

ALESSANDRO NICOLI

**RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO COLMO EM MILHO: ESCALA DE
AVALIAÇÃO, MARCADOR MOLECULAR E CORRELAÇÃO DA
SEVERIDADE ENTRE COLMO E FOLHA**

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
2013

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

T

N644r
2013

Nicoli, Alessandro, 1985-

Resistência à antracnose do colmo em milho : escala de
avaliação, marcador molecular e correlação da severidade entre
colmo e folha / Alessandro Nicoli. – Viçosa, MG, 2013.
x, 73f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Laércio Zambolim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Doenças e pragas. 2. *Colletotrichum graminicola*
. 3. Antracnose-do-colmo. 4. Marcadores genéticos.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

II. Título.

CDD 22. ed. 633.159

ALESSANDRO NICOLI

RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO COLMO EM MILHO: ESCALA DE AVALIAÇÃO, MARCADOR MOLECULAR E CORRELAÇÃO DA SEVERIDADE ENTRE COLMO E FOLHA

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: 22 de novembro de 2013.


Lauro José Moreira Guimarães


Olinto Liparini Pereira


João Carlos Cardoso Galvão


Eveline Teixeira Chixeta


Laércio Zambolim
(Orientador)

'No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade'

(Albert Einstein)

Aos meus pais, Neuza Nicoli e Isaias Nicoli

A minha querida irmã, Sandra Nicoli

A minha namorada Renata Oliveira Batista

Aos meus familiares e amigos,

que sempre acreditaram em mim,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida e a oportunidade de conhecer pessoas importantes nessa caminhada.

À minha mãe, Neuza Nicoli, ao meu pai, Isaias Nicoli, e a minha irmã, Sandra Nicoli, que sempre estiveram ao meu lado fornecendo forças e incentivo para continuar na minha vida profissional.

A todos os familiares pelo apoio concedido, me proporcionando felicidades e auxílio para alcançar meus objetivos. Em especial, ao Amantino Nicoli e sua esposa Mércia, pela compreensão e carinho.

Ao Professor Laércio Zambolim pela amizade e orientação concedida para que o trabalho fosse desenvolvido.

Ao Departamento de Fitopatologia e a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade em realizar este curso.

À Embrapa Milho e Sorgo e aos Pesquisadores Dr. Rodrigo, Luciano, Dagma, Lauro, Cynthia e Maria Marta pelo local e apoio concedido para realização da pesquisa.

Aos funcionários Reinaldo Vasco, Dénil, Marquim, Luciano e Clóvis, que sempre estiveram disponíveis para realização das atividades relacionadas aos experimentos de campo e casa-de-vegetação.

Ao meu amigo Marcos de Oliveira Pinto, pelo grande auxílio nos trabalhos de biologia molecular.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia pela excelência em ensino fornecido durante o curso e dedicação para o nosso aprendizado.

Aos amigos de laboratório pelo convívio e amizade, Henrique, Alexandre, Ueder, Jaime, Sérgio, José Cláudio, Fabrício, Lucas, Aline, Franklin, Ubiraci.

A minha namorada Renata Oliveira Batista pelo companheirismo, apoio e carinho fornecido na minha vida.

Sendo assim, a todos que contribuíram para esse trabalho.

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

ALESSANDRO NICOLI, filho de Neuza Nicoli e Isaias Nicoli, nasceu em Resplendor, Minas Gerais, no dia 24 de janeiro de 1985.

Em fevereiro de 2000, ingressou no curso Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Colatina (EAFCOL), formando em fevereiro de 2003.

Em agosto de 2003, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), graduando-se em 14 de dezembro de 2007.

No período de 2004 a 2007, foi bolsista de iniciação científica na Faculdade de Ciências Agrárias da UNIVALE, onde desenvolveu atividades de pesquisa em doenças na cultura do quiabeiro.

Em março de 2008, iniciou no Programa de Pós-graduação, ao nível de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de *Master Scientiae* em fevereiro de 2010.

Em março de 2010, iniciou no Programa de Pós-graduação, ao nível de Doutorado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em novembro de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1.....	6
Validation of a standard area diagram set to estimate severity of anthracnose stalk rot on maize.....	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUCTION.....	8
2 MATERIAL AND METHODS	9
3 RESULT.....	12
4 DISCUSSION	13
5 ACKNOWLEDGEMENTS	14
6 REFERENCES.....	23
CAPÍTULO 2.....	27
Identificação de marcadores SNP associados com resistência a antracnose do colmo em milho	27
RESUMO	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Obtenção das progênies F2:3	31
2.2 Experimento no campo.....	31
2.3 Experimento em casa-de-vegetação	32
2.4 Extração e integridade do DNA genômico.....	33
2.5 Obtenção de marcadores SNP	34
2.6 Análises fenotípicas.....	35
2.7 Associações entre SNP e resistência a antracnose do colmo	35
3 RESULTADOS.....	36
3.1 Avaliação da antracnose do colmo em casa-de-vegetação.....	36
3.2 Identificação de SNP associados com resistência à antracnose do colmo	36
4 DISCUSSÃO.....	37
5 AGRADECIMENTOS.....	46
6 REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 3.....	56
Correlação entre antracnose do colmo e antracnose foliar em milho	56
RESUMO	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Inoculação e avaliação da antracnose foliar	61
2.2 Inoculação e avaliação da antracnose no colmo.....	61
2.3 Análise estatística.....	62
2.4 Avaliação em 2B710 e 2B707.....	62
3 RESULTADOS	63
4 DISCUSSÃO.....	64
5 AGRADECIMENTOS.....	68
6 REFERÊNCIAS	69
CONCLUSÕES GERAIS	73

RESUMO

NICOLI, Alessandro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Resistência à antracnose do colmo em milho: escala de avaliação, marcador molecular e correlação da severidade entre colmo e folha.** Orientador: Laércio Zambolim. Coorientador: Rodrigo Veras da Costa.

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas da agricultura mundial, mas sua produção é limitada por vários fatores, dentre estes, as doenças. A antracnose do colmo causada por *Colletotrichum graminicola* é uma das doenças amplamente distribuídas em cultivos de milho, causando o acamamento ou morte prematura das plantas e redução na qualidade e peso dos grãos. Estimar a intensidade dessa doença é muito importante para avaliar as diferentes medidas de controle, como a resistência genética. Com isso, foi validada uma escala diagramática, contendo ilustrações de entrenó de colmo com oito níveis de severidade. Com a escala, as avaliações realizadas por todos os avaliadores foram mais próximas para o valor real e a maioria dos desvios em erros foi concentrada no intervalo de 10%. Além disso, ao verificar a confiabilidade da estimativa da severidade da doença, 100% das comparações resultaram em $R^2 > 0,90$. A escala proposta melhorou a acurácia, precisão e reprodutibilidade das estimativas de severidade da antracnose do colmo, podendo ser recomendada para o melhoramento de plantas visando à resistência, estudos epidemiológicos, caracterização de isolados de *C. graminicola* e outros estudos envolvendo esse patossistema. Para identificar marcadores moleculares SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associados com resistência à antracnose do colmo, progênies F_{2:3} foram fenotipadas em campo, onde foram selecionadas 20 progênies resistentes e 20 suscetíveis à doença. Em casa-de-vegetação, plantas com severidade $\leq 18,8$ % (dentro de 19 progênies resistentes) e com severidade $\geq 56,3$ % (dentro de 20 progênies suscetíveis), além do híbrido, foram selecionadas para a extração de DNA e genotipagem. Análise de regressão linear foi realizada para identificar os marcadores significativamente associados com resistência à antracnose do colmo. Oito marcadores SNP com efeito genético aditivo e quatro com efeito genético de dominância foram detectados associados com resistência a antracnose do colmo. Os efeitos aditivos explicaram entre 18 e 23% da variação fenotípica e os efeitos de dominância explicaram entre 18 e 35%. Estudos futuros devem ser realizados para validação desses marcadores, verificando o potencial na utilização em seleção assistida em programas de melhoramento de milho. Objetivando comparar a reação da folha e do colmo de milho à antracnose, cinco experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação para avaliar a antracnose foliar e cinco

para antracnose do colmo. A correlação foi positiva e significativa somente para os híbridos mais suscetíveis BRS1010 e P3862, entretanto, para os híbridos mais resistentes 2B710, 2B707 e P30F35, não existiu correlação. Os resultados indicaram que os genótipos mais resistentes à antracnose não possuem correlação entre reação na folha e no colmo, evidenciando a não existência de relação nos mecanismos de resistência entre esses dois órgãos. Com isso, é recomendável verificar primeiro a reação da folha e do colmo para adoção de cultivares de milho em regiões e épocas onde essa doença ocorre. Com base nos resultados, verifica-se que estudos de herança da resistência à antracnose e sobre raças fisiológicas de *C. graminicola* devem ser conduzidos para folhas e colmo, separadamente. Além disso, verifica-se que por meio de melhoramento genético, podem ser desenvolvidos cultivares com resistência à antracnose foliar e de colmo.

ABSTRACT

NICOLI, Alessandro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2013. **Resistance to anthracnose stalk rot on maize: assessment scale, molecular marker and severity correlation between stalk and leaf.** Adviser: Laércio Zambolim. Co-adviser: Rodrigo Veras da Costa.

Maize (*Zea mays* L.) is an important crop in world agriculture, but its production is limited by several factors, including diseases. Anthracnose stalk rot caused by *Colletotrichum graminicola* is one of the widely distributed diseases in corn, causing plant lodging or premature death and reduced quality and grain weight. Estimate the intensity of this disease is very important to evaluate the different control measures, such as genetic resistance. With this, were validated a diagrammatic scale, containing illustrations of stalk internode with eight severity levels. With the scale, the assessments performed by all raters were closer to the actual value and most deviations in errors were concentrated in the range of 10%. Moreover, when checking the reliability of the estimate of disease severity, 100% of the comparisons resulted in $R^2 > 0.90$. The scale proposed improved accuracy, precision and reproducibility of the estimates of anthracnose stalk rot severity and may be recommended for plant breeding for resistance, epidemiological studies, characterization of isolates of *C. graminicola* and other studies involving this pathosystem. To identify molecular markers SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associated with resistance to anthracnose stalk rot, F_{2:3} progenies were phenotyped in the field, where were selected 20 resistant and 20 susceptible progenies to disease. At greenhouse, plants with severity $\leq 18.8\%$ (within the 19 resistant progenies) and severity $\geq 56.3\%$ (within the 20 susceptible progenies), in addition hybrid, were selected for DNA extraction and genotyping. Linear regression analysis was performed to identify markers significantly associated with resistance to anthracnose stalk rot. Eight SNP markers with additive genetic effect and four with dominance genetic effect were detected associated with resistance to anthracnose stalk rot. The additive effects explained between 18 and 23% of the phenotypic variation and the dominance effects explained between 18 and 35%. Future studies should be conducted to validate these markers, checking the potential in use marker-assisted selection in maize breeding programs. Aiming to compare the reaction of the leaf and stalk of maize to anthracnose, five experiments were conducted at greenhouse to evaluate anthracnose leaf blight and five to anthracnose stalk rot. The correlation was positive and significant only for the most susceptible hybrids BRS1010 and P3862, however, for the most resistant hybrids 2B710, 2B707 and P30F35, there were no correlation. The results indicated

that the genotypes more resistant to anthracnose have no correlation between reaction in the leaf and stalk, evidencing the lack of relationship in resistance mechanisms between these two organs. With this, it is recommended to first verify the reaction of leaf and stalk for adoption of maize cultivars in regions and seasons where the disease occurs. Based on the results, verify that studies of resistance inheritance to anthracnose and about physiological races of *C. graminicola* should be conducted to leaf and stalk separately. Furthermore, verify that per genetic breeding, cultivars with resistance to anthracnose leaf blight and anthracnose stalk rot can be developed.

INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie pertencente à família Poaceae e está entre as culturas mais importantes no cenário da produção agrícola do mundo, sendo produzido em várias áreas de cultivo no Brasil. Os produtos do milho são utilizados principalmente na alimentação humana e na formulação de rações para criação de animais como aves, suínos e bovinos. A produção mundial é de aproximadamente 875 milhões de toneladas (FAO, 2013) e o Brasil está entre os países mais produtores, sendo mais de 70 milhões de toneladas registradas na última safra (Conab, 2013). A antracnose do colmo causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. está entre as principais doenças que interferem na produtividade do milho e o aumento da frequência dessa doença se deve aos plantios sucessivos, uso de material genético suscetível e plantio direto sem a rotação de cultura (Bergstrom & Nicholson, 1999; Jirak-Esker & Peterson, 2011; Cota *et al.*, 2012).

O fungo *C. graminicola* forma acérvulos esféricos ou piriformes, de coloração castanho-escuros e com a presença de setas no tecido doente, produzindo conídios falciformes, ovais, asseptados e hialinos. Este patógeno infecta as plantas em qualquer fase de desenvolvimento, no entanto, os sintomas são mais visíveis após o florescimento. A infecção do colmo inicia pelos conídios provenientes das lesões foliares ou daqueles presentes em restos culturais. Na casca do colmo, surgem lesões estreitas e longitudinais, com aspecto encharcado, tornando-se marrom-escuras a negras. No tecido interno, é observado uma coloração marrom-escura, que entra em processo de desintegração. Além desses sintomas, pode ocorrer a seca do ponteiro na planta, conhecido como “top dieback”. O desenvolvimento da antracnose é favorecido por longos períodos com alta umidade, favorecendo a esporulação do patógeno (Bergstrom & Nicholson, 1999).

