evaluated at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days after inoculation (DAI).



**Figure 3** Severity mean (%) of stalk rot in ten corn cultivars, inoculated with 10 different isolates (6.08M, 14.04M, 16.04M, 37.09M, 114.09M, 130.09M, 132.09M,

150.09M, 152.09M, and 155.04M ) and Negative Control (NC), bars are average standard deviation.

## VARIABILIDADE FENOTÍPICA DE *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils EM COLMOS DE MILHO NO BRASIL

Douglas Ferreira Parreira<sup>1</sup>, Laércio Zambolim<sup>1</sup>, Rodrigo Vêras da Costa<sup>2</sup>,  
Luciano Viana Cota<sup>2</sup>, Dagma Dionísia da Silva<sup>2</sup>, Wania dos Santos Neves<sup>3</sup>, Ubiraci G. P.  
Lana<sup>2</sup> e Eliane A. Gomes<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Proteção de Plantas. Viçosa-MG. E-mail: [douglas2002ufv@yahoo.com.br](mailto:douglas2002ufv@yahoo.com.br); [zambolim@ufv.br](mailto:zambolim@ufv.br).

<sup>2</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Email: [veras@cnpms.embrapa.br](mailto:veras@cnpms.embrapa.br) ; [lvcota@cnpms.embrapa.br](mailto:lvcota@cnpms.embrapa.br) ; [ddionisia@yahoo.com.br](mailto:ddionisia@yahoo.com.br); [ubiraci@cnpms.embrapa.br](mailto:ubiraci@cnpms.embrapa.br); [eliane@cnpms.embrapa.br](mailto:eliane@cnpms.embrapa.br).

<sup>3</sup> Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional EPAMIG Centro-Oeste. Prudente de Moraes, MG. Brasil. [wanianeves@epamig.br](mailto:wanianeves@epamig.br) ..

**RESUMO** - Dentre as doenças que atacam a cultura do milho, a antracnose (*Colletotrichum graminicola*) é considerada uma das mais importantes pelos agricultores brasileiros, principalmente em áreas onde se utiliza o sistema de plantio sobre a palha sem o uso de rotação de culturas. Neste trabalho objetivou-se avaliar a reação de 10 híbridos de milho a 165 isolados monospóricos de *C. graminicola* obtidos de campos de produção de milho no Brasil. Três padrões de severidade de *C. graminicola* entre os 165 isolados foram observados e a identidade de parte dos isolados foi confirmada com o uso da região ITS. O híbrido 2B710 apresentou resistência à maior parte dos isolados, os outros híbridos se comportaram de maneira semelhante entre si, sendo todos suscetíveis a grande maioria dos isolados. Este é o primeiro trabalho com fortes evidências da ocorrência de patótipos de *C. graminicola* causando podridão de colmo de milho no Brasil.

Palavras-chave: *Zea mays*, podridão de colmo, ITS.

## PHENOTYPIC VARIABILITY *Colletotrichum graminicola* (CES.) G.W. WILS PATOTYPES IN MAIZE STALK IN BRAZIL.

**Abstract** - Among the diseases that attack maize crops, anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) has been considered one of the most threatening to Brazilian farmers, especially in areas where the no-tillage system without the adoption of crop rotation predominates. This study evaluated the reaction of 10 maize genotypes to 165 single spore isolates of *C. graminicola* obtained from maize fields in Brazil. Three severity patterns of *C. graminicola* among 165 isolates were observed and the identity of the isolates was confirmed using the ITS region. The hybrid 2B710 showed resistance to most isolates, other hybrids behaved similarly to each other, all being susceptible to great majority of isolates. This is the first study with strong evidence of the occurrence of pathotypes of *C. graminicola* causing stalk rot of corn in Brazil.

**Key words:** *Zea mays*, stalk rot, ITS.

A antracnose do milho causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils (teleomófo *Glomerella graminicola* D.J. Politis) é uma das principais

doenças do milho em todo o mundo (Bergstron & Nicholson, 1999). A doença afeta todas as partes da planta, entretanto, é comumente encontrada no campo nas formas de mancha foliar e podridão do colmo. O patógeno pode sobreviver em restos de cultura ou em sementes, na forma de micélio e conídios. O patógeno é capaz de colonizar os tecidos do colmo antes da fase reprodutiva, causando danos diretos durante a colonização dos tecidos vasculares do colmo, reduzindo a absorção de água e de nutrientes. Como consequência, há um menor enchimento dos grãos, que resulta em menores tamanhos e peso de espigas, colonizações dos tecidos após a maturação fisiológica dos grãos, que podem favorecer o tombamento de plantas, o que pode dificultar a colheita mecânica e, expor as espigas à ação de roedores e ao apodrecimento (Casela et al., 2006, 2008; Costa et al., 2008). A antracnose do colmo pode reduzir o peso de espigas e de grãos em até 34%, comparando-se plantas doentes e sadias do mesmo cultivar (Cota et al., 2009).

Muitos fatores têm contribuído para o aumento da incidência de doenças na cultura do milho e para a sobrevivência dos patógenos no campo. Entre os fatores que contribuem para o aumento da ocorrência da doença estão: ampla adoção do sistema de plantio direto sem a rotação de culturas, aumento das áreas irrigadas e daquelas com cultivo de milho em monocultura, condições climáticas e a aplicação excessiva de nitrogênio. Medidas culturais como a rotação de culturas, o uso de adubação equilibrada, principalmente com relação a N e K, e espaçamento e densidade de plantas adequadas, são importantes como medidas complementares ao uso de cultivares resistentes (Brasil & Carvalho, 1998; Pinto et al., 2006; Tomazela et al., 2006). Não existem fungicidas registrados no Ministério da Agricultura para o manejo de podridões de colmo na cultura do milho e, os resultados de pesquisa são contraditórios quanto ao efeito direto desses produtos em patógenos localizados internamente no colmo.

O objetivo neste trabalho foi promover o levantamento da ocorrência de patótipos de *C. graminicola* na fase de colmo da doença e a confirmação da espécie de parte dos isolados através do uso de ferramentas moleculares.

### **Material e Métodos**

Os ensaios de campo foram conduzidos no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas (MG), de março a dezembro de 2010. Foi utilizada uma série diferenciadora composta por 10 híbridos, sendo escolhidos, uma parte pela representatividade da área plantada no Brasil e outra parte por comporem o acervo da

Embrapa: 2B587 (Dow Agrosience), 2B710 (Dow Agrosience), 30P70 (Pioneer), 30F80 (Pioneer), ATTACK (Syngenta), BRS 1010 (Embrapa), BRS 1030 (Embrapa), BRS 1035 (Embrapa), DKB 390 (Dekalb) e TRACKTOR (Syngenta). Para a adubação foi utilizado 300 kg/ha da formulação 8-28-16 (NPK). As adubações de cobertura foram realizadas aos 25 e 45 dias após o plantio utilizando-se 100 kg/ha de N, na forma de uréia. Os experimentos de campo foram implantados sob semeadura direta, com espaçamento de 0,9 m entre linhas e média de cinco plantas por metro, tendo cada linha 3,0 m, onde cada isolado foi inoculado em 150 plantas chegando a um volume aproximado de 30.000 plantas inoculadas e avaliadas do início até o final do experimento.