Para estimar a intensidade da antracnose do colmo, normalmente são utilizadas escalas com notas, as quais apresentam maiores intervalos de severidade da doença (Christensen & Wilcoxson, 1966; Anderson & White, 1994; Todd & Kommedahl, 1994), podendo dificultar a acurácia em relação ao valor real e afetar na diferença significativa entre os tratamentos na análise estatística. Portanto, a acurácia, precisão e reprodutibilidade da avaliação de uma doença é melhorada com a validação primeiro de uma escala diagramática (Capucho *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2013).

O manejo da antracnose pode ser realizado por meio da incorporação de resíduos no solo, adubação nutricional equilibrada, densidade populacional adequada e rotação de culturas. No entanto, o uso de genótipos com resistência genética é a melhor medida de controle e trabalhos foram realizados para a obtenção de materiais resistentes, além de estudos como a herança da resistência e identificação de marcadores moleculares (Badu-Apraku *et al.*, 1987; Jung *et al.*, 1994; Palaversic *et al.*, 2009; Matiello *et al.*, 2012).

A utilização de marcadores moleculares pode ser uma ferramenta importante em programa de melhoramento, quando se tem marcadores associados com a característica de interesse, visando o emprego em seleção assistida. Assim, trabalhos têm sido realizados para identificação de marcadores associados com resistência à antracnose do colmo (Jung *et al.*, 1994; Matiello, 2004; Broglie *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2011). Com a descoberta do gene de resistência (*Rcg1*) à antracnose do colmo, híbridos quase isogênicos foram desenvolvidos com a introgressão desse gene, diminuindo assim o impacto negativo no rendimento do milho causado pela doença (Frey *et al.*, 2011). No entanto, no Brasil não existem relatos de estudos visando à identificação de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associados com resistência a antracnose do colmo.

Além da ocorrência da antracnose no colmo, a mesma também tem importância nas folhas. Entretanto, a resposta de genótipos de milho à antracnose pode ser diferente quando a infecção pelo *C. graminicola* ocorre nos tecidos das folhas ou do colmo, não havendo correlação e podendo dificultar a identificação de híbridos resistentes a essa doença em ambos os órgãos do milho (Lim & White, 1978; Badu-Apraku *et al.*, 1987; Jirak-Peterson & Esker, 2011; Chung *et al.*, 2011).

Considerando os assuntos abordados anteriormente, os objetivos deste estudo foram:

- 1 – Propor e validar uma escala diagramática para quantificar a severidade da antracnose do colmo.
- 2 – Identificar marcadores SNP significativamente associados com resistência a antracnose do colmo.
- 3 – Verificar a correlação da severidade da antracnose foliar e do colmo em híbridos de milho, visando evidenciar a existência ou não de relação entre os mecanismos de resposta de defesa entre esses dois órgãos.

REFERÊNCIAS

Anderson B, White DG, 1994. Evaluation of methods for identification of corn genotypes with stalk rot and lodging resistance. *Plant Disease* **78**, 590–593.

Badu-Apraku B, Gracen VE, Bergstrom GC, 1987a. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot and leaf blight in a maize inbred derived from a temperate by tropical germplasm combination. *Maydica* **32**, 221-237.

Bergstrom GC, Nicholson RL, 1999. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Phytopathology* **83**, 596-608.

Brogie KE, Butler KH, Butruille MG, da Silva Conceicao A, Frey TJ, Hawk JA, Jaqueth JS, Jones ES, Multani DS, Wolters PJCC, E.I. du Pont de Nemours and Company, Pioneer Hi-Bred International, Inc., University of Delaware United States (2006) Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. United States Patent 20060223102.

Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS, Vaz GRO, 2011. Development and validation of a standard área diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* **60**, 1144–1150.

Christensen JJ, Wilcoxson RD, 1966. Stalk rot of corn. St. Paul: American Phytopathological, 59 p. (American Phytopathological Society. Monograph, 3).

Chung CL, Poland J, Kump K, Benson J, Longfellow J, Walsh E, Balint-Kurti P, Nelson R, 2011. Targeted discovery of quantitative trait loci for resistance to northern leaf blight and other diseases of maize. *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 307-326.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2013) Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, julho 2013/Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, CONAB.

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* **160**, 680-684.

FAO. Food and Agriculture Organization. Disponível em <http://faostat.fao.org>. Acesso em 11 de Outubro de 2013.

Frey TJ, Weldekidan T, Colbert T, Wolters PJCC, Hawk JA, 2011. Fitness evaluation of *Rcg1*, a locus that confers resistance to *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. using near-isogenic maize hybrids. *Crop Science* **51**, 1551-1563.

Jirak-Peterson JC, Esker PD, 2011. Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. *Plant Disease* **95**, 601-610.

Jung M, Weldekidan T, Schaff D, Paterson A, Tingey S, Hawk J, 1994. Generation-means analysis and quantitative trait locus mapping of anthracnose stalk rot genes in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **89**, 413-418.

Lim SM, White DG, 1978. Estimates of heterosis and combining ability for resistance of maize to *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **68**, 1336-1342.

Matiello RR, 2004. Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativas de danos na produção. Tese de Doutorado, Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ, Piracicaba-SP.

Matiello RR, Brunelli KR, Lopes MTG, Morello RMSC, Silva HP, Camargo LEA, 2012. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot (*Colletotrichum graminicola*) in tropical maize inbred lines. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **12**, 179-184.

Palaversic B, Jukic M, Buhinicek I, Vragolovic A, Kozic Z, 2009. Breeding maize for resistance to stalk anthracnose. *Maydica* **54**, 229-232.

Rios JA, Debona D, Duarte HSS, Rodrigues FA, 2013. Development and validation of a standard area diagram set to assess blast severity on wheat leaves. *European Journal of Plant Pathology* **136**, 603–611.

Todd LR, Kommedahl T, 1994. Image analysis and visual estimates for evaluating disease reactions of corn to Fusarium stalk rot. *Plant Disease* **78**, 876–878.

Yadav NV, Vos SM, Bock CH, Wood BW, 2012. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. *Plant Pathology* **62**, 325–335.

CAPÍTULO 1

Validation of a standard area diagram set to estimate severity of anthracnose stalk rot on maize

ABSTRACT

This study aimed to validate a standard area diagram set (SADs) to quantify anthracnose stalk rot (ASR) on maize. The SADs proposed here contains eight classes of disease severity (6.25, 18.8, 31.3, 43.8, 56.3, 68.8, 81.3 and 93.8%). Ten raters used the SADs to assess the severity of anthracnose on maize stalks. The ASR was estimated without the use of SADs in 139 internodes with different degrees of severity and the same raters assessed the internodes using the first SADs and the SADs proposed. Based on analysis of the Lins's concordance correlation coefficient and the equivalence test, as well as the line of linear regression between actual and estimated severity, assessments performed by all raters were closer to the actual value for the SADs proposed. Through this SADs, all variables were significantly different from the first SADs, and the values were closer to an accurate measurement ($r = 0.97$, $C_b = 0.98$, $u = 0.09$, $v = 1.06$, $\rho_c = 0.96$). Greater deviations in errors were observed when the raters gave rankings without SADs and with first SADs, with several examples of errors exceeding 30%. With the SADs proposed few errors above 15% were found and most were concentrated in the range of 10%. Greater reliability in the estimation of disease severity was obtained by using SADs proposed, where 100% of the comparisons resulted in $R^2 > 0.90$. The SADs proposed in this study improves the accuracy, precision and reliability of the estimates of ASR severity on maize.

1 INTRODUCTION

Anthrachnose stalk rot (ASR) (*Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils) is one of the most important diseases to maize in several countries, causing plant lodging, reduced production and poorer grain quality (Callaway *et al.*, 1992; Bergstrom & Nicholson, 1999; Cota *et al.*, 2012; Matiello *et al.*, 2013). A higher incidence of the disease is found in the main maize producing regions of the world, largely due to the use of successive plantations, use of susceptible genotypes, increased plant density, frequency of favorable environmental conditions, in addition to no-tillage without crop rotation and the presence of insects which cause injury to the stalk such as the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hübner) and sugarcane borer (*Diatraea saccharalis* Fabr.) (Keller *et al.*, 1986; Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007; Jirak-Esker & Peterson, 2011; Cota *et al.*, 2012; Matiello *et al.*, 2013).

Symptoms of ASR are more visible after flowering of the maize plant, but the infection process starts by propagules from the leaf lesions or those present in crop residues. On the skin, lesions are tight, longitudinal and appear soggy, initially presenting a reddish-brown coloring and later becoming dark brown to black. In the internal tissues of the stalk there is a dark-brown coloring, which enters into a process of disintegration, affecting the flow of water and nutrients to the top of the stalk. It can cause premature death and lodging in plants (Wheeler *et al.*, 1974; Keller & Bergstrom 1988; Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007).

Estimation of the intensity of a disease, such as ASR, is important to evaluate the different control measures, determine varietal resistance, test the efficiency of fungicides, study the relationship of production damage and others. Thus, the characteristics of accuracy, precision and reproducibility are very desirable in the assessment of disease (Vale *et al.*, 2004; Madden *et al.*, 2007).

The stalk rot as anthracnose on maize is typically evaluated by means of a SADs which has classes of disease intensity following an arithmetic progression, but with great severity intervals between rankings (Christensen & Wilcoxson, 1966; Anderson & White, 1994; Todd & Kommedahl, 1994; Afolabi *et al.*, 2008). Some researchers have used SADs with smaller intervals in the first evaluations and larger in the following, in addition to adopting the midpoint of severity to perform statistical analysis (Keller & Bergstrom, 1988; Muimba-Kankolongo & Bergstrom, 1992; Muimba-Kankolongo & Bergstrom, 2011). However, large score intervals such as 0-25% or 25-75% can hinder the accuracy of disease

assessment in the stalk in relation to the actual value of severity, and also affect the significant difference between treatments by means of statistical analysis.

Another factor to be considered in this pathosystem is related to inoculation. This procedure is usually performed by inserting the pathogen containing inoculum inside the stalk with a veterinary syringe needle or toothpick (Keller & Bergstrom, 1988; Muimba-Kankolongo & Bergstrom, 1992; Anderson & White, 1994; Todd & Kommedahl, 1994; Afolabi *et al.*, 2008; Muimba-Kankolongo & Bergstrom, 2011; Matiello *et al.*, 2013). Thus, a small discoloration is observed where the stalk was perforated with the needle or toothpick, without the presence of pathogen inoculum in control plants. During evaluation damage caused by the inoculation method must be considered and the use of SADs with smaller intervals between scores facilitates this operation.

Therefore, to improve the accuracy and precision of the disease severity estimate, it is very important to study the validation of a SADs before it is recommended. Considering these factors, the aim of this study was to propose and validate a new SADs for the evaluation of stalk rot caused by *C. graminicola*.

2 MATERIAL AND METHODS

For preparation of the SADs, 60 plants of the hybrid BRS 1010 (Embrapa) were inoculated with *C. graminicola* in a greenhouse. Plants were inoculated approximately 60 days after planting, adopting the method of the toothpick dipped in a spore suspension (10^6 conidia ml^{-1}). Before inoculation, the three leaves of the lower part of the plants were removed, exposing the three internodes of the stalk base and the surface of the stalk was disinfected using 70% alcohol. For inoculation, the three most developed internodes of the plants were perforated using a sterilized manual puncher and the toothpick containing the spore suspension was inserted which remained in the stalk until the time of evaluation. Three plants perforated with the sterilized toothpick only were used for control.

Evaluation of the ASR was performed 30 days after inoculation. For this, the 63 stalks were cut longitudinally and the lesions were photographed in a total of 139 internodes which showed symptoms of the disease. Images were acquired using a digital camera with a resolution of 16.2 megapixels. The stalks were placed on a sheet of laminated paper of known dimensions (80 x 80 cm) on a workbench and the photos were taken in an oblique position at a distance that permitted covering of the entire surface to be photographed. Geometric

correction of the images was conducted using the program of geographic information systems (GIS) Quantum Gis Version 8 - Lisbon (www.qgis.org), a free software from the Open Source Geospatial Foundation - OSGeo through the module georeferencing images, where the dimensions of the sheet used acted as a benchmark scale. Pattern recognition of infection, conversion of raster to shapefile and determination of the percentage of necrotic area (actual severity) were performed using the free software developed by Hypercube Topographic Engineering Center of the U.S. military (www.agc.army.mil/hypercube).

To validate the SADs (0.5 to 4.0), the 139 images of stalk internodes containing the different degrees of actual ASR severity were presented to the five experienced (1, 4, 5, 6 and 9) and five inexperienced raters (2, 3, 7, 8 and 10). They were presented via PowerPoint slides, where the raters assessed the severity of the disease with and without the use of the two SADs (Table 1 and 2). For each image evaluated the values without SADs ranged from 0 to 100%. The value midpoint severity was adopted with the use of the two SADs. The SADs are referred to as the first SADs (1.0 to 4.0) and SADs proposed (0.5 to 4.0) (Table 1 and 2).

The data for each rater was submitted to a simple linear regression analysis between the actual severity (independent variable) and the estimated severity (dependent variable), with and without use of the two SADs. Thus, the coefficient of determination (R^2) and error variance (the estimated value minus the actual severity) were obtained for each rater. Reproducibility of assessments or reliability between raters (inter-rater reliability) was determined from the R^2 values of the linear regression between the severities estimated by ten different raters combined in pairs, as proposed by Nutter & Schultz (1995), with a total of 45 combinations. Regression analyses between actual and estimated severity for each rater and between raters were performed using the statistical program MINITAB, version 14.

Besides the linear regression between actual and estimated severity, accuracy and precision were also determined using Lins's concordance correlation coefficient (ρ_c), which combines the measures of accuracy and precision to assess the relational fit to the line of concordance (45°): $\rho_c = r \cdot C_b$. The correlation coefficient (r) between actual and estimated severity measures the precision of the best fit line. The C_b is a bias correction factor which measures how far the best-fit line deviates from 45° . It is the measure of bias or accuracy. The C_b is obtained according to the formula: $C_b = [(v+1 / v+u^2) / 2]^{-1}$, where $v = \sigma_y / \sigma_x$, (σ is the standard deviation of estimated severity (Y) and actual (X) respectively, and $u = (\mu_y - \mu_x) / (\sigma_y \cdot \sigma_x)^{-1/2}$ (μ is the mean value of Y and X , respectively.) The v measures the scale difference between actual and estimated values, which essentially is defined by the difference in slope of the two lines. The u is a reflection of the location shift relative to the scale, primarily

reflecting height differences in the lines. Analysis with points on the concordance line ($r = 1$, $Cb = 1$ [$v = 1$, $u = 0$], and $\rho c = 1$) may be regarded as a perfectly accurate measurement (Nita *et al.*, 2003; Bock *et al.*, 2010; Capucho *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2012).

For all these variables obtained by the analysis of Lins's concordance correlation coefficient, including the inter-rater reliability, the difference between means was calculated (with SADs - without SADs and SADs proposed - first SADs), and the next test was used to test its significance (Yi *et al.*, 2008; Bardsley & Ngugi, 2012, Yadav *et al.*, 2012, Rios *et al.*, 2013). The equivalence test was used to calculate the 95% confidence intervals (CIs) for each statistic (the difference between means) by bootstrapping using the percentile method (with an equivalence test, the null hypothesis is the converse of H_0 , i.e. the null hypothesis is nonequivalence). These analyses were obtained by 2000 balanced bootstrap samples using PROC SURVEYSELECT / PROC UNIVARIATE (SAS institute / inc., Cary, NC, USA). For the final interpretation, the 95% CIs were calculated based on the difference between means of the groups, and if the CIs spanned zero, there was no significant difference between them ($P = 0.05$).

Table 1 – First SADs to evaluation of the anthracnose stalk rot on maize ^a

Score	Severity (%)	Severity midpoint (%)
1.0	00.00 - 25.00	12.50
2.0	26.00 - 50.00	38.00
3.0	51.00 - 75.00	63.00
4.0	76.00 - 100.00	88.00

^a Adapted from Christensen & Wilcoxson (1966).

Table 2 – SADs proposed to evaluation of the anthracnose stalk rot on maize.

Score	Severity (%)	Severity midpoint (%)
0.5	00.00 - 12.50	6.25
1.0	12.60 - 25.00	18.80
1.5	25.10 - 37.50	31.30
2.0	37.60 - 50.00	43.80
2.5	50.10 - 62.50	56.30
3.0	62.60 - 75.00	68.80
3.5	75.10 - 87.50	81.30
4.0	87.60 - 100.00	93.80

3 RESULT

The SADs proposed in this study contained eight classes of ASR intensity (6.25, 18.8, 31.3, 43.8, 56.3, 68.8, 81.3, 93.8% severity), based on an arithmetic progression and smaller severity intervals between scores, which can be seen in Figure 1.

Based on analysis of the Lins's concordance correlation coefficient and equivalence test, as well as the line of linear regression between the actual and estimated severity, the assessments performed by all raters were closer to the actual values using the SADs proposed when compared to the first SADs or in assessments without the use of SADs (Table 3, Figures 2 and 3). In fact, the measures of accuracy and precision significantly improved with the result of using the SADs proposed to assess ASR severity.

When analyzing the first SADs, only the variable scale (v) was significant in relation to evaluations without the SADs. However, other variables showed a small numerical difference and it was not significantly different. When using the SADs proposed, the v was not significant compared to assessment without the SADs, but all other variables were significant. By using this SADs, all variables were significantly different from the first SADs and the values were closer to an accurate measurement ($r = 0.97$, $Cb = 0.98$, $u = 0.09$, $v = 1.06$, $\rho c = 0.96$) (Table 3). Moreover, for 100% of the Lin's concordance correlation coefficient (ρc) was higher with the use of the SADs proposed (Figures 2 and 3).

With the use of the SADs proposed, increase in precision was observed for all raters, because the precision of visual ASR estimates showed coefficients of determination (R^2) greater than 95% (data not shown). This may be considered high for this type of evaluation. Furthermore, a better precision was also confirmed by the decrease in absolute errors (Figures 4 and 5). Without the use of SADs or when using the first SADs greater deviations in errors were observed, and with the exception of the first rater, all other presented errors greater than 20%, with several examples of errors greater than 30%. However, when using the SADs proposed few errors were greater than 15%, and most were concentrated in the range of 10% (Figures 4 and 5).

The inter-rater reliability was significantly improved by use of the SADs proposed (Figure 6 and Table 4). Without the use of SADs and when using the first SADs, 60% and 93% of comparison pairs showed $R^2 < 0.89$, respectively. With the SADs proposed, 100% of the comparisons resulted in $R^2 > 0.90$, thus indicating reliable results (Figure 6). While the mean inter-coefficient of determination (R^2) was 83% for use without the SADs and the first SADs, with the SADs proposed the mean was 95%, with little variation. Moreover, the mean difference analysis (by bootstrapping) showed a significant effect of the SADs proposed, where the raters may evaluate the disease more uniformly (Table 4).

4 DISCUSSION

The SADs proposed showed good representation of the ASR symptoms, improving the ability of the raters to more accurately and precisely assess severity in 139 internodes presented in this study. In the evaluation of future experiments, statistical analysis will likely to be more significant and the treatments more differentiated using the SADs proposed, since the range in severity between scores is smaller compared to when using the first SADs. Therefore, results of the present study reinforce the importance of validating the SADs for future evaluations of plant diseases, as found in several other studies (Stonehouse, 1994; Leite & Amorin, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Capucho *et al.*, 2010; Capucho *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2013).

All analyses used in this study showed that the SADs proposed significantly improved the estimates of ASR severity compared to not using the SADs or when using the first SADs. Assessments performed by all raters were closer to the actual value for the SADs proposed, as shown by linear regression analysis between actual and estimated severity. In addition, 100% of the raters presented a higher ρc and the variables were significant according to the

equivalence test when the SADs proposed was adopted. Even with the use of regression analyses, use of the ρ and equivalence test (95% CIs) was of great importance for the interpretation of the evaluations performed by the ten raters. The ρ has been successfully used in several studies (Nita *et al.*, 2003; Bock *et al.*, 2010; Capucho *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2013), and more recently the equivalence test as well, further facilitating the conclusion of the results (Bardsley & Ngugi, 2012; Yadav *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2013).

During the evaluation process, raters had a tendency to overestimate the severity of the disease, which has been observed in several other studies involving validation of SADs (Sherwood *et al.*, 1983; Newton & Hackett, 1994; Diaz *et al.*, 2001; Leite & Amorim, 2002; Capucho *et al.*, 2010; Capucho *et al.*, 2011; Rios *et al.*, 2013). Only in a few studies has severity been underestimated (Michereff *et al.*, 1998, 2000; Gomes *et al.*, 2004).

Estimates of ASR have shown that the absolute error was reduced by using the SADs proposed, where most of the errors was concentrated in the range of 10%. Therefore, training of raters using this SADs will aid in reducing the absolute errors, increasing efficiency and standardizing evaluation results (Stonehouse, 1994; Nutter & Schultz, 1995). The reliability of estimates between raters was also improved, where 100% of the comparisons resulted in $R^2 > 0.90$, indicating the effectiveness of the SADs proposed. Without the use of SADs and with the first SADs, the mean inter-rater coefficient of determination (R^2) was 83%, while with the SADs proposed the average was 95%, with little variation, in addition to presenting a significant effect for bootstrapping analysis. When different raters use the same SADs to assess disease severity, it is important that the estimates are similar (Nutter & Schultz, 1995).

As a general conclusion, the SADs proposed improved accuracy, precision and reliability of the estimates of ASR severity on maize. Therefore, this SADs will be a very useful tool for epidemiological studies, characterization of isolates of *C. graminicola*, damage production, ASR control methods and other research involving stalk rot on maize.

5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and the Embrapa Milho e Sorgo for providing the financial support. The authors also acknowledge the American Journal Experts for the correction of the English language.

Table 3 – Effect of SADs proposed in accuracy and precision, through assessments of anthracnose stalk rot on 139 internodes for 10 raters.

Variable ^a	Mean ^b		Difference between means ^c	95% Cis of the difference ^d
	Without SADs	First SADs		
Correlation coefficient (r)	0.91 (0.06)	0.90 (0.06)	-0.011 (0.0001)	-0.024 – 0.003 ^{ns}
Coefficient of bias (C_b)	0.90 (0.07)	0.94 (0.03)	0.035 (0.0004)	-0.002 – 0.077 ^{ns}
Location (u)	0.40 (0.19)	0.32 (0.16)	-0.076 (0.0013)	-0.192 – 0.039 ^{ns}
Scale (v)	1.12 (0.12)	1.00 (0.02)	-0.118 (0.0009)	-0.192 – -0.0315 ^{sig}
LCCC (ρ_c)	0.82 (0.07)	0.84 (0.05)	0.018 (0.0003)	-0.013 – 0.054 ^{ns}

Variable	Mean		Difference between means	95% Cis of the difference
	Without SADs	SADs proposed		
Correlation coefficient (r)	0.91 (0.06)	0.97 (0.02)	0.06 (0.0003)	0.034 – 0.089 ^{sig}
Coefficient of bias (C_b)	0.90 (0.07)	0.98 (0.01)	0.083 (0.0004)	0.048 – 0.125 ^{sig}
Location (u)	0.40 (0.19)	0.09 (0.07)	-0.306 (0.001)	-0.404 – -0.225 ^{sig}
Scale (v)	1.12 (0.12)	1.06 (0.03)	-0.063 (0.0007)	-0.126 – 0.007 ^{ns}
LCCC (ρ_c)	0.82 (0.07)	0.96 (0.02)	0.134 (0.0004)	0.097 – 0.172 ^{sig}

Variable	Mean		Difference between means	95% Cis of the difference
	First SADs	SADs proposed		
Correlation coefficient (r)	0.90 (0.06)	0.97 (0.02)	0.071 (0.0002)	0.049 – 0.10 ^{sig}
Coefficient of bias (C_b)	0.94 (0.03)	0.98 (0.01)	0.047 (0.0001)	0.030 – 0.062 ^{sig}
Location (u)	0.32 (0.16)	0.09 (0.07)	-0.229 (0.0009)	-0.308 – -0.139 ^{sig}
Scale (v)	1.00 (0.02)	1.06 (0.03)	0.055 (0.0002)	0.031 – 0.077 ^{sig}
LCCC (ρ_c)	0.84 (0.05)	0.96 (0.02)	0.115 (0.0002)	0.090 – 0.139 ^{sig}

^a Lin's concordance correlation coefficient (ρ_c) combines measures of precision (r) and accuracy (C_b) to measure agreement with the true value.

C_b is a function of location shift (u) and scale shift (v), indicating changes in line height and slope, respectively.

^b Standard deviation in parentheses.

^c Mean of the difference between each rating, with standard errors in parentheses (bootstrap calculated value).

^d Confidence intervals (CIs) were based on 2000 bootstrap samples. If the CIs embrace zero, the difference is not significant ($P = 0.05$);

^{ns} not significant; ^{sig} significant

Table 4 - Inter-rater reliability of visual assessments on 139 internodes with anthracnose stalk rot for 10 raters, without and with the use of two SADs. Inter-rater reliability is measured by coefficient of determination (R^2).

Statistics	Without SADs	First SADs	SADs proposed
Mean inter-rater coefficient of determination (R^2) ^a	0.83 (0.55 – 0.95)	0.83 (0.64 – 0.93)	0.95 (0.92 – 0.97)
Mean difference (first SADs - without SADs) ^b	0.0026 (0.0002) - (CIs -0.0159 – 0.0216) ^{ns}		
Mean difference (SADs proposed - without SADs)	0.1136 (0.0003) - (CIs 0.0813 – 0.1482) ^{sig}		
Mean difference (SADs proposed – first SADs)	0.1133 (0.0002) - (CIs 0.0938 – 0.1356) ^{sig}		

^a Mean coefficients of determination estimated from pairwise comparisons of assessments by all visual assessors.

^b Mean of the difference between each rating, with standard errors in parentheses (bootstrap calculated value), confidence intervals (95% CIs) were based on 2000 bootstrap samples. If the CIs embrace zero, the difference is not significant ($P = 0.05$).

^{ns} not significant; ^{sig} significant



Figure 1 - The standard area diagram set (SADs) to evaluate anthracnose stalk rot severity on maize. Data are presented as the score related with the percentage (%) of internode with anthracnose symptoms.