### **Preparo de inóculo e inoculação**

Foram utilizados 165 isolados monospóricos de *C. graminicola* amostrados em oito estados brasileiros: Goiás (13), Minas Gerais (66), Mato Grosso (9), Paraná (56), Rondônia (6), Rio Grande do Sul (4), Santa Catarina (9) e São Paulo (2). Todos os isolados foram depositados na Coleção de Fungos Fitopatogênicos das Culturas do Milho e Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo. Para a produção de inóculo, os isolados foram retirados de tubos de ensaio previamente colonizados pelo isolado e recobertos por óleo mineral. Em seguida, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo o meio FAA (farinha de aveia agar), para que ocorresse a reativação do isolado e, subsequente repicagem para mais placas para a produção de esporos em massa. A suspensão de esporos foi preparada através da adição de água deionizada contendo Tween 20, seguida de raspagem das mesmas para que houvesse a liberação dos esporos e a inoculação fosse realizada. A concentração da suspensão foi então ajustada para  $1 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>, por meio de contagem em hemacitômetro. As plantas foram inoculadas na fase de pendoamento (VT), retirando-se as três folhas baixas (folha e bainha) no momento da inoculação e realizando a desinfestação dos entrenós utilizando-se gaze umedecida em álcool 70%. Em seguida, os colmos foram perfurados com um furador esterilizado e, logo após, um palito previamente esterilizado foi imerso na suspensão de conídios e inserido no orifício. O inóculo foi inserido no terceiro entrenó segundo a metodologia descrita por Parreira et al. (201X). Cada bloco composto pelos dez híbridos foi inoculado com um isolado diferente. As testemunhas negativas consistiram da inserção de palitos secos autoclavados e a testemunha positiva consistiu na inoculação de um isolado padrão (16.04M) em todas as inoculações, sendo

inoculados 10 isolados diferentes por semana. O isolado 16.04M tem sido empregado na maioria dos trabalhos desenvolvidos pela equipe de pesquisa em Fitopatologia da Embrapa Milho nos últimos anos e a reação de parte dos híbridos testados para esse isolado já era previamente conhecida (dados não publicados).

### **Avaliações**

Após 30 dias da inoculação, partes do colmo das plantas foram colhidas e avaliadas em condição de laboratório. Na colheita, foram removidas todas as folhas das plantas e a parte dos colmos compreendida entre o primeiro entrenó e o entrenó de inserção da espiga foi colhida e encaminhada ao laboratório para as avaliações. As partes do colmo coletadas foram cortadas longitudinalmente e a extensão das lesões (severidade) foi avaliada no entrenó inoculado utilizando-se a escala diagramática de Christensen & Wilcoxson (1966), adaptada por Parreira et al., (201X) para a antracnose do colmo. A nota do entrenó inoculado e o número de entrenós apresentando descoloração foram anotados sendo tabulados para a análise de médias e de variância. Essa escala é composta de cinco notas de avaliação: 0 (0% do tecido do entrenó necrosado), 1 (15 % do tecido do entrenó necrosado), 2 (25 % do tecido do entrenó necrosado), 3 (50 % do tecido necrosado), 4 (75 % do tecido necrosado) e 5 (100% do tecido necrosado). Médias menores que 2 (25% de severidade) foram consideradas resistentes e notas maiores ou iguais a 2 susceptíveis. Nos casos onde a inoculação do isolado padrão apresentou diferença das demais inoculações, os 10 isolados inoculados em conjunto foram inoculados de novamente em novos blocos. As análises de variância dos experimentos e os testes de médias foram realizados com o programa estatístico gratuito SISVAR<sup>®</sup> - versão 5.3 (Build 75) (Ferreira, 2008).

### **Seleção de isolados e extração do DNA**

Para a extração do DNA, 13 isolados foram selecionados, baseando-se na diferença de severidade apresentada pela série diferencial. Dois isolados de *C. sublineolum* (S11.11 e S12.11), pertencentes a coleção da Embrapa, foram utilizados como grupo externo no trabalho, além da incorporação da seqüência da região ITS de 7 espécies de *Coletotrichum* spp. listados no trabalho de Hyde et al. (2009): *C. acutatum* (IMI 117617), *C. capsici* (CBS 120709), *C. cereale* (KS 20BIG), *C. gloeosporioides* (CBS 95397), *C. graminicola* (M 1001), *C. sublineolum* ( S 3001) e *C. truncatum* (CBS 15135).

### **Obtenção de massa micelial de *C. graminicola* e extração do DNA.**

Para a obtenção de massa micelial, os 15 isolados monospóricos de *Colletotrichum* spp. foram transferidos para placas de Petri, contendo meio FAA e mantidos a 25 °C, por sete dias. Fragmentos de micélio foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido YES (10 g/L de sacarose, 6 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 6 g.L<sup>-1</sup> de caseína) previamente esterilizado, adicionado de 1mL dos antibióticos streptomomicina e tetraciclina (0,3 mg/mL). Os frascos foram mantidos em agitador a 90 rpm, a 28 °C, por 72 horas. A massa micelial foi filtrada em duas camadas de gaze esterilizada e, em seguida, em papel de filtro esterilizado. As amostras foram armazenadas em freezer a 20 °C negativos, envoltas por papel alumínio até o momento da extração do DNA.

Para a extração de DNA, utilizou-se a metodologia descrita por Saghai-Marooft et al. (1984), adaptada. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e em seguida adicionou-se 350 µL de tampão CTAB [2% (m/v) CTAB; 0,2 M Tris- HCl (pH 7,5); 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 2% (v/v) 2-mercaptoetanol]. As amostras foram mantidas em banho-maria a 65 °C, durante uma hora. Após resfriamento por 5 minutos em condição ambiente, promoveu-se a lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1 v/v), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 14.000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, onde foram adicionados 300 µL de isopropanol a -20°C por, no mínimo, uma hora. Os microtubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 140 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente levados à centrífuga por 10 minutos, a uma rotação de 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual seco em estufa a 65 °C por cinco minutos. Os DNAs precipitados foram ressuspensos em 50 µL de tampão TE, contendo RNase A (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg/µL RNase A). A concentração das amostras foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop e ajustada para 10 ng.µL<sup>-1</sup>, diluindo-se o DNA estoque em água ultrapura. O DNA foi armazenado a -20 °C até o momento da amplificação.

### **Sequenciamento do DNA**

A reação de PCR foi feita num volume total de 50 µL, contendo 30 ng de DNA, 1,5 unidades de Taq DNA Polymerase (Sigma Aldrich, St. Louis MO), 10 mM Tris-HCl

pH 8,3, 50 mM KCl, 0.001% (p/v) agar, 0.125 mM dNTP, 1% (v/v) formamida e 0.4 µM de cada primers do par ITS 4/5. As condições do PCR foram 95 °C por 5 minutos seguidas de 40 ciclos a 95 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e, o passo de alongação final a 72°C, por 20 minutos. Os produtos do PCR foram purificados utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). As sequências purificadas foram determinadas utilizando o kit ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), no seqüenciador modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências ITS 4/5 foram analisadas e comparadas no GenBank, através do programa BLASTN (Altschul et al., 1997) no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

As sequências de DNA das regiões ITS acrescidas das sequências dos tipos foram alinhadas pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), através da ferramenta ClustalW (Thompson et al., 1994), utilizando 1000 bootstraps. A avaliação das seqüências através da elaboração de um dendrograma foi feita pelo programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011), utilizando a opção de 10000 bootstraps, pelo método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993).

### **Resultados e Discussão**

Foram identificados três padrões de virulência para os 165 isolados, sendo estes classificados como 1, 2 e 3 (tabela 01). O padrão 1 corresponde ao grupo de isolados que apresentou alta severidade para os 10 híbridos, o padrão 2 ao que apresentou baixa severidade apenas para o híbrido 2B710 e o padrão 3 ao que apresentou baixa severidade para os 10 híbridos.

Os híbridos 2B587, 30P70, 30F80, ATTACK, BRS 1010, BRS 1030, BRS 1035, DKB 390 e TRACKTOR apresentaram alta severidade para 157 isolados, com exceção dos oito isolados do padrão 3. O híbrido 2B710 apresentou resistência a 56 isolados, desconsiderando os isolados do padrão 3, sendo considera como reação de resistência quando a colonização foi inferior a 25% do entrenó inoculado e sem sinais de infecção nos entrenós adjacentes. Os materiais que apresentaram maiores severidades foram 2B587 e DKB390 e, o com severidade menor foi o 2B710 (Figura 1).

A colonização dos entrenós também apresentou diferenças entre os híbridos. Os híbridos com maior número de entrenós colonizados foram 2B587 e DKB390 e o com menor foi 2B710 (Figura 2). Os controles negativos que deram descoloração, apesar de ser de coloração mais clara que a causada por *C. graminicola*, foram colocados em placas com FAA, mas não foi encontrado crescimento micelial fúngico após 15 dias, corroborando com os resultados obtidos por Nicoli et al. (2012), sendo considerada a descoloração das testemunhas como uma reação natural da planta ocasionada pelo uso do furador, seguido da inserção do palito.

A análise molecular dos isolados apresentou um único agrupamento para todos os isolados provenientes de milho, com exceção do isolado M70.09 que se agrupou com *C. truncatum* e *C. capsici*. Os dois isolados de *C. sublineolum* se agruparam com o seu isolado tipo.