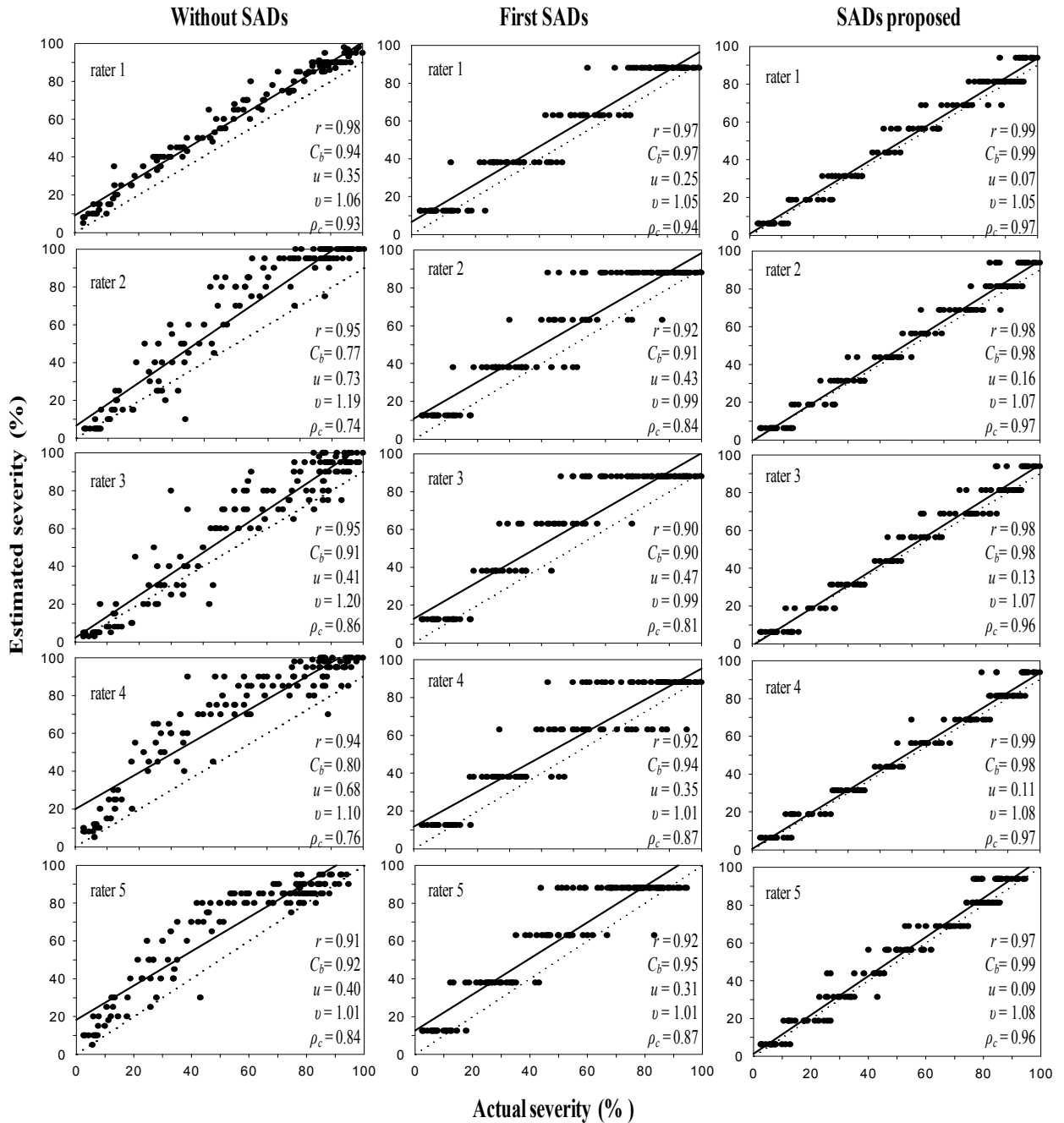


Figure 2 - Estimated severity (full points) without and with the two standard area diagram set (SADs) and the regression line obtained between the actual and estimated severity (full line) of anthracnose stalk rot for first five raters. The dotted line is the concordance line, representing perfect agreement between actual and estimated severity (slope of 1, intercept of 0). Accuracy is determined with Lin's concordance correlation coefficient (ρ_c), calculated as the product of the correlation coefficient (r) and the bias correction factor (C_b). C_b is a function of location shift (u) and scale shift (v), indicating changes in line height and slope, respectively.

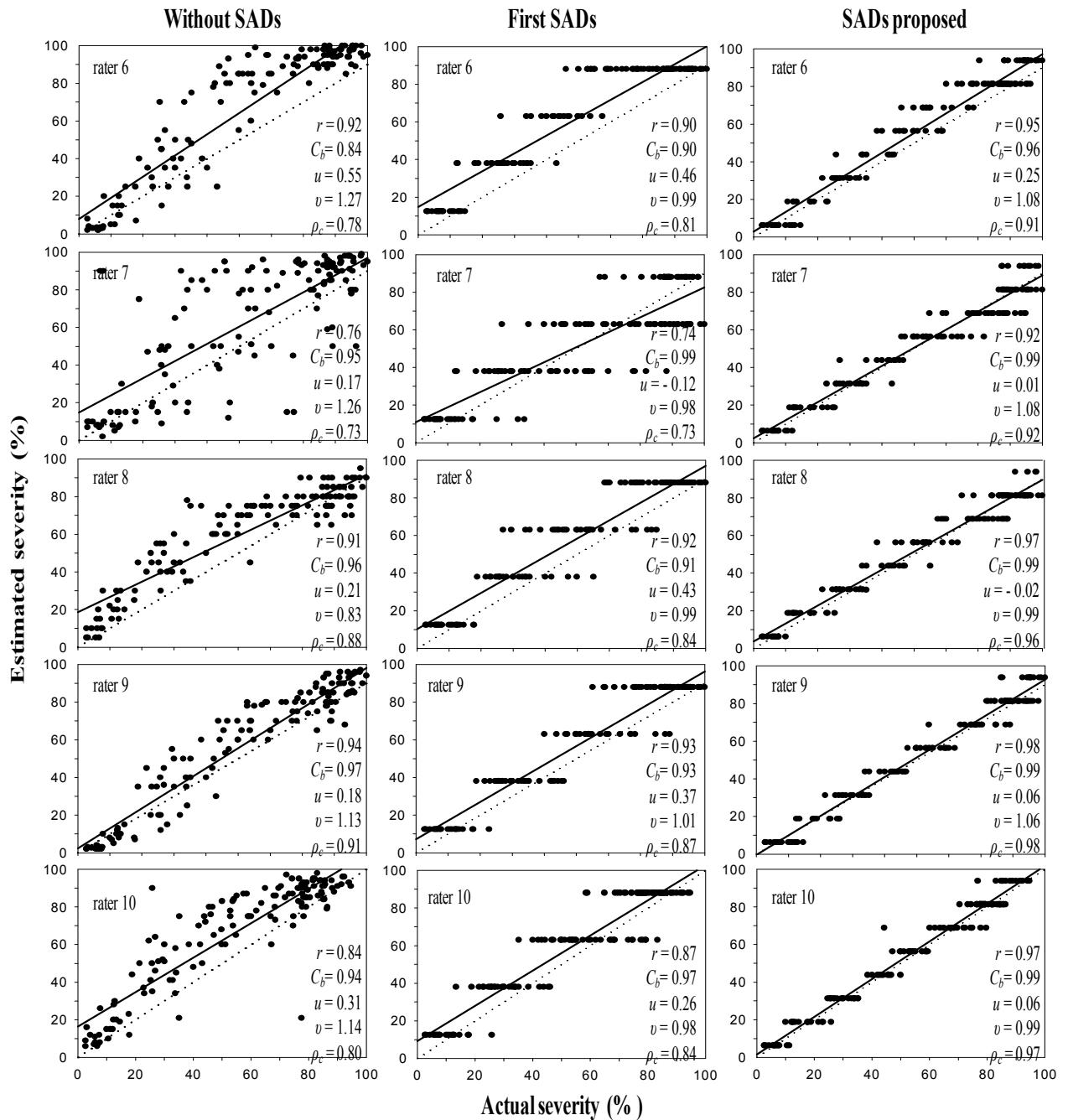


Figure 3 – Estimated severity (full points) without and with the two standard area diagram set (SADs) and the regression line obtained between the actual and estimated severity (full line) of anthracnose stalk rot for other five raters. The dotted line is the concordance line, representing perfect agreement between actual and estimated severity (slope of 1, intercept of 0). Accuracy is determined with Lin’s concordance correlation coefficient (ρ_c), calculated as the product of the correlation coefficient (r) and the bias correction factor (C_b). C_b is a function of location shift (u) and scale shift (v), indicating changes in line height and slope, respectively.

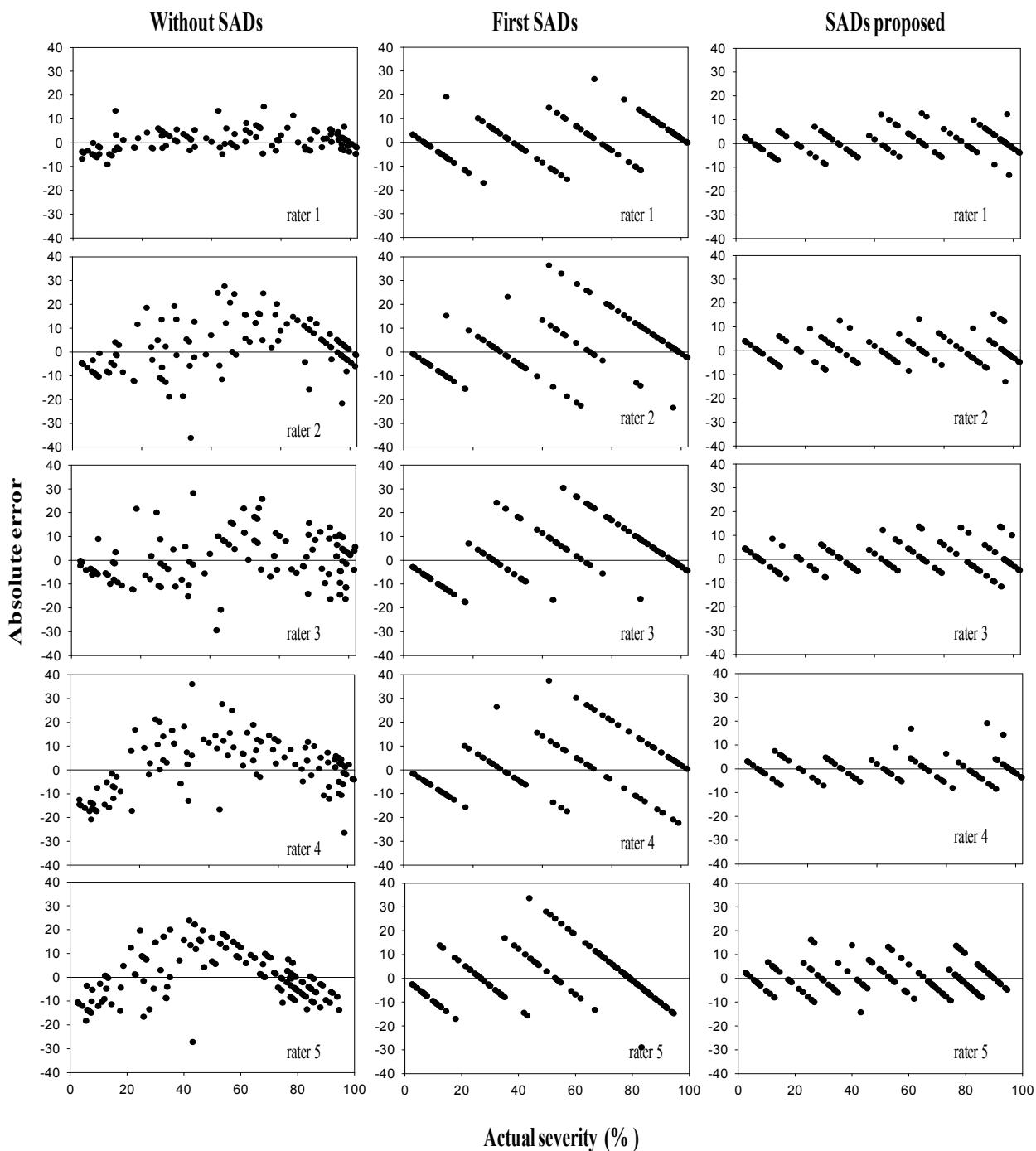


Figure 4 - Absolute error (estimated severity minus actual severity) of estimates of severity of anthracnose stalk rot for first five raters, with and without use of two standard area diagram set (SADs). Low absolute error values indicate that the estimated severity was similar to the actual severity. The use of SADs proposed visibly diminished the error of each rater.