O dendrograma com maior logaritmo de verossimilhança obteve o valor de -898.0756 e os valores de bootstraps foram colocados próximos aos ramos (Figura 4). A árvore foi feita em escala, com os comprimentos das ramificações medidos pelo número de substituições por site e, seguindo o conceito de que as árvores filogenéticas para serem confiáveis devem possuir os nós com o valor de Bootstrap acima de 95% (Buso, 2005). Pode-se destacar três grupos na árvore: G1, G2 e G3 (Figura 4), lembrando que o valor de Bootstrap representa o número de vezes que o agrupamento ocorreu através do uso aleatório das sequências, determinado antes de realizar a análise, nesse caso 1000. A análise envolveu 22 sequências de nucleotídeos e todas as posições que contêm lacunas e dados faltantes foram eliminados.

Até o momento nenhum relato da ocorrência de patótipos havia sido feito. Segundo Bergstrom e Nicholson (1999), *C. graminicola* exibe uma grande variação em agressividade nas fases de folha e colmo mas, sem evidências consistentes da ocorrência de patótipos. Considerando-se que na literatura foi encontrado somente um gene para resistência na fase de colmo até o momento, apenas dois patótipos poderiam ser diferenciados (Broglie et al., 2009). O padrão 1, que foi capaz de colonizar eficazmente todos os 10 materiais, representa 61% de todos isolados. O padrão 2, com baixa virulência ao 2B710, representa 34% dos isolados, ficando evidente a ampla distribuição dos dois padrões pelas principais regiões produtoras de milho no Brasil. Já o padrão 3, pouco virulento a todos os híbridos, representando apenas 5% dos isolados, foi pouco representativo e, dentre eles, o isolado M 70.09 se agrupou no dendrograma com *C. capsici* e *C. truncatum* (Figura 4), devendo em um trabalho taxonômico

posterior ter sua espécie reavaliada. Baseado nas respostas de severidade aos 10 híbridos considerou-se os resultados como uma forte evidência da ocorrência de patótipos na fase de colmo da antracnose. Quando comparamos com a diversidade encontrada em *C. sublineolum*, a ocorrência desses possíveis patótipos parece modesta, mas vale ressaltar que o melhoramento visando à resistência dessa enfermidade é recente quando comparado com o melhoramento de sorgo para a antracnose. Vários trabalhos foram feitos comprovando a existência de raças de *C. sublineolum* (Costa et al., 2003).

A série diferencial utilizada não foi robusta, pois apenas o híbrido 2B710 apresentou reação de resistência à parte dos isolados em severidade e colonização de entrenós. Esse fato sugere a presença de uma possível fonte de resistência no híbrido 2B710, podendo ter seus parentais utilizados em programas de melhoramento futuros. Os demais materiais se comportaram de maneira semelhante, sendo recomendado para trabalhos futuros o uso de materiais diferentes na série com a permanência do 2B710 como resistente, o 2B587 ou o DKB390 como padrões de susceptibilidade para a severidade no entrenó inoculado e o híbrido ATTACK ou BRS1035 como padrão de susceptibilidade no número de entrenós infectados.

O híbrido 2B710 possibilitou uma distribuição dos isolados mais homogênea dentro das notas de severidade com um número significativo de isolados nas notas mais baixas, indicando a presença de resistência nesse material, enquanto que para os demais híbridos a nota predominante entre os isolados inoculados foi a nota 5 (Figura 3).

Entre os 10 materiais utilizados no trabalho, o híbrido 2B710 se destacou dos demais pela restrição da doença (Figuras 1 e 2), podendo ter suas respostas de defesa ao ataque do patógeno reguladas de maneira mais eficiente, visto que no trabalho de Wargas et al. (2012) os autores sugerem que a fase necrotrófica é a resposta do fungo às defesas da planta para minimizar o efeito dos compostos de defesa sobre o micélio fúngico. As plantas de milho produziram nas suas células vesículas oxidativas contra a infecção, mas o efeito dessas estruturas deve ser mais bem elucidado em trabalhos futuros.

A diferenciação da hifa primária para a secundária permite ao patógeno matar as células vegetais evitando o contato direto com as defesas dos tecidos vivos, sendo explicadas pela alta suscetibilidade da hifa primária as defesas da planta de *C. graminicola*.

O uso das regiões ITS para a distinção de espécies de *Colletotrichum* foi feito por Sherriff et al. (1995), que através do sequenciamento da região ITS provou serem espécies distintas *C. graminicola* e *C. sublineolum*, sendo *C. graminicola* o agente causal da antracnose do milho e *C. sublineolum* o do sorgo. O dendrograma feito a partir das regiões ITS de 22 isolados agrupou junto com a espécie tipo de *C. graminicola* todos os isolados provenientes de milho, formando o grupo 1 (G1), com exceção do isolado M7009 que se agrupou com *C. capsici* e *C. truncatum*, gerando o grupo 2 (G2). Os dois isolados de *C. sublineolum*, colocados como grupo externo, se agruparam com o isolado tipo gerando o grupo 3 (G3).

Venard & Vainllancourt (2007) confirmaram que isolados de *C. sublineolum* eram capazes de colonizar colmos de milho, mas incapazes de infectar outros tecidos da planta como folhas e raízes, sendo ainda menos agressivos no colmo do que os isolados de *C. graminicola*, fato que gerou desconfiança dos isolados pertencentes ao padrão 3 poderem ser da espécie *C. sublineolum*, mas que foi sanado com a resposta obtida no dendrograma, confirmando a identidade dos isolados.

Considerando que as análises de Bootstrap passam a ser confiáveis a partir de 95% (Buso, 2005) podemos considerar confiável a árvore obtida no trabalho. Entre os 165 isolados utilizados no trabalho, encontramos certa variabilidade na severidade dentro dos híbridos (Figura 3), considerando que Vargas et al. (2012) encontrou alguns genes que codificavam proteínas, dentre elas: GLRG\_08002 e GLRG\_06140, exclusivas de *C. graminicola*, sem a presença de homólogos nos bancos de dados disponíveis, possibilitando no futuro a comparação entre e dentro dos padrões obtidos dos isolados.

### **Conclusões**

1. Existem três padrões de *C. graminicola* na fase de colmo da antracnose, mas ainda não temos evidências suficientes para afirmar serem patótipos distintos.
2. O híbrido 2B710 possui resistência quantitativa a antracnose de colmo.
3. O uso apenas das regiões ITS permitiu a confirmação das espécies dos isolados utilizados no trabalho.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Teológico – CNPq, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e a Embrapa Milho e Sorgo.

### Literatura Citada

ALTSCHUL S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, n.25, p.3389–3402, 1997.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease** , St. Paul, v.83, p.596-608, 1999.

BRASIL, E. M.; CARVALHO, Y. Comportamento de híbridos de milho em relação à *Phaeosphaeria maydis* em diferentes épocas de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.12, p.1977-1981, 1998.

BROGLIE, K. E.; BUTLER, K. H.; BUTRUILLE, M. G.; DA SILVA CONCEICAO, A.; FREY, T. J.; HAWK, J. A.; JAQUETH, J. S.; JONES, E. S.; MULTANI, D. S.; WOLTERS, P. J. C. C. Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. United States Patent Application 20090035765A1, 2009.

BUSO, C. S. C. Marcadores Moleculares e Análise Filogenética. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Agosto, 2005. Documentos 137.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. da S.; PINTO, N. F. J. de A. Doenças na cultura do milho. In: CRUZ, J.C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M.A.R.; MAGALHÃES. A cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 216-256.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A,da S.; PINTO, N.F.J.de A. Doenças na cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Dezembro, 2006. Circular técnica 83.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; ZAMBOLIM, L.; & FERREIRA, A. S. A antracnose do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.345-354, 2003.

Christensen, J. J.; Wilcoxson, R. D. **Stalk rot of corn**. Saint Paul: The American Phytopathological Society.1966.

COSTA, R. V.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Dezembro, 2008. Circular Técnica 100.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; LANZA F. E. Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG,: 2009. Circular técnica 120.

FERREIRA, D.F. Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3 (Build 75). Lavras: DEX/UFLA, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HYDE, K. D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147-182, 2009.

NICOLI, A.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; LANZA, F. E.; RAMOS, T. C. A. A.; MARCONDES, M. M.; MOURA, L. O.; CARLA LIMA CORRÊA, C. L. Reação de plantas de milho inoculadas nas folhas e no colmo com diferentes isolados de *Colletotrichum graminicola*. In: XXIX Congresso Nacional de

Milho e Sorgo, Aguas de Lindoia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom, 2012.

PARREIRA, D. F.; ZAMBOLIM, L.; COTA, L. V.; COSTA, R. V.; SILVA, D.D. DA.; MARCONDES, M. M.; LANZA, F. E.; NEVES, W. S. Evaluation of methodologies to inoculate maize stalks with *Colletotrichum graminicola*. *Plant Pathology*. submetido 2012.

PINTO, N. F. J. de A.; SANTOS, M. A. dos.; WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte: EPAMIG, v.27, n.233, p.82-94, 2006.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Population Biology**, v.81, p.8014-8018, 1984.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; BAILEY, J.A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, v.99, p.475-478, 1995.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.512-526, 1993.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28(10), p.2731–2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitive of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TOMAZELA, A. L.; FAVARIN, J. L.; FANCELLI, A. L.; MARTIN, T. N.; DOURADO NETO, D.; REIS, A. R. dos. Doses de nitrogênio e fontes de Cu e Mn suplementar sobre a severidade da ferrugem e atributos morfológicos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.5, n.2, p.192-201, 2006.

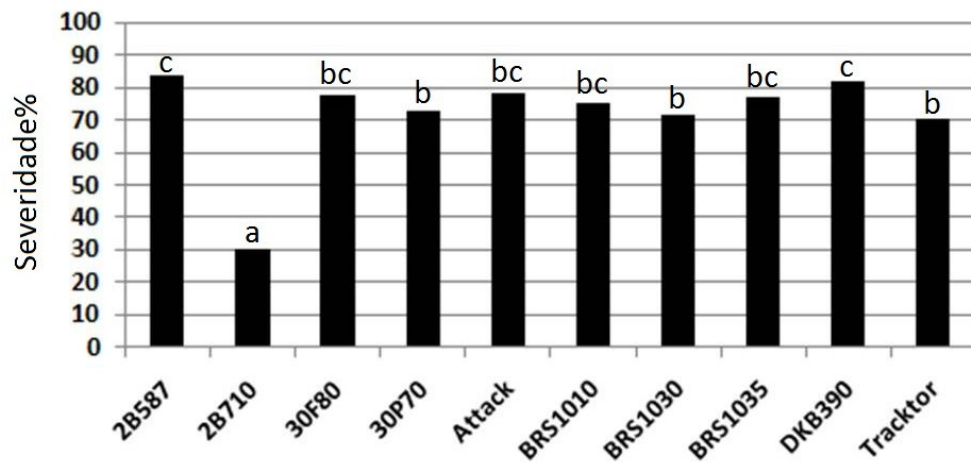
VENARD, C.; VAILLANCOURT, L. Penetration and colonization of unwounded maize tissues by the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* and the related nonpathogen *C. sublineolum*. **Mycologia**, v.99, p.368-377, 2007.

WARGAS, W. A.; MARTÍN, J. M. S.; RECH, G. E.; RIVERA, L. P.; BENITO, E. P.; DÍAS-MÍNGUEZ, J. M.; THON, M. R.; SUKNO, S. A. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. **Plant Physiology**, v.158, p.1342-1358, 2012.

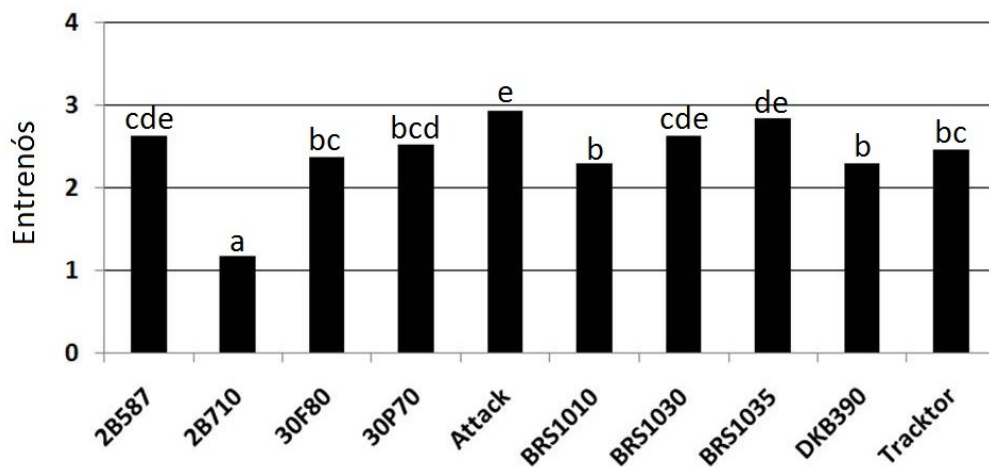
**Tabela 01:** Distribuição dos 165 isolados nos três diferentes padrões.

Padrão de Virulência	No. de isolados	Frequência (%)	Série Diferencial									
			2B587	2B710	30F80	30P70	ATTACK	BRS 1010	BRS 1030	BRS 1035	DKB390	TRACKTOR
1	101	61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	56	34	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	8	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

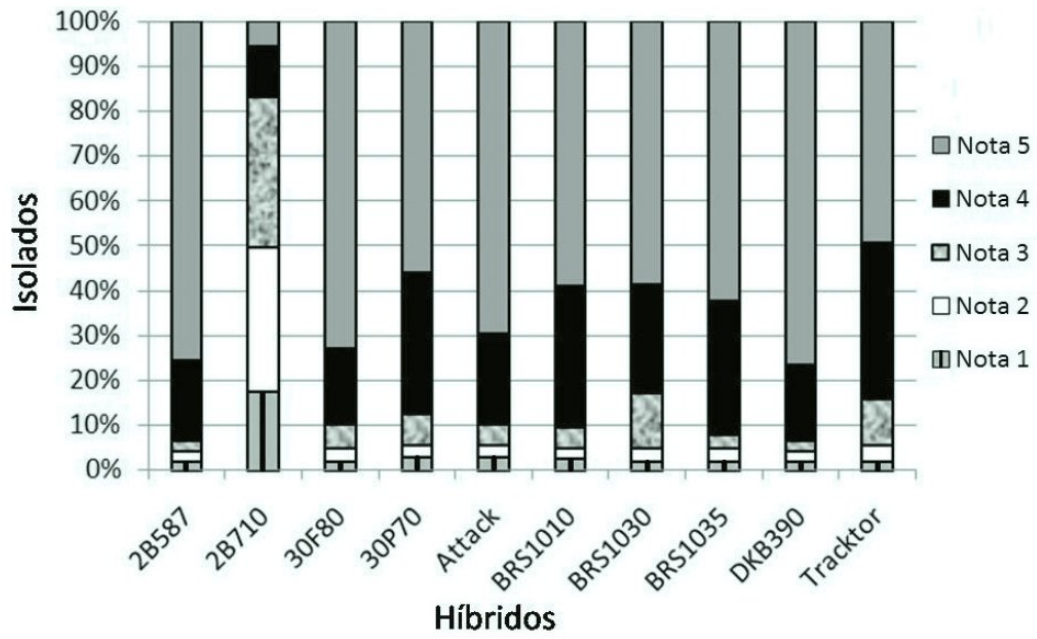
(+) severidade  $\geq$  25%; (-) severidade < 25%.