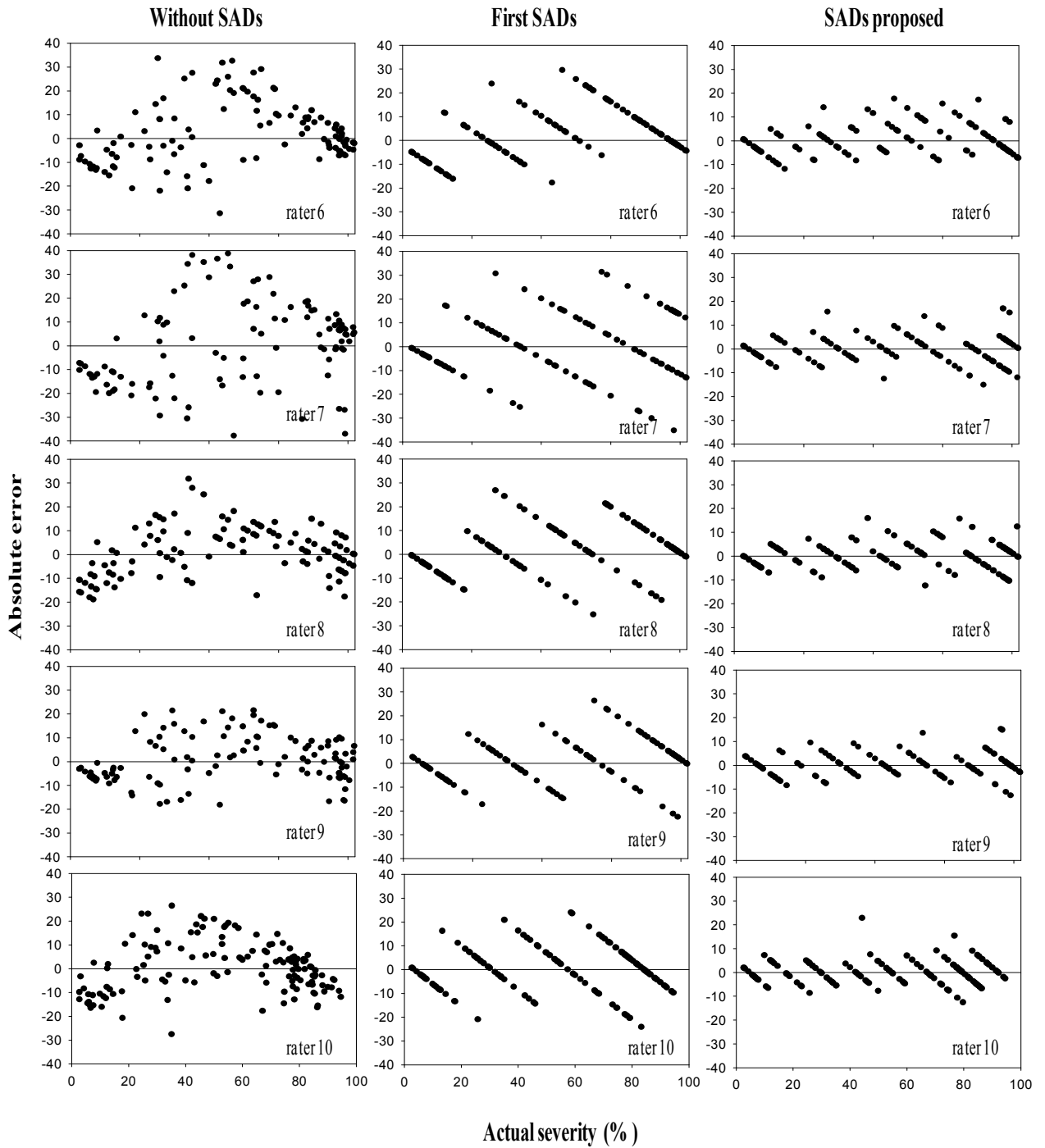


Figure 5 - Absolute error (estimated severity minus actual severity) of estimates of severity of anthracnose stalk rot for other five raters, with and without use of two standard area diagram set (SADs). Low absolute error values indicate that the estimated severity was similar to the actual severity. The use of SADs proposed visibly diminished the error of each rater.

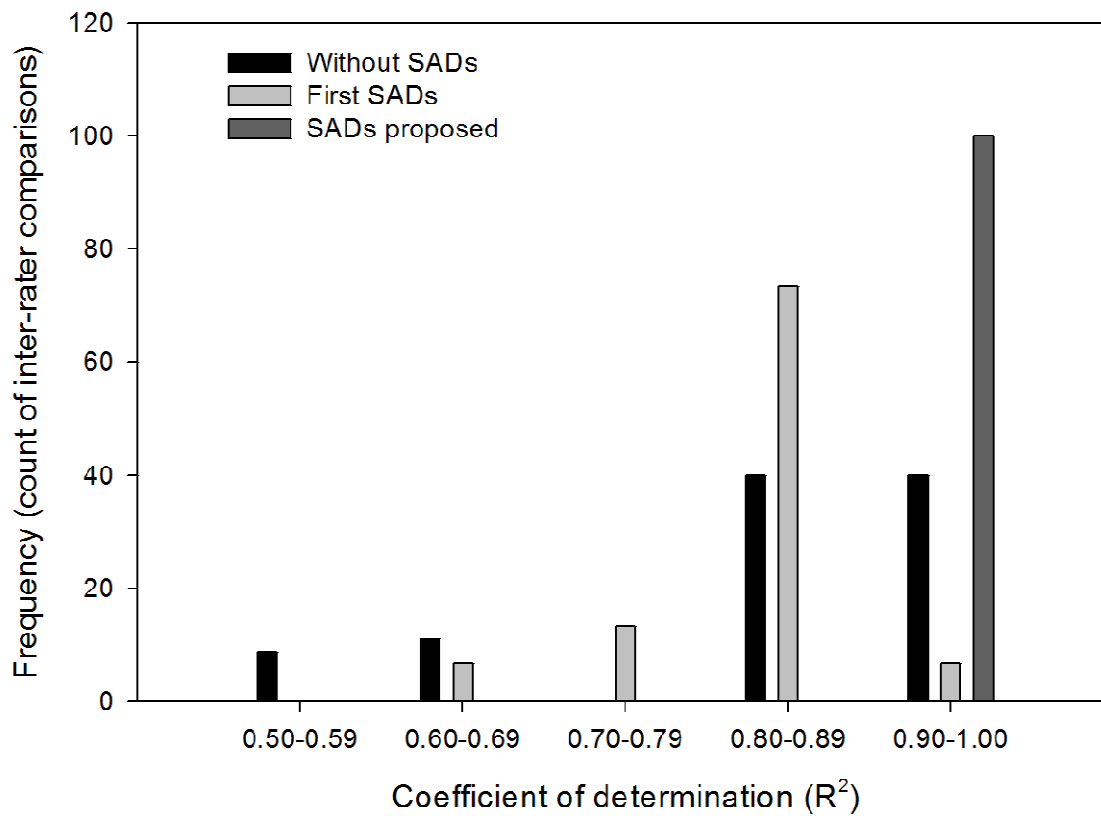


Figure 6 – Inter-rater reliability of anthracnose stalk rot severity estimates based on the coefficient of determination (R^2) of the linear regression analysis of all pairwise comparisons of 10 raters assessing severity of anthracnose stalk rot with and without the use of two standard area diagram set (SADs).

6 REFERENCES

Afolabi CG, Ojiambo PS, Ekpo EJA, Menkir A, Bandyopadhyay R, 2008. Novel sources of resistance to Fusarium stalk rot of maize in tropical Africa. *Plant Disease* **92**, 772–780.

Anderson B, White DG, 1994. Evaluation of methods for identification of corn genotypes with stalk rot and lodging resistance. *Plant Disease* **78**, 590–593.

Bardsley SJ, Ngugi HK, 2012. Reliability and accuracy of visual methods used to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. *Plant Pathology* **62**, 460–474.

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

Bock CH, Poole G, Parker PE, Gottwald TR, 2010. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**, 59–107.

Callaway MB, Smith ME, Coffman WR, 1992. Effect of anthracnose stalk rot on grain yield and related traits of maize adapted to the northeastern United States. *Canadian Journal of Plant Science* **72**, 1031–1036.

Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS, Parreira DF, Ferreira PA, Lanza FE, Costa RV, Casela CR, Cota LV, 2010. Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. *Crop Protection* **29**, 1015–1020.

Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS, Vaz GRO, 2011. Development and validation of a standard área diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*. *Plant Pathology* **60**, 1144–1150.

Christensen JJ, Wilcoxson RD, 1966. *Stalk rot of corn*. Saint Paul: The American Phytopathological Society, Monograph, 3.

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* **160**, 680–684.

Diaz CG, Bassanezi RB, Filho AB, 2001. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. *Summa Phytopathologica* **27**, 35–39.

Gomes AMA, Michereff SJ, Mariano RLR, 2004. Elaboração e validação de escala diagramática para cercosporiose da alface. *Summa Phytopathologica* **30**, 38–42.

Jirak-Peterson JC, Esker PD, 2011. Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. *Plant Disease* **95**, 601–610.

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.

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

Leite RMVBC, Amorim L, 2002. Elaboração e validação de escala diagramática para Mancha de Alternária em girassol. *Summa Phytopathologica* **28**, 14–19.

Madden LV, Hughes G, van den Bosch F, 2007. *The Study of Plant Disease Epidemics*. St. Paul, MN: APS Press.

Matiello RR, Lopes MTG, Brunelli KR, Camargo LEA, 2013. Comparison of yield damage of tropical maize hybrids caused by anthracnose stalk rot. *Tropical Plant Pathology* **38**, 128–132.

Michereff SJ, Pedrosa RA, Noronha MA, Martins RB, Silva FV, 1998. Escala diagramática e tamanho de amostras para avaliação da severidade da mancha parda da mandioca (*Cercosporidium henningsii*). *Agrotropica* **10**, 143–148.

Michereff SJ, Maffia LA, Noronha MA, 2000. Escala diagramática para avaliação da severidade da queima das folhas do inhame. *Fitopatologia Brasileira* **25**, 612–619.

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.

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.

Newton AC, Hackett CA, 1994. Subjective components of mildew assessment on spring barley. *European Journal of Plant Pathology* **100**, 395–412.

Nita M, Ellis MA, Madden LV, 2003. Reliability and accuracy of visual estimation of Phomopsis leaf blight of strawberry. *Phytopathology* **93**, 995–1005.

Nutter FW, Schultz PM, 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of Plant Pathology* **17**, 174–184.

Rios JA, Debona D, Duarte HSS, Rodrigues FA, 2013. Development and validation of a standard area diagram set to assess blast severity on wheat leaves. *European Journal of Plant Pathology* **136**, 603–611.

Sherwood RT, Berg CC, Hoover MR, Zeiders KE, 1983. Illusions in visual assessment of Stagonospora leaf spot of orchardgrass. *Phytopathology* **73**, 173–177.

Stonehouse J, 1994. Assessment of Andean bean diseases using visual keys. *Plant Pathology* **43**, 519–527.

Todd LR, Kommedahl T, 1994. Image analysis and visual estimates for evaluating disease reactions of corn to Fusarium stalk rot. *Plant Disease* **78**, 876–878.

Vale FXR, Jesus Junior WC, Zambolim L, 2004. *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*. Belo Horizonte, Brazil: Perffil Editora.

Venard C, Vaillancourt L, 2007. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. *Phytopathology* **97**, 438–447.

Yadav NV, Vos SM, Bock CH, Wood BW, 2012. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. *Plant Pathology* **62**, 325–335.

Yi Q, Wang PP, He Y, 2008. Reliability analysis for continuous measurements: equivalence test for agreement. *Statistics in Medicine* **27**, 2816–2825.

Wheeler H, Politis DJ, Poneleit CG, 1974. Pathogenicity, host range, and distribution of *Colletotrichum graminicola* on corn. *Phytopathology* **64**, 293–296.

CAPÍTULO 2

Identificação de marcadores SNP associados com resistência a antracnose do colmo em milho

RESUMO

A antracnose do colmo, causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola*, é uma doença amplamente distribuída em cultivos de milho no mundo, causando o acamamento ou morte prematura das plantas, e redução na qualidade e peso dos grãos. A identificação de marcadores moleculares associados com resistência a essa doença torna-se de grande interesse para futuros estudos de mapeamento de QTLs, e utilização desses marcadores na seleção assistida em programas de melhoramento. Neste estudo, 262 progênies F_{2:3} foram fenotipadas em campo, das quais foram selecionadas 20 progênies mais resistentes e 20 mais suscetíveis à antracnose do colmo. Em seguida, essas progênies selecionadas foram inoculadas em casa de vegetação, e os indivíduos dentro de cada progênie com severidade ≤ 18.8 % (progênies resistentes) e ≥ 56.3 (progênies suscetíveis) foram selecionados para a extração de DNA. Uma das progênies considerada resistente não apresentou resultado semelhante e foi desconsiderada. Assim, foram utilizadas as 20 progênies suscetíveis, 19 resistentes e o híbrido autofecundado para a extração de DNA e genotipagem com marcadores SNP. Após a obtenção dos dados genotípicos, foi realizada uma análise de regressão linear para identificar marcadores polimórficos significativamente associados com resistência à antracnose do colmo. No total, foram identificados 12 marcadores SNP significativamente associados à resistência à antracnose do colmo, sendo que oito marcadores apresentaram efeito genético aditivo, e quatro, efeito de dominância. Os marcadores com efeito aditivo estão localizados no cromossomo 3 (bin 3.02/03/04) e 10 (bin 10.01), explicando 18 a 23% da variação fenotípica. Os marcadores que apresentaram efeito de dominância estão no cromossomo 4 (bin 4.05) e 9 (bin 9.02/03), explicando 18 a 35 % da variação fenotípica. Estudos futuros devem ser realizados para validação desses marcadores, verificando o potencial na utilização em seleção assistida em programas de melhoramento de milho.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas presentes na agricultura mundial, com aumento significativo da área plantada no Brasil nos últimos anos, com aproximadamente 15 milhões de hectares. Além disso, o Brasil está entre os países com maior produção, sendo mais de 70 milhões de toneladas registrada na última safra (Conab, 2013). No entanto, a expansão do cultivo com milho proporcionou aumento na severidade das doenças, representando umas das principais causas do menor rendimento da cultura. Entre essas doenças, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. é considerada uma das mais importantes, podendo ocorrer em todas as partes das plantas, mas com maior importância nas folhas e, principalmente no colmo (Badu-Apraku *et al.*, 1987a; Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007; Costa *et al.*, 2010a; Jirak-Peterson & Esker, 2011; Cota *et al.*, 2012).