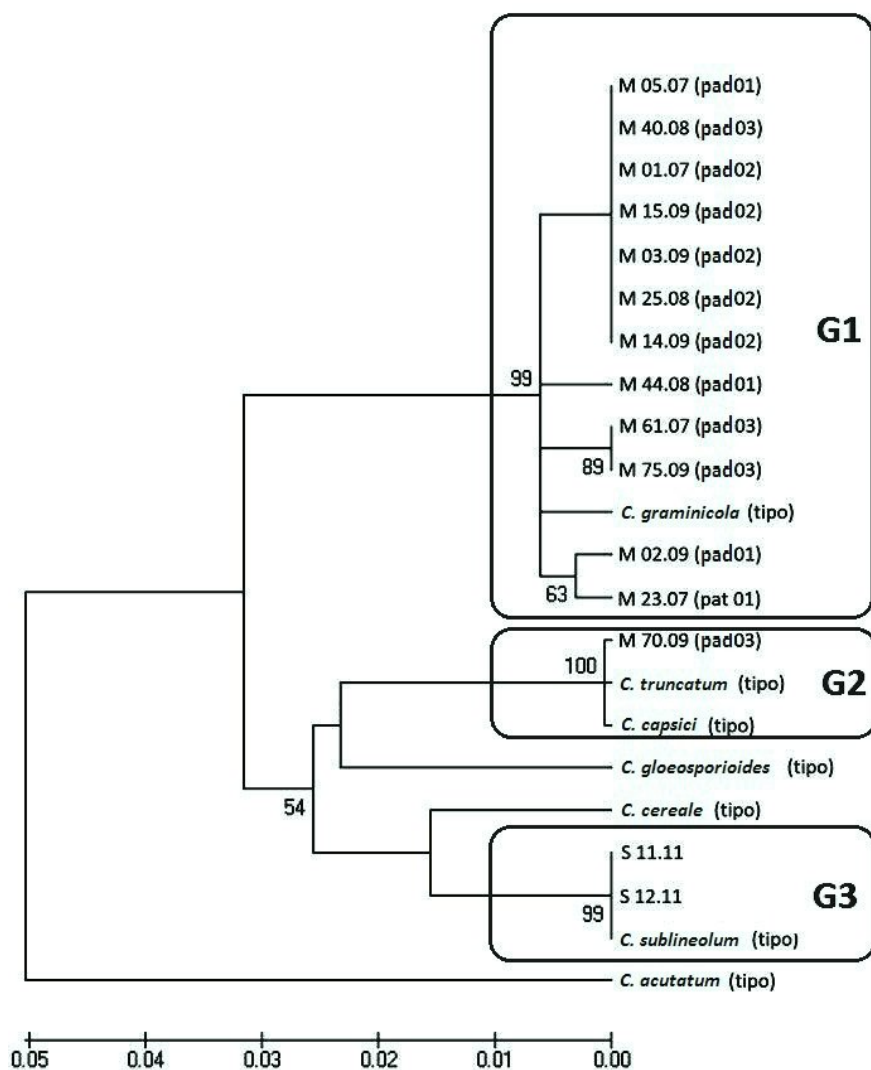
**Figura 01** Severidade nos diferentes híbridos, levando em conta os 165 isolados. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si significativamente pelo método de Tukey a 0,1 % de probabilidade.



**Figura 2** Número de entrenós infectados nos diferentes híbridos, levando em conta os 165 isolados. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem entre si significativamente pelo método Tukey a 0,1 % de probabilidade.



**Figura 3** Distribuição dos isolados baseado na escala de notas dentro de cada híbrido



**Figura 4** Dendrograma gerado pelo método de Máxima Verossimilhança das 22 seqüências ITS, baseado no modelo de Tamura-Nei. Os isolados que começam com M são provenientes de milho os com S de sorgo, entre parênteses estão as identificações sobre a qual padrão de virulência o isolado pertence ou se ele é um isolado tipo. Somente valores de Bootstraps >50 foram colocados nas ramificações e os três grupos destacados na figura G1, G2 e G3 tiveram valores de Bootstraps superiores a 95%.

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Colletotrichum graminicola* ESTIMADA POR MARCADORES ISSR

Douglas F. Parreira<sup>1</sup>, Laércio Zambolim<sup>1</sup>, Eliane A. Gomes<sup>2</sup>, Rodrigo V. Costa<sup>2</sup>,  
Dagma D. Silva<sup>2</sup>, Luciano V. Cota<sup>2</sup>, Ubiraci G. P. Lana<sup>2</sup> e Wania dos Santos Neves<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG. E-mail:  
[douglas2002ufv@yahoo.com.br](mailto:douglas2002ufv@yahoo.com.br), [zambolim@ufv.br](mailto:zambolim@ufv.br).

<sup>2</sup>Embrapa Milho e Sorgo, C.P.151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG. E-mail:  
[eliane@cnpms.embrapa.br](mailto:eliane@cnpms.embrapa.br), [veras@cnpms.embrapa.br](mailto:veras@cnpms.embrapa.br), [dagma@cnpms.embrapa.br](mailto:dagma@cnpms.embrapa.br),  
[lvkota@cnpms.embrapa.br](mailto:lvkota@cnpms.embrapa.br), [ubiraci@cnpms.embrapa.br](mailto:ubiraci@cnpms.embrapa.br).

<sup>3</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional EPAMIG Centro-Oeste.  
Prudente de Morais, MG. E-mail: [wanianeves@epamig.br](mailto:wanianeves@epamig.br).

**Resumo** - A antracnose do milho causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* é uma das principais doenças da cultura no Brasil e no mundo, atacando praticamente todas as partes da planta. Neste trabalho foi avaliada a variabilidade genética de 95 isolados monospóricos de *C. graminicola*, provenientes dos estados de Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. Foram utilizados 9 primers ISSR. Os fragmentos de DNA gerados pelas análises de ISSR foram avaliados mediante inspeção visual dos géis. Bandas de mesmo peso molecular, em indivíduos diferentes, foram consideradas idênticas e designadas em função da ausência (0) e presença (1). Baseado na matriz, foi gerado um dendrograma pelo método UPGMA, utilizando as 66 bandas amplificadas pelos nove primers ISSR. Ao analisar o dendrograma foi traçada uma linha divisória no valor da distância de dissimilaridade de 0,3, dividindo os isolados em sete grupos. Baseado nos resultados foi possível concluir que a variabilidade genética entre os isolados de *C. graminicola* é alta, sendo os marcadores ISSR eficazes na determinação de sua variabilidade. Os isolados utilizados no presente trabalho não apresentam estruturação geográfica.

**Palavras-chave:** antracnose, milho, UPGMA.

## GENETIC DIVERSITY ESTIMATED THROUGH ISSR MARKERS OF *Colletotrichum graminicola*

**Abstract** - The anthracnose of corn caused by *Colletotrichum graminicola* fungus is one of main disease in the world including Brazil, infecting any part of the plant. This study evaluated the genetic's variability of 95 monosporic isolate of *C. graminicola* from Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo, Paraná and Rio Grande do Sul, Brazilian states. Nine primers ISSR were studied by their DNA fragments through gels visual inspections, considering absence (0) or presence (1) for bands with the same molecular weight in different individuals making a matrix. Based on the matrix obtained a dendrogram was generated by the UPGMA method with all 66 bands amplified from these same nine

ISSR primers, separating seven isolated groups by a dissimilarity distance of 0,3. Based on the results it was concluded that genetic variability among isolates of *C. graminicola* is high, and the ISSR were effective in variability determination. The isolates used in this study do not show geographic structure.

**Key words:** anthracnose, corn, UPGMA.

Em milho, a antracnose causada por *C. graminicola*, destaca-se como uma das principais doenças da cultura (Bergstron & Nicholson, 1999; Costa et al., 2008), sendo o patógeno capaz de infectar praticamente toda a planta. Na fase foliar, a doença caracteriza-se pela presença de lesões de formas variadas e necróticas, podendo ocorrer extensa queima das folhas, o que reduz a área fotossintética. A fase de colmo é caracterizada pela formação, na casca, de lesões estreitas e elípticas, podendo coalescer e abranger todo o colmo, pela colonização e pela degradação dos tecidos interrompendo o fluxo de nutrientes e podendo favorecer o tombamento das plantas, atrapalhando a colheita e a qualidade dos grãos. Estimativas dos efeitos da antracnose foliar e podridão de colmo na produção de grãos de milho variam de 0 a 40% de redução na produtividade dependendo da cultivar, das condições ambientais, da época de ocorrência das epidemias e da ocorrência de outras pragas (Cota et al., 2009; Perkins & Hooker, 1979).

A principal medida de manejo da antracnose do milho é o uso de cultivares resistentes. No entanto, para o sucesso do uso da resistência genética, é importante o conhecimento da diversidade genética da população do patógeno considerando-se os fatores que atuam sobre a evolução como o risco de mutação, deriva genética e tamanho da população, dentre outros (McDonald & Linde, 2002).

O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética encontra-se bem difundido, existindo uma grande demanda quanto aos marcadores baseados na reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) devido à simplicidade e à necessidade de pequenas quantidades de DNA da amostra. Os marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) são amplificados via PCR e não necessitam do sequenciamento da região, resultando ainda na obtenção de padrões altamente polimórficos com resultados que possuem repetibilidade (Bornet & Branchard, 2001; Nagaoka & Ogihara, 1997). Além disso, são dominantes, podendo gerar um grande número de alelos reproduzíveis e altamente polimórficos, utilizando um primer complementar a um microssatélite alvo. No estudo feito com isolados de *Corynespora cassicola* provenientes de plantios de seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Malásia, foram empregados caracteres morfológicos

e marcadores ISSR para diferenciar os isolados, concluindo que apenas caracteres morfológicos não seriam suficientes no processo de diferenciação, no entanto, o agrupamento foi capaz de separar alguns isolados pertencentes a mesma raça (Nghia et al., 2008).

Considerando a inexistência de informações na literatura sobre o uso de marcadores ISSR para o fungo *C. graminicola* e o potencial do marcador para estudo da diversidade do patógeno, o objetivo neste trabalho foi estimar a diversidade genética de populações de *C. graminicola* com marcadores moleculares ISSR e avaliar o nível de variação de ISSRs entre isolados de *C. graminicola* provenientes de diferentes regiões produtoras de milho.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção dos isolados monospóricos de *C. graminicola***

Para obtenção dos isolados monospóricos de *C. graminicola*, fragmentos de colmo, folhas e nervura com sintomas típicos de antracnose amostrados nos estados de Goiás (4), Minas Gerais (45), Paraná (35), Rio Grande do Sul (3), Santa Catarina (7) e São Paulo (1), foram desinfestados superficialmente durante dois minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e transferidos para placas de Petri contendo meio de farinha de aveia-ágar-tetraciclina (FAAT) (aveia: 60 g.L<sup>-1</sup>, ágar: 20 g.L<sup>-1</sup>, tetraciclina: 300 mg.L<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas em condição de luz fluorescente intermitente a  $\pm 25$  °C, durante sete a oito dias para o desenvolvimento das colônias. Após a esporulação, fragmentos da colônia foram cortados e colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água previamente esterilizada, passando por agitação para a liberação dos conídios.

A partir das suspensões originais, foram realizadas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup>, para obtenção de suspensões de esporos com a concentração de 50-100 conídios/mL. Um mililitro dessa suspensão foi transferido para placas de Petri contendo ágar-água a 2%, sendo mantidas em câmaras de crescimento sob luz fluorescente contínua a 25 °C durante 12 horas, para induzir a germinação dos conídios. Conídios germinados foram retirados individualmente do meio ágar-água, sob microscópio óptico, para verificação da ausência de outros conídios no fragmento selecionado. Os fragmentos foram então transferidos para tubos de ensaio contendo o meio FAAT e, após o desenvolvimento das

culturas, foram adicionados 10 mL de óleo mineral estéril para a preservação do isolado.

#### **Obtenção de massa micelial de *C. graminicola***

Para a obtenção de massa micelial de *C. graminicola*, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio FAAT e mantidos a 25 °C por 7 dias. Fragmentos de micélio foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido YES (10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 6 g.L<sup>-1</sup> de caseína) previamente esterilizado, adicionado de 1mL dos antibióticos estreptomicina e tetraciclina (0,3 g.L<sup>-1</sup>). Os frascos foram mantidos em agitador a 90 rpm, a 28 °C, por 72 h. A massa micelial foi filtrada em duas camadas de gazes sendo prensada em papel de filtro para a retirada do excesso de meio, ambos esterilizados. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C, envoltas por papel alumínio até o momento da extração do DNA.

#### **Extração de DNA genômico**

Utilizou-se a metodologia de extração de DNA descrita por Saghai-Marroof et al., (1984), modificada. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e adicionados 350 µL de tampão CTAB [2 % (m/v) CTAB; 0,2 M Tris- HCl (pH 7,5); 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol]. A mistura foi mantida em banho-maria a 65 °C durante uma hora. Após resfriamento por 5 minutos em condição ambiente, promoveu-se a lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1 v/v), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, onde foram adicionados 300 µL de isopropanol mantido a -20 °C por, no mínimo, uma hora. Os microtubos foram levados à centrífuga e o material contido neles centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, lavado com 140 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente levados à centrífuga por 10 minutos a uma rotação de 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual, seco em estufa a 65 °C, por cinco minutos. Os DNAs precipitados foram ressuspensos em 50 µL de tampão TE contendo de RNase A (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg.µL<sup>-1</sup> RNase A). A concentração das amostras foi quantificada em espectrofotômetro

Nanodrop e ajustada para  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , diluindo-se o DNA estoque em água ultrapura. O DNA foi armazenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da amplificação.

### **Amplificação do DNA**

Foram utilizados nove primers : AAC, GACA, ACA, GT, ACTG, CTCGC, GAGG, GAAT e AAG. As reações de amplificação por PCR foram iguais para os nove primers selecionados, sendo preparado um volume final de  $20 \mu\text{L}$ , consistindo de  $3 \mu\text{L}$  de DNA ( $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ );  $20 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 8,4);  $50 \text{ mM}$  KCl;  $2 \text{ mM}$  MgCl<sub>2</sub>;  $1 \text{ U}$  Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA),  $0,125 \text{ mM}$  dNTPs e  $0,5 \mu\text{M}$  de cada primer. Os ciclos de amplificação foram:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 min,  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 min,  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 min,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por dois min. Sendo este último ciclo repetido 35 vezes, seguido por um ciclo de  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min, mantendo as reações a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  até a retirada da amostra. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems - PCR System 9700. Às reações foram adicionados  $4 \mu\text{L}$  de corante, sendo essas submetidas à eletroforese em gel de agarose a  $1,5\%$  (m/v) a  $100 \text{ V}$  durante uma hora e trinta minutos em tampão TAE ( $40 \text{ mM}$  Tris-acetato;  $1 \text{ mM}$  EDTA, pH 8,0). Em seguida, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) por 20 min, descorado em água por 5 min, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Kodak - Gel logic 200.

### **Análise dos dados**

Os fragmentos de DNA gerados pelas análises de ISSR foram avaliados mediante inspeção visual dos géis. Bandas de mesmo peso molecular, em indivíduos diferentes, foram consideradas idênticas e designadas em função da ausência (0) e presença (1) no gel. Os dados foram analisados empregando o método UPGMA, utilizando três coeficientes: Dice, Jaccard e Pearson. A matriz de dissimilaridade e o coeficiente de correlação cofenética foram feitos através do site <http://genomes.urv.es/UPGMA/> ( Garcia-Vallve et al., 1999), tendo sido utilizada a matriz para a confecção do dendrograma no programa Statistica 7.

## **Resultados e Discussão**

Neste trabalho foi obtida uma coleção de 95 isolados monospóricos de *C. graminicola*, devidamente identificados (Tabela 1). Os nove primers ISSR amplificaram de forma consistente o DNA dos 95 isolados, produzindo um total de 66 bandas polimórficas, com média de 49 bandas amplificadas por isolado. O primer que obteve o maior número de bandas amplificadas foi o primer GT com 15 bandas e o primer com menor número foi GACA com três bandas, sendo a média de 7,33 bandas por primer.

As matrizes geradas pelos coeficientes Dicer, Jaccard e Pearson obtiveram os coeficientes de correlação cofenética: 0.18, 0.80 e 0.08 respectivamente. O coeficiente de correlação cofenética estima o quanto o dendrograma está adequado às interações entre os acessos, o valor 1 significa que a relação entre os dados e o dendrograma é perfeita (May, 1999). Romensburg (1984) considerou em seu trabalho que valores maiores ou iguais a 0,8 são satisfatórios e Vaz Patto et al., (2004) aborda que valores acima de 0,56 representam um bom alinhamento entre as matrizes de dissimilaridade e agrupamento, de maneira que a matriz escolhida foi a feita com Jaccard.