Somente nas Americas, *C. graminicola* causa perdas anuais em produção estimadas em mais de um bilhão de dólares (Oestreich, 2005). A antracnose do colmo é considerada de maior preocupação econômica devido aos danos no rendimento do milho causado pelo acamamento ou morte prematura das plantas e redução na qualidade e peso dos grãos (Badu-Apraku *et al.*, 1987b; Costa *et al.*, 2010a; Jirak-Peterson & Esker, 2011; Cota *et al.*, 2012). As condições favoráveis para maior predominância da antracnose do colmo são os plantios sucessivos de milho, uso de genótipos suscetíveis, maior densidade populacional, plantio direto sem a rotação de cultura e a presença de insetos como a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis* Fabr.) e a broca europeia do milho ou European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Keller *et al.*, 1986; Bergstrom & Nicholson, 1999; Jirak-Peterson & Esker, 2011; Cota *et al.*, 2012).

Os sintomas da antracnose do colmo são mais visíveis após o florescimento das plantas. Na casca, surgem lesões estreitas, longitudinais e com aspecto encharcado, que são inicialmente de coloração pardo-avermelhada e posteriormente tornando-se marrom-escuras a negras. Nos tecidos internos do colmo ocorre uma coloração marrom-escura, que entra em processo de desintegração, afetando o fluxo de água e nutrientes do colmo para a parte superior, podendo ocasionar a morte prematura, quebramento ou acamamento das plantas (Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007).

O controle da antracnose do colmo pode ser realizado por meio da incorporação de resíduos no solo, uso de adubação nutricional equilibrada, adoção de densidade populacional adequada, rotação de culturas e principalmente o uso de cultivares de milho com resistência

genética (Bergstrom & Nicholson, 1999). Como essa última medida de controle é a mais importante, vários trabalhos já foram realizados para a obtenção de genótipos resistentes a antracnose do colmo, além de estudos sobre a herança genética da resistência (Carson & Hooker, 1981; Badu-Apraku *et al.*, 1987 a, b; Toman & White, 1993; Palaversic *et al.*, 2009; Matiello *et al.*, 2012). A maioria dos estudos envolvendo este patossistema mostrou uma resistência de herança quantitativa, com a presença de efeitos genéticos de dominância e principalmente de efeitos aditivo. (Carson & Hooker, 1981; Badu-Apraku *et al.*, 1987 a; Toman & White, 1993; Weldekidan & Hawk, 1993, Jung *et al.*, 1994; Matiello *et al.*, 2012).

Carson & Hooker (1982), trabalhando com translocações recíprocas, identificaram genes de resistência à antracnose do colmo presentes nos braços longos dos cromossomos 1, 4, 8 e ambos braços do cromossomo 6 em milho. Além disso, foi realizado um estudo de mapeamento de QTL (*quantitative trait locus*) em duas populações de milho segregando para resistência a antracnose do colmo (Jung *et al.*, 1994), a partir da qual foi identificado o gene de resistência (*Rcg1*), localizado em uma região subjacente a um QTL de maior efeito detectado no cromossomo 4 (bin 4.07), que, em seguida, foi clonado (Broglie *et al.*, 2006). Em trabalhos realizados com apenas um isolado de *C. graminicola*, outras regiões nos cromossomos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 de milho também foram encontradas em associação com a resistência à antracnose do colmo (Matiello, 2004; Chung *et al.*, 2011).

Nesses estudos, foram utilizados marcadores moleculares *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), *Simple Sequence Repeats* (SSR) e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Jung *et al.*, 1994; Matiello, 2004; Broglie *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2011). Marcadores SNP são abundantes no genoma do milho e tem sido amplamente utilizados, em função da grande disponibilidade ao longo do genoma, excelente habilidade de discriminação entre indivíduos, grande utilidade em estudos de associação entre marcador e fenótipo, além do aumento significativo na resolução de análises de mapeamento genético e de QTLs (Mammadov *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Semagn *et al.*, 2012).

Devido à grande importância da antracnose do colmo em cultivos de milho no Brasil, e ao fato da resistência genética ser a medida de controle mais eficiente, a identificação de marcadores SNP significativamente associados à resistência a essa doença torna-se de grande interesse para uso na seleção assistida em programas de melhoramento. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar marcadores SNP associados com resistência à antracnose do colmo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das progênes F_{2:3}

A partir da autofecundação de um híbrido simples de milho (material F₁), considerado resistente à antracnose do colmo, foram obtidos sementes F₂. Em seguida, essas sementes foram plantadas em campo e cada planta F₂ foi autofecundada para a obtenção de progênes F_{2:3}. Foram obtidas 262 progênes F_{2:3} com sementes suficientes para montagem de ensaios.

2.2 Experimento no campo

O primeiro experimento foi conduzido durante os meses de fevereiro à maio de 2012 na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais (latitude - 19°28'03''S, longitude - 44°15'08''W e altitude de 732 m). Foram avaliadas as 262 progênes F_{2:3} obtidas a partir da autofecundação dos indivíduos F₂, o híbrido autofecundado, além de testemunhas comuns para suscetibilidade à antracnose do colmo. O delineamento foi em blocos casualizados com duas repetições, e as parcelas foram constituídas de uma fileira de 3,0 m de comprimento, com espaçamento de 0,80 m entre fileiras e cinco plantas por metro.

Após o preparo da área, foi utilizado 300 kg ha⁻¹ do fertilizante NPK comercial (8:28:16 + 0,4% Zn) na adubação de plantio e 125 kg ha⁻¹ de uréia aos 30 e 45 dias após a emergência das plantas (DAE). O controle de plantas daninhas foi realizado por meio da aplicação de atrazine (500 g/L) e de nicossulfurom (40 g/L) aos 27 DAE, e também com capinas manuais. Para o controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), foi aplicado o inseticida espinosade (100 mL ha⁻¹) aos 45 DAE. A irrigação por aspersão foi utilizada durante todo o período do experimento.

A inoculação foi realizada com o isolado monospórico de *C. graminicola* (Cg 03.09), o qual se encontra depositado na micoteca da Embrapa Milho e Sorgo. Esse isolado tem sido utilizado em trabalhos anteriores, sendo virulento em várias cultivares. O híbrido autofecundado no presente trabalho apresenta-se como resistente ao Cg 03.09. A inoculação foi realizada na fase de pré-pendoamento, adotando-se o método do palito esterilizado imerso na suspensão de esporos (10⁶ conídios ml⁻¹). Antes da inoculação, as folhas inferiores das oito plantas mais desenvolvidas foram removidas, expondo-se os entrenós da base do colmo e realizada uma desinfestação superficial por meio de álcool 70%. Em seguida, o terceiro entrenó mais desenvolvido foi perfurado com o uso de um furador manual esterilizado e

inserido o palito contendo a suspensão de esporos, o qual permaneceu no colmo até o momento da avaliação.

A avaliação da antracnose foi realizada aos 30 dias após a inoculação. Os colmos foram cortados longitudinalmente e a severidade avaliada no entrenó inoculado por meio de uma escala de nota proposta no primeiro capítulo. Foi adotado o ponto médio de cada nota (Tabela 1). Após o processamento dos dados das avaliações de campo, foram selecionadas 20 progênies mais resistentes e 20 mais suscetíveis à antracnose do colmo. As progênies resistentes e suscetíveis apresentaram severidade média menor que 15 e maior que 50%, respectivamente.

Tabela 1 – Escala de nota para avaliação da antracnose do colmo em milho.

Nota	Severidade (%)	Ponto médio (%)
0,5	00,00 - 12,50	6,25
1,0	12,60 - 25,00	18,80
1,5	25,10 - 37,50	31,30
2,0	37,60 - 50,00	43,80
2,5	50,10 - 62,50	56,30
3,0	62,60 - 75,00	68,80
3,5	75,10 - 87,50	81,30
4,0	87,60 - 100,00	93,80

2.3 Experimento em casa-de-vegetação

Após a avaliação de campo, sementes remanescentes das 40 progênies selecionadas foram utilizadas para plantio em vasos de 20 L em casa-de-vegetação, sendo que cada progênie foi representada por meio de 8 plantas. O híbrido autofecundado também foi usado no plantio. Nesse segundo experimento, aos 25 DAE foi realizada a coleta de folhas de plantas marcadas individualmente em cada progênie, sendo essas folhas congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas em *deep freezer* a -80 °C. Na fase de pré-endoamento, foi realizada a inoculação com o mesmo isolado de *C. graminicola*. Em seguida, 30 dias após a inoculação, foi realizada a avaliação da severidade da antracnose em plantas individuais. Assim, dentro de cada progênie, as plantas com severidade $\leq 18,8$ % (progênie resistente) e com severidade $\geq 56,3$ (progênie suscetível) foram selecionadas para a

extração de DNA. Uma das progêneses considerada resistente não apresentou resultado semelhante e foi desconsiderada. Assim, foram utilizadas as 20 progêneses suscetíveis, 19 resistentes e o híbrido autofecundado para a extração de DNA.

2.4 Extração e integridade do DNA genômico

As folhas das plantas selecionadas dentro de cada progênie foram retiradas do *deep freezer* -80, e uma pequena amostra (discos foliares) de cada material foi utilizada para o processo de extração de DNA, seguindo a metodologia descrita por Lana *et al.* (2010). O DNA do híbrido autofecundado também foi extraído. As amostras foram primeiramente maceradas em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e o pó fino obtido foi inserido em eppendorf de 2,0 mL e, em seguida, adicionados 800 µL de tampão CTAB contendo 2% de β-mercaptoetanol [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% β-mercaptoetanol]. As amostras foram homogeneizadas no vortex e mantidas em banho-maria a 65 °C durante 40 minutos. Após o resfriamento por 5 minutos na capela de exaustão, foram acrescentado às amostras, 700 µL de solução de clorofórmio-octanol (24:1v/v), com homogeneização manual constante por 10 minutos. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um eppendorf de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol (-20 °C), sendo homogeneizado por inversão suave e acondicionados no freezer por, no mínimo, uma hora. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado, foram adicionados 300 µL de etanol 70% (v/v) resfriado, e realizado o processo de centrifugação novamente. O sobrenadante foi descartado com auxílio de uma pipeta, e a completa evaporação da solução de etanol foi realizada por meio da centrífuga a vácuo para secagem mais rápida (‘‘spin de vácuo’’). Para ressuspender o DNA precipitado, foram adicionados ao eppendorf 100 µL de tampão TE pH 8.0 com 0,4 µL de RNase a 10 mg/mL (10 mM Tris- HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0). A concentração de DNA das amostras foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop e realizada a diluição com TE para 1000 ng/µL. O DNA foi armazenado no freezer a -20 °C até o momento da sua utilização. A qualidade e integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, o qual foi corado com Gel Red, visualizado em transiluminador de luz ultravioleta, e registrado no aparelho fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System.

2.5 Obtenção de marcadores SNP

A genotipagem foi realizada por meio de marcadores SNP, os quais foram selecionados por meio da tabela disponível em Semagn *et al.* (2012). Informações disponíveis em bancos de dados de domínio público relacionados ao genoma do milho (<http://www.maizegdb.org/>; <http://www.panzea.org/>) e em resultados de alguns trabalhos que reportam marcadores moleculares associados a resistência a diferentes doenças de milho, como a antracnose do colmo (Jung *et al.*, 1994; Matiello, 2004; Rezende, 2004; Wisser *et al.*, 2006; Wisser *et al.*, 2008; Broglie *et al.*, 2009; Kump *et al.*, 2011; Poland *et al.*, 2011), também foram utilizadas para escolha dos marcadores SNP utilizados no presente trabalho. Assim, 682 marcadores foram selecionados para genotipagem, e sua distribuição ao longo do genoma do milho pode ser verificada na Figura 1. Para a genotipagem, foi utilizado o serviço oferecido pela empresa LGC Genomics KBioscience (<http://www.lgcgenomics.com>), com base no sistema KASP™ (Kompetitive Allele Specific PCR). O DNA das 39 progênies e do híbrido foi preparado e transferido para uma placa estéril, com concentração suficiente para o uso de 10,5 ng de DNA/SNP durante o processo de genotipagem.