Ao analisar o dendrograma, foi considerada a linha divisória no valor da distância genética de 0,3 dividindo os isolados em sete grupos. Entre os 95 isolados seis não agruparam com nenhum outro isolado (Figura 01). Baseado nos agrupamentos obtidos com o dendrograma não foi encontrada estruturação geográfica entre os isolados, tendo o mesmo ocorrido em relação a parte da planta utilizada no isolamento de *C. graminicola*: colmo (C), folha (F) e nervura (N)., Alguns isolados mais antigos não possuíam esta informação, sendo então denominados indeterminados (?) (Tabela 1). O primeiro grupo agregou 75 isolados pertencentes aos estados de GO, MG, PR, RS, SC e SP, o segundo grupo quatro isolados do PR, o terceiro grupo dois isolados de SC e PR, o quarto grupo dois isolados, um de MG e outro do PR, os demais grupos (5, 6 e sete) dois isolados do PR. Os isolados com maior similaridade foram os isolados 44-07 e 46-07 com distância genética de 0,019, sendo os dois isolados da cidade de Passo Fundo (RS).

Um dos primeiros trabalhos feitos com diversidade de *C. graminicola* foi realizado por Forgey et al. (1978), utilizando dez isolados e dez progênies de milho que, baseado nos resultados do teste de inoculação cruzada, onde cada um dos isolados foi inoculado nas dez progênies de milho, propuseram a ocorrência de oito raças fisiológicas. Posteriormente Nicholson & Warren (1981), utilizando sete dos dez isolados empregados no trabalho de Forgey et al. (1978) contestaram a presença de raças, atribuindo a diferença quanto a sintomatologia ao fato dos autores não terem

padronizado os inóculos no experimento. Segundo Bergstrom & Nicholsson (1999), existe uma grande variabilidade quanto à agressividade da antracnose em folhas e colmo de milho. Outra maneira de verificar a variabilidade de um organismo pode ser obtida com o uso de marcadores moleculares, diferenciando os indivíduos baseado no seu material genético. Um trabalho, utilizando marcadores ISSR, em *C. gloeosporioides*, *C. capsici* e mais três genótipos de pimenta, obteve boa correlação dos isolados quanto a sua origem geográfica, propondo assim o uso de marcadores ISSR no estudo da diversidade genética em *Colletotrichum* spp, afirmando ainda que tais técnicas ajudam no estudo da dinâmica populacional do patógeno, permitindo estratégias de controle com uma melhor eficiência (Ratanacherdchai et al., 2010).

Neste trabalho foi observado que há variabilidade entre os isolados estudados corroborando com as inferências sobre a variabilidade de *C. graminicola* proposta por Bergstrom & Nicholson (1999). A variabilidade genética é uma condição presente em patossistemas silvestres preservados e é aumentada em agroecossistemas. A alteração dos cultivos por meio do melhoramento, a ampliação de fronteiras agrícolas e o uso desmedido de defensivos sistêmicos são fatores que aumentam a força da seleção exercida sobre as populações de patógenos. Todos estes fatores favorecem novos genes de virulência e o polimorfismo na estrutura dessas populações (Araya, 2003). Em 2008, um gene que codifica para uma proteína de resistência a antracnose do colmo foi clonado (Broglie et al., 2008). O simples uso desse gene nos híbridos comerciais pode exercer uma pressão direcional sobre a população do patógeno, rumo ao surgimento de novos patótipos (Casela & Guimarães, 2005; Vanderplank, 1968).

### **Conclusões**

1 A variabilidade genética entre os isolados de *C. graminicola* é alta e os isolados se encontram uniforme.

2 Marcadores ISSR são eficientes na determinação da variabilidade de *C. graminicola*.

3 Os isolados de *C. graminicola* utilizados no presente trabalho não apresentam estruturação geográfica no Brasil, nem em relação a parte da planta infectada.

### **Literatura Citada**

- ARAYA, C. M. Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 221-228, 2003.
- Bergstrom, G. C.; Nicholson, R. L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v.83, p. 596-608, 1999.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209-215, 2001.
- BROGLIE, K. E.; BUTLER, K. H.; BUTRUILLE, M. G.; DA SILVA CONCEICAO, A.; FREY, T. J.; HAWK, J. A.; JAQUETH, J. S.; JONES, E. S.; MULTANI, D. S.; WOLTERS, P. J. C. C. Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. **United States Patent Application** 20080022426, 2008.
- CASELA, C. R.; GUIMARÃES, F. B. Rotação de genes no manejo da resistência a doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 13, p. 321-349, 2005.
- COSTA, R. V.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 100).
- COTA, L.V.. COSTA, R.V.; CASELA, C.R.; LANZA F.E. **Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 5 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 120).
- FORGEY, W. M.; BLANCO, M. H.; LOEGERING, W. Q. Differences in pathological capabilities and host specificity of *Colletotrichum graminicola* on *Zea mays*. **Plant Disease Reporter**, v.62, p. 573-576, 1978.
- GARCIA-VALLVE, S.; PALAU, J.; ROMEU, A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from códon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 1125-1134, 1999.<http://genomes.urv.es/UPGMA/>
- MAY, A. C. W. Towards more meaningful hierarchical classification of amino acid scoring matrices. **Protein Engineering**, v.12, p. 707-712, 1999.
- McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p. 2002. 40:349-79, 2002.
- NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 597-602, 1997.
- NGHIA, N. A.; KADIR, J.; SUNDERASAN, E.; ABDULLAH, M. P.; MALIK, A.; NAPIS, S. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers

Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. **Mycopathologia**, v. 166, p. 189-201, 2008.

NICHOLSON, R. L.; WARREN, H. L. The issue of races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to corn. **Plant Diseases**, v.65, p. 143-145, 1981.

PERKINS, J. M.; HOOKER, A. L. The effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. **Plant Diseases Reporter**, 63:26-30. 1979.

RATANACHERDCHAI, K.; WANG, H-K.; LIN, F-C.; KASEM SOYTONG, K. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 076-083, 2010.

ROMESBURG, H. C. **Cluster Analysis for Researchers**. Belmont, CA: Lifetime Learning Publishers. 1984.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Population Biology**, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

VAN DER PLANK, J.E. **Disease resistance in plant**. New York: Academic Press, 1968. 206p.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v. 137, p. 63-72, 2004.

Tabela 1. Relação dos isolados utilizados no trabalho seguindo a ordem presente no dendrograma pelo método UPGA (eixo y) de cima para baixo, com descrição do número do isolado, parte da planta utilizada para o isolamento (folha-F, colmo-C, nervura-N e indeterminado-?), local de coleta (estado e cidade) e em qual grupo o isolado foi classificado (baseado no agrupamento UPGA utilizando o coeficiente de Jaccard).

UPGMA	Estado	Cidade	numero	ano	Parte	Grupo	UPGMA	Estado	Cidade	numero	ano	Parte	Grupo	UPGMA	Estado	Cidade	numero	ano	Parte	Grupo
1	GO	Cristalina	1	4	?	1	33	MG	Sete Lagoas	67	7	C	1	65	MG	Sete Lagoas	61	7	C	1
2	PR	Campo Mourão	21	9	F	1	34	PR	Londrina	1	6	?	1	66	SC	Xapacó	92	7	C	1
3	MG	Sete Lagoas	41	8	F	1	35	MG	Sete Lagoas	20	7	?	1	67	MG	Sete Lagoas	72	7	C	1
4	PR	Campo Mourão	28	9	F	1	36	MG	Sete Lagoas	1	8	C	1	68	MG	Sete Lagoas	80	7	C	1
5	MG	Sete Lagoas	10	8	F	1	37	PR	Londrina	15	4	?	1	69	MG	Sete Lagoas	79	7	C	1
6	PR	Londrina	8	9	F	1	38	PR	Londrina	16	4	?	1	70	MG	Iraí	107	7	C	1
7	PR	Londrina	9	9	F	1	39	MG	Sete Lagoas	11	7	C	1	71	MG	São Sebastião do Paraíso	74	9	N	1
8	PR	Campo Mourão	25	9	F	1	40	MG	Uberlândia	21	7	N	1	72	PR	Ponta Grossa	56	9	F	1
9	PR	Campo Mourão	27	9	F	1	41	PR	Campo Mourão	33	7	?	1	73	MG	Indiápolis	102	9	N	1
10	MG	Sete Lagoas	26	8	F	1	42	MG	Uberlândia	5	6	?	1	74	MG	Sete Lagoas	36	8	F	1
11	MG	Sete Lagoas	45	8	F	1	43	MG	Uba	6	7	F	1	75	MG	Sete Lagoas	46	8	F	1
12	MG	Sete Lagoas	42	8	F	1	44	MG	Sete Lagoas	87	7	C	1	76	PR	Londrina	17	4	?	2
13	MG	Sete Lagoas	44	8	F	1	45	PR	Campo Mourão	18	4	?	1	77	PR	Ponta Grossa	58	9	F	2
14	PR	Londrina	7	9	F	1	46	SP	Colombia	36	4	?	1	78	PR	Londrina	21	5	?	2
15	PR	Londrina	11	9	F	1	47	MG	São Sebastião do Paraíso	73	9	N	1	79	PR	Cascavel	46	9	F	2
16	PR	Campo Mourão	15	9	F	1	48	MG	Sete Lagoas	65	7	C	1	80	SC	Xanxerê	7	4	?	3
17	PR	Campo Mourão	19	9	F	1	49	PR	Campo Mourão	16	9	F	1	81	PR	Campo Mourão	18	5	?	3
18	PR	Campo Mourão	26	9	F	1	50	MG	Sete Lagoas	22	8	F	1	82	PR	Campo Mourão	24	9	F	4
19	PR	Campo Mourão	22	9	F	1	51	MG	Sete Lagoas	49	8	F	1	83	MG	São Sebastião do Paraíso	72	9	N	4
20	PR	Campo Mourão	12	9	F	1	52	GO	Goianésia	60	7	?	1	84	PR	Ponta Grossa	59	9	F	?
21	SC	Xanxerê	14	4	?	1	53	MG	Sete Lagoas	64	7	C	1	85	PR	Campo Mourão	44	9	F	5
22	MG	Sete Lagoas	84	7	C	1	54	MG	Sete Lagoas	21	8	F	1	86	PR	Cascavel	51	9	C	5
23	MG	Sete Lagoas	88	7	C	1	55	MG	Sete Lagoas	19	8	F	1	87	MG	Sete Lagoas	74	7	C	?
24	MG	Sete Lagoas	85	7	C	1	56	MG	Sete Lagoas	47	8	F	1	88	SC	Xapacó	93	7	C	?
25	MG	Uba	1	7	N	1	57	MG	Sete Lagoas	48	8	F	1	89	PR	Campo Mourão	32	9	F	6
26	MG	Sete Lagoas	68	7	C	1	58	SC	Xapacó	96	7	F	1	90	PR	Campo Mourão	33	9	F	6
27	GO	Goianésia	54	7	?	1	59	MG	Sete Lagoas	38	8	F	1	91	MG	Sete Lagoas	8	8	F	?
28	PR	Campo Mourão	16	5	?	1	60	MG	Sete Lagoas	3	9	F	1	92	PR	Londrina	10	9	F	7
29	RS	Passo Fundo	41	7	?	1	61	MG	Sete Lagoas	50	8	F	1	93	PR	Campo Mourão	17	9	F	7
30	RS	Passo Fundo	44	7	?	1	62	SC	Xanxerê	9	4	?	1	94	MG	Uba	2	7	F	?
31	RS	Passo Fundo	46	7	?	1	63	MG	Sete Lagoas	86	7	C	1	95	GO	Cristalina	3	7	F	1
32	SC	Xapacó	91	7	C	1	64	PR	Campo Mourão	31	9	F	1							

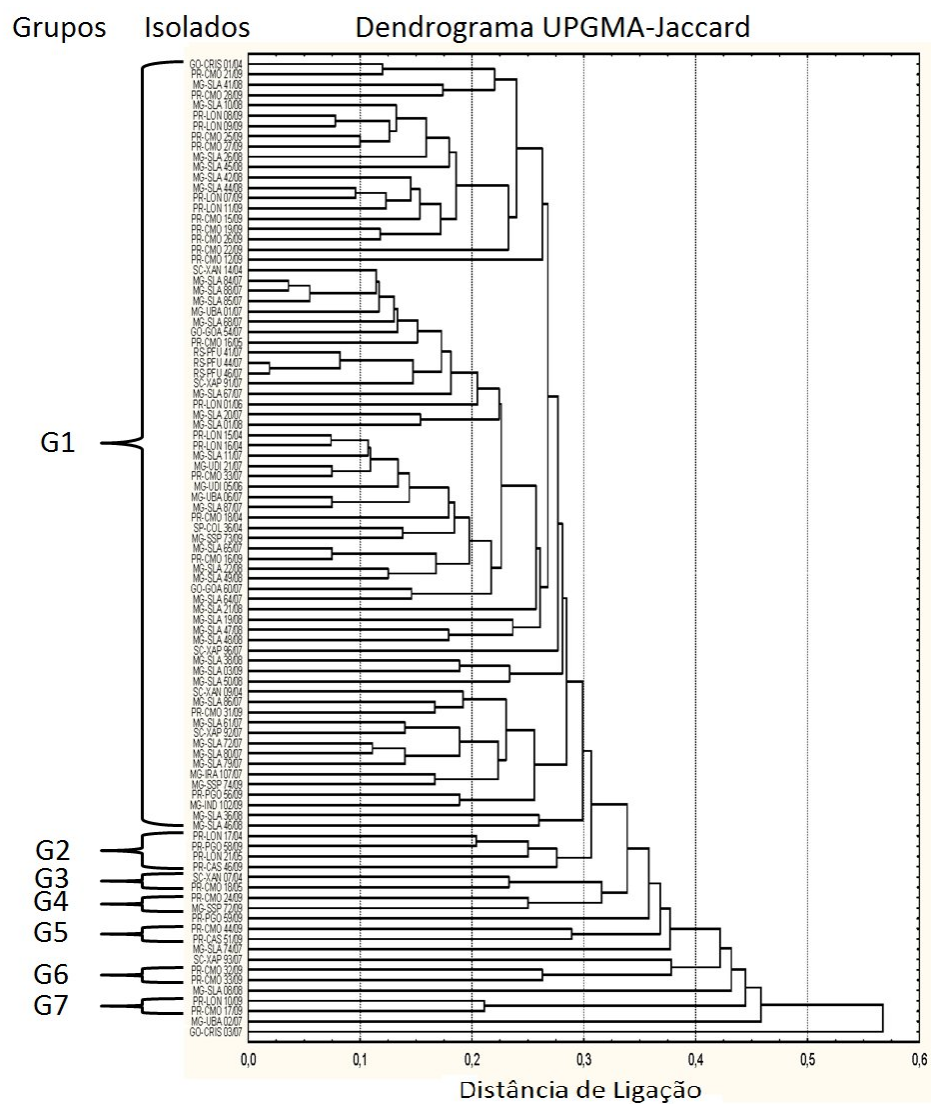


Figura 1. Dendrograma gerado pelo método UPGMA, utilizando 66 bandas amplificadas pelos nove primers ISSR, detectadas em 95 isolados de *Colletotrichum graminicola*, coletados em regiões produtoras no Brasil.

## CONCLUSÃO GERAL

A metodologia desenvolvida para inoculação em colmo TICS (palitos imersos em suspensão de esporos) inoculando na fase de pendoamento (VT) e avaliando 30 dias após a inoculação apresentou uma boa eficiência podendo ser empregada nos programas de melhoramento a doenças, podendo ser utilizadas também para outros patógenos de colmo do milho.

Os isolados de *Colletotrichum graminicola* apresentam uma alta variabilidade, que foi comprovada com o uso dos marcadores ISSR em 95 isolados monospóricos, mas essa variabilidade não esta relacionada com a parte da planta de onde o isolado foi retirado nem com a região geográfica onde foi feita a coleta. Outra resposta de variabilidade foi obtida com a inoculação da série diferencial composta por 10 híbridos, e o seqüenciamento de parte dos isolados permitiu a confirmação da espécie. Os padrões encontrados podem ser utilizados na avaliação de germoplasmas de milho para direcionar os programas de melhoramento para doenças e parte da série pode ser empregada para o estudo de novos isolados, com a incorporação de novos materiais e dentre os materiais testados o híbrido 2B710 possui resistência quantitativa á antracnose na fase de colmo.