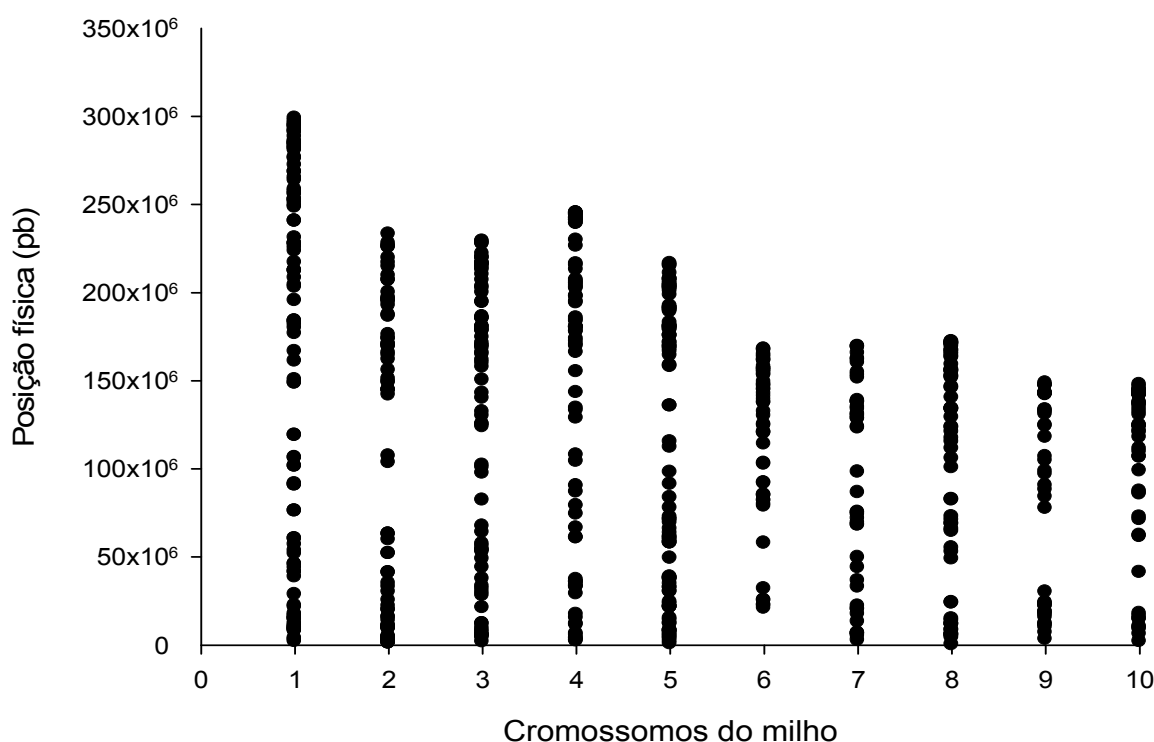


Figura 1 - Dispersão e posição física (pares de bases) dos SNPs selecionados (cromossomos 1 – 10 de milho).

2.6 Análises fenotípicas

As análises estatísticas dos dados fenotípicos foram processadas utilizando-se o *software* Selegen-REML/BLUP, com base na metodologia de modelos mistos via REML (*Restricted Maximum Likelihood*) para a obtenção de valores genotípicos a partir de BLUP (*Best Linear Unbiased Predictor*) (Resende, 2006). Assim, para a predição dos valores genéticos, foi considerado o modelo 83, conforme a seguir:

$$y = Xu + Zg + e$$

em que: y é o vetor de dados, u é o escalar referente à média geral (efeito fixo), g é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios), e é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). As letras maiúsculas representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos. A partir desse modelo, foram obtidos os valores genotípicos preditos ($u+g$) e a acurácia.

2.7 Associações entre SNP e resistência a antracnose do colmo

Após a obtenção dos dados genotípicos, todas as análises seguintes foram realizadas utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2013). Primeiramente, foi realizado o controle de qualidade dos marcadores, onde os SNP considerados monomórficos e aqueles com frequência do alelo raro (*minor allele frequency*, MAF) menor que 5% foram excluídos das análises. Em seguida, foi realizada uma análise de regressão linear para identificar marcadores polimórficos significativamente ($P < 0,01$) associados com a resistência a antracnose do colmo. Para isso, foram utilizados os valores genotípicos preditos ($u+g$) obtidos utilizando modelos mistos.

Para identificar associações significativas entre marcadores SNP e a resistência a antracnose foi utilizado o seguinte modelo:

$$y_i = \mu + x_{a_{ij}} \alpha_j + x_{d_{ij}} \delta_j + \varepsilon_i$$

em que: y_i é o valor de BLUP obtido para o híbrido e a progênie i ; μ é a média geral; $x_{a_{ij}}$ é o genótipo do marcador j para o híbrido e a progênie i , assumindo valores 0, 1 e 2 para os genótipos homocigotos para o alelo menos frequente, heterocigoto, homocigotos para o alelo de maior frequência, respectivamente; α_j é o efeito aditivo (efeito de substituição alélica) do

marcador j ; $x_{d_{ij}}$ é a variável indicadora para o genótipo do marcador j para o híbrido e a progênie i , assumindo valores 1 ou 0 se o genótipo do híbrido e da progênie i é heterozigoto ou homozigoto para o marcador j , respectivamente; δ_j é o efeito de dominância para o marcador j ; e ε_i é o efeito residual.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da antracnose do colmo em casa-de-vegetação

Os valores genotípicos preditos (u+g), obtidos a partir da abordagem de modelos mistos, e as médias fenotípicas para severidade da antracnose do colmo nas 39 progênies selecionadas e do híbrido estão apresentados na Tabela 2. As primeiras 20 progênies foram consideradas as mais suscetíveis à doença, com valores genotípicos entre 60,22 a 84,40, e as demais 19 progênies foram as mais resistentes, com valores entre 6,68 a 16,66. O híbrido autofecundado apresentou valor genotípico de 14,34. Além disso, a estimativa de acurácia do ensaio foi 98 %, a qual mede a correlação entre valores genéticos preditos e valores verdadeiros.

3.2 Identificação de SNP associados com resistência à antracnose do colmo

Após as análises de regressão, nove marcadores com efeito genético aditivo foram identificados. No entanto, um desses apresentou médias discrepantes para as classes genotípicas e foi desconsiderado da análise. Com isso, oito marcadores SNP, localizados no cromossomo 3 (bins 3.02/03/04) e 10 (bin 10.01), com efeito genético aditivo, apresentaram-se significativamente associados a resistência a antracnose ($P < 0,01$) (Figura 2). A variação fenotípica explicada pelos marcadores foi determinada a partir do coeficiente de determinação (R^2) do modelo, que apresentou valores entre 18 a 23% (Tabela 3). Além desses, foram identificados quatro marcadores SNP associados à resistência a antracnose que apresentaram efeito genético de dominância significativo ($P < 0,01$ e $P < 0,001$) (Figura 3), os quais estão localizados no cromossomo 4 (bin 4.05) e 9 (bin 9.02/03), e explicam 18, 19, 21 e 35 % da variação fenotípica (Tabela 4).

4 DISCUSSÃO

O método de avaliação adotado neste trabalho foi eficiente para discriminar as progênies, sendo possível observar a diferença na intensidade da antracnose do colmo entre os materiais com maior padrão de suscetibilidade e de resistência. Essa resistência não é considerada como completa, mas parcial como tem sido observado em outros estudos com essa doença (Carson & Hooker, 1981; Badu-Apraku *et al.*, 1987 a; Jung *et al.*, 1994; Broglie *et al.*, 2006; Matiello *et al.*, 2012).

A partir da análise de modelos mistos, foi possível a obtenção da estimativa da acurácia experimental, cujo valor foi elevado (acima de 90%), o que indica excelente precisão experimental, o que é esperado para ensaios conduzidos em casa de vegetação (Resende, 2007). Em ensaios de comparação com mais de dez materiais genéticos, é recomendado o uso do REML/BLUP (tratamentos como efeitos aleatórios) e não por meio de testes de comparação de médias, os quais são considerados como efeitos fixos (Resende, 2004). A grande vantagem da metodologia de modelo misto é permitir a recuperação dos valores genotípicos, existindo maior acurácia devido às predições dos efeitos aleatórios serem forçadas em direção à média geral pelo efeito de *shrinkage*. Esse efeito tende a reduzir a magnitude das estimativas dos efeitos considerados fixos até zero, ou seja, eliminando os efeitos ambientais residuais inclusos nos dados fenotípicos (Resende, 2004). Estudos de mapeamento de QTLs e mapeamento associativo para resistência a diferentes doenças em milho têm sido realizados com base nos valores genotípicos obtidos via BLUP (Pernet *et al.*, 1999a; Pernet *et al.*, 1999b; Chung *et al.*, 2011; Poland *et al.*, 2011; Bonamico *et al.*, 2012).

No presente trabalho, foram identificados 12 marcadores SNP associados com resistência à antracnose do colmo, sendo que oito apresentaram efeito genético aditivo significativo, e quatro, efeito de dominância. Vários outros trabalhos também mostraram que a resistência neste patossistema é caracterizada pela presença desses dois tipos de efeito, embora o efeito aditivo seja o mais prevalente e representando uma importante fonte de variação (Lim e White, 1978; Carson & Hooker, 1981; Badu-Apraku *et al.*, 1987 a; Weldekidan e Hawk, 1993, Jung *et al.*, 1994; Matiello *et al.*, 2012). Para estudar a herança da resistência à antracnose do colmo, Carson & Hooker (1981) utilizaram cinco populações oriundas de cruzamentos entre quatro linhagens resistentes e duas suscetíveis, onde relataram que os efeitos genéticos aditivos responderam por mais de 90% da variação total entre gerações em todas as populações trabalhadas. Efeito genético aditivo também foi predominante em duas populações de milho segregando para resistência a antracnose do

colmo, explicando entre 70 a 99% da variação pelo número total de entrenós descoloridos, e entre 64 a 96% da variação pelo número de entrenós apresentando mais de 75% de descoloração causada por *C. graminicola* (Jung *et al.* 1994).

Devido a magnitude do efeito genético estimado e da variância fenotípica explicada pelos marcadores (R^2 parcial), podemos considerar que os marcadores detectados no presente trabalho apresentaram efeitos individuais reduzidos ou moderados, indicando uma herança provavelmente controlada por muitos genes, o que caracteriza o controle genético de caracteres quantitativos. Estudos realizados em populações experimentais de milho tropical também sugerem um modo de herança mais complexo para a antracnose do colmo, sendo controlada por vários genes de efeito individual reduzido (Matiello *et al.*, 2012). Carson & Hooker (1982), utilizando translocações recíprocas, concluíram que genes para resistência a essa doença estavam presentes nos braços longos dos cromossomos 1, 4, 8 e ambos braços do cromossomo 6. Outros estudos realizados com a antracnose do colmo também mostraram uma herança quantitativa sobre a resistência (Carson & Hooker, 1981; Badu-Apraku *et al.*, 1987 a; Matiello, 2004).

Os SNP identificados neste trabalho foram comparados com a localização cromossômica de vários outros marcadores associados com resistência às doenças no milho (Tabela 5). Com relação à antracnose do colmo, os marcadores desse estudo estão localizados nos cromossomos 3 (bins 3.02, 3.03 e 3.04), 4 (bin 4.05), 9 (bins 9.02 e 9.03) e 10 (bin 10.01), podendo ser um novo relato sobre localização de genes de resistência. Outras regiões nos cromossomos bin como em 1.02, 4.10, 5.05, 6.01, 7.02, 8.04, 9.03 (Matiello, 2004), 3.05, 5.06, 6.05 (Chung *et al.*, 2011) e 4.07 (Jung *et al.*, 1994) também foram encontradas em associação com resistência à antracnose do colmo. Recentemente, com a descoberta do gene *Rcg1* (cromossomo 4.07), a introgressão em linhagens pode ser obtida com sucesso e híbridos produzidos com linhagens contendo esse gene aumentou a resistência à antracnose do colmo quando inoculados com uma mistura de isolados de *C. graminicola*, diminuindo o impacto negativo no rendimento do milho causado pela doença (Frey *et al.*, 2011). Além disso, devido ao ciclo de vida assexuado e limitada variabilidade desse patógeno, os autores acreditam que *Rcg1* pode apresentar uma resistência mais durável.

Quando comparamos marcadores moleculares associados com resistência a outras doenças no milho, foi possível verificar vários destes com localização próxima aos SNP relatados neste trabalho (Tabela 5). No cromossomo 3, alguns marcadores são associados com resistência a manchas foliares, entretanto, a maior parte destes citados estão associados a viroses, principalmente no bin 3.04. Marcadores relacionados com resistência a podridão do

colmo e da espida por *Fusarium* estão presentes no cromossomo 4, enquanto no cromossomo 9, a maioria está associada com resistência a doenças de manchas foliares. No cromossomo 10, foram relatados marcadores para ferrugem polissora, além de mancha de *bipolaris* e murcha bacteriana *stewart's*. Com relação à antracnose foliar, apenas os marcadores localizados em 3.05 e 10.03 foram mais próximos dos SNP deste estudo. Embora esses trabalhos tenham utilizado populações com constituições genéticas distintas, é possível observar marcadores moleculares associados com resistência a diferentes doenças nas mesmas posições cromossômicas do milho.

O uso de marcadores moleculares do tipo SNP foi de grande importância, sendo o primeiro relato com estudos para resistência a antracnose do colmo no Brasil. Esse marcador possui características de grande vantagem como o baixo custo, é altamente abundante no genoma, codominante, análises com alto rendimento, baixa taxa de erro durante a genotipagem e com resultado mais acurado, podendo ser aplicado em estudos de diversidade genética, mapeamento de ligação e de QTL, além do melhoramento assistido por marcador (Mammadov *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Semagn *et al.*, 2012). Com isso, marcadores SNP também têm sido utilizados em estudos visando resistência a doenças no milho (Kump *et al.*, 2011; Poland *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012, Weng *et al.*, 2012; Inghelandt *et al.*, 2012).

Embora marcadores SNP associados com resistência a antracnose do colmo tenham sido identificados no presente trabalho, pesquisas futuras devem ser realizadas visando a parte de validação dos marcadores. Por isso, sugere-se a realização de outros estudos para o melhor entendimento da base genética da resistência a antracnose do colmo, o que poderá auxiliar na seleção assistida. Por exemplo, se poucos locos de grande efeito estiverem associados com resistência à antracnose, esses podem ser validados em outros *backgrounds* genéticos, podendo ser introgrididos via retrocruzamentos assistidos. No entanto, se a base genética for mais complexa, com muitos marcadores de pequeno efeito identificados associados à resistência, o uso da seleção genômica possa ser mais adequado para o emprego de marcadores moleculares para a seleção assistida em programas de melhoramento.

O desenvolvimento de populações como linhagens endogâmicas recombinantes (RILs) e linhagens quase isogênicas (NILs) também podem ser de grande interesse para o mapeamento e detecção de QTLs com estabilidade e largo efeito de resistência à antracnose do colmo. Esses dois tipos de população (RILs e NILs) são amplamente usadas em estudos com doenças de milho, visando o mapeamento e caracterização de QTL (Broglie *et al.*, 2006;

Chung *et al.*, 2010a; Chung *et al.*, 2010b; Poland *et al.*, 2011; Kump *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Luan *et al.*, 2012; Bonamico *et al.*, 2012).

Portanto, estudos futuros devem ser realizados para validação desses marcadores SNP, verificando o potencial na utilização em seleção assistida em programas de melhoramento de milho.

Tabela 2: Valores genotípicos preditos (u+g) e médias fenotípicas para severidade da antracnose do colmo avaliada nas progêneses F_{2:3} e no híbrido em casa-de-vegetação.

Classificação	u+g	Fenótipo
1	84,40	84,87
2	84,40	84,87
3	79,37	79,74
4	77,82	78,18
5	76,24	77,13
6	75,56	75,94
7	75,56	75,94
8	75,56	75,94
9	74,73	75,05
10	73,18	73,49
11	71,63	71,93
12	68,38	68,80
13	68,28	68,80
14	66,99	67,24
15	65,92	66,30
16	65,92	66,30
17	65,44	65,68
18	62,28	62,55
19	61,76	62,55
20	60,22	60,47
21	16,66	16,29
22	15,90	15,66
23*	14,34	14,09
24	14,34	14,09
25	12,88	12,53
26	12,79	12,53
27	11,24	10,96
28	11,24	10,96
29	11,24	10,96
30	10,81	10,43
31	10,17	9,84
32	10,17	9,84
33	9,68	9,39
34	9,24	8,76
35	8,40	8,04
36	8,13	7,82
37	6,77	6,25
38	6,68	6,25
39	6,68	6,25
40	6,68	6,25
Acurácia	0,98	

* híbrido autofecundado.

Resistência à Antracnose do Colmo

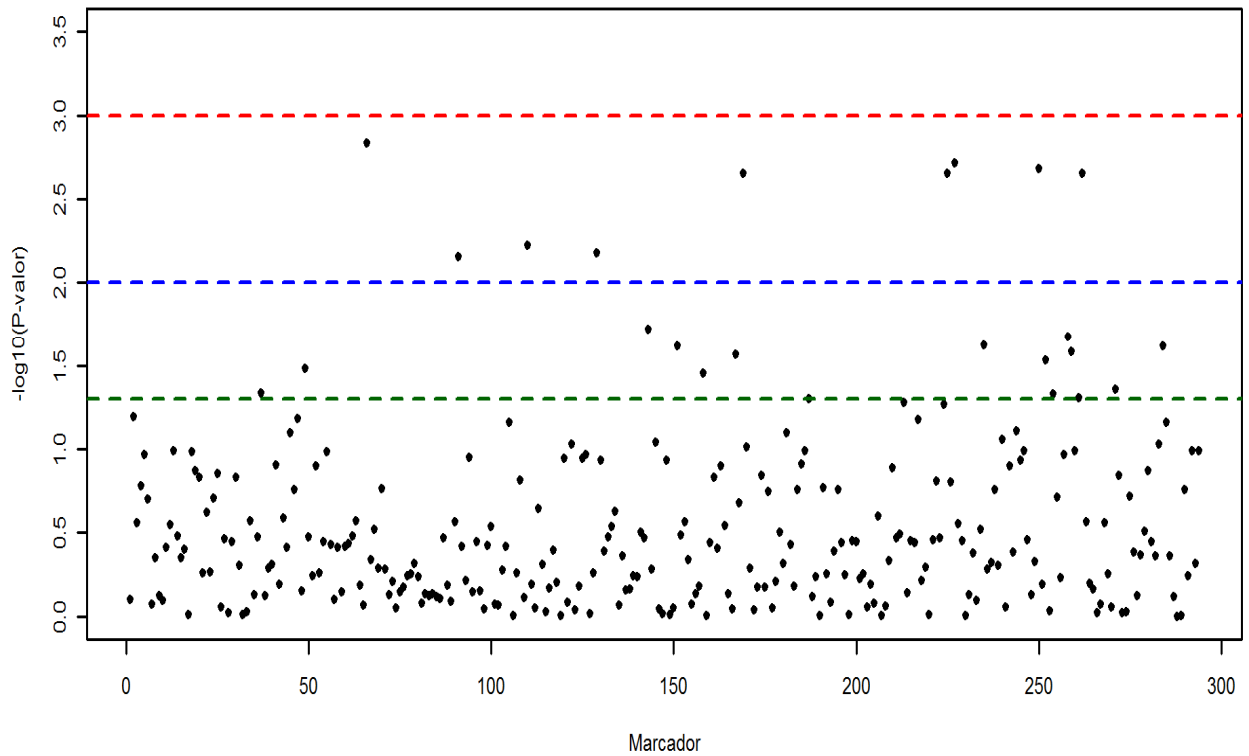


Figura 2: Marcadores SNP com efeito genético aditivo associados com resistência a antracnose do colmo. Linhas tracejadas verde, azul e vermelho representam 5%, 1% e 0,1% de significância, respectivamente.

Resistência à Antracnose do Colmo

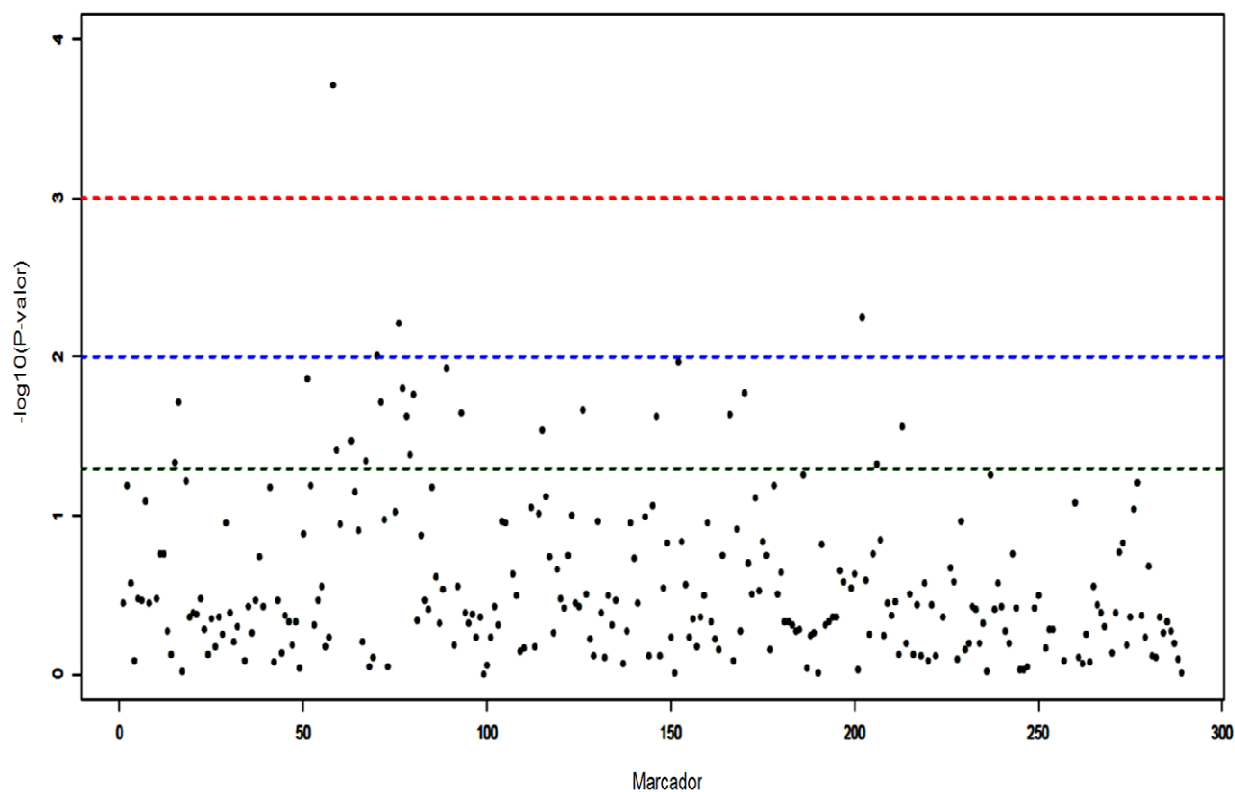


Figura 3: Marcadores SNP com efeito genético de dominância associados com resistência a antracnose do colmo. Linhas tracejadas verde, azul e vermelho representam 5%, 1% e 0,1% de significância, respectivamente.

Tabela 3: Marcadores SNP com efeito genético aditivo associados com resistência à antracnose do colmo em milho e variação fenotípica explicada pelo marcador (R^2).

Marcador	Cromossomo-bin	Posição física (pb)	SNP	Efeito estimado	p-valor	R^2	Alelo com efeito*
PZA02098_2	3.02	8.109.842	A/G	-24.97	0.00193**	0.21	A
PZA00508_2	3.03	11.895.613	A/G	-24.72	0.00208**	0.22	A
PHM4145_18	3.04	21.098.404	A/G	-26.14	0.00598**	0.18	A
PHM2343_25	3.04	27.981.649	A/G	-27.69	0.00224**	0.20	A
PZA00210_1	3.04	29.693.561	A/G	-27.69	0.00224**	0.20	A
PZA03070_9	3.04	43.868.043	A/C	-27.69	0.00224**	0.20	C
PZA02742_1	3.04	97.441.783	C/G	-25.64	0.00702**	0.18	C
PZA02221_20	10.01	1.948.030	A/G	19.96	0.00146**	0.23	G

* alelo com efeito contribuinte para redução da antracnose do colmo; ** significativo a $P < 0,01$

Tabela 4: Marcadores SNP com efeito genético de dominância associados a resistência à antracnose do colmo em milho e variação fenotípica explicada pelo marcador (R^2).

Marcador	Cromossomo-bin	Posição física (pb)	SNP	Efeito estimado ^a	p-valor	R^2
bt2_7	4.05	66.290.994	A/G	-30.65	0.00623**	0.21
PHM5181_1	9.02	15.582.065	A/G	26.26	0.00977**	0.18
PHM9374_5	9.02	17.653.676	A/G	38.09	0.000194***	0.35
wx1_1	9.03	23.215.033	C/G	30.31	0.00566**	0.19

^a sinal positivo dos valores estimados indicam que os heterozigotos são mais suscetíveis que as respectivas médias dos dois homozigotos e o sinal negativo indica que os heterozigotos são mais resistentes que as respectivas médias dos dois homozigotos. ** significativo a $P < 0,01$; *** significativo a $P < 0,001$

Tabela 5: Localização de marcadores moleculares associados com resistência à antracnose do colmo e outras doenças do milho.

Cromossomo.bin	Doença*	Referência
1.02	Antracnose do colmo	Matiello, 2004
2.04	Antracnose foliar	Rezende, 2004
2.06	Antracnose foliar	Rezende, 2004
<u>3.02</u>	<u>Antracnose do colmo</u>	<u>Neste estudo, 2013</u>
3.02	Mancha de Bipolaris	Kump <i>et al.</i> , 2011
3.02	Queima da bainha por Rhizoctonia	Zhao <i>et al.</i> , 2006
3.02	MSV	Pernet <i>et al.</i> , 1999a; Pernet <i>et al.</i> , 1999b
3.02	MMV	Ming <i>et al.</i> , 1997
<u>3.03</u>	<u>Antracnose do colmo</u>	<u>Neste estudo, 2013</u>
3.03	Mancha de Bipolaris	Carson <i>et al.</i> , 2004
3.03	Helminthosporiose	Welz <i>et al.</i> , 1999
3.03	MSV	Pernet <i>et al.</i> , 1999b
3.03	MMV	Ming <i>et al.</i> , 1997
<u>3.04</u>	<u>Antracnose do colmo</u>	<u>Neste estudo, 2013</u>
3.04	Podridão Espiga por Fusarium	Xiang <i>et al.</i> , 2012
3.04	Mancha de Bipolaris	Kump <i>et al.</i> , 2011; Balint-Kurti <i>et al.</i> , 2006; Carson <i>et al.</i> , 2004
3.04	SCMV	Souza <i>et al.</i> , 2008; Wu <i>et al.</i> , 2007; Duple <i>et al.</i> , 2000; Xu <i>et al.</i> , 1999
3.04	MCDV	Jones <i>et al.</i> , 2004
3.04	Ferrugem comum	Brown <i>et al.</i> , 2001; Sanz-Alferez <i>et al.</i> , 1995
3.04	Cercosporiose	Lehmensiek <i>et al.</i> , 2001
3.04	MMV	Ming <i>et al.</i> , 1997; Ming <i>et al.</i> , 1995
3.04	WSMV	McMullen <i>et al.</i> , 1994
3.05	Antracnose do colmo	Chung <i>et al.</i> , 2011
3.05	Antracnose foliar	Rezende, 2004
3.07	Antracnose foliar	Rezende, 2004
<u>4.05</u>	<u>Antracnose do colmo</u>	<u>Neste estudo, 2013</u>
4.05	Podridão Espiga por Fusarium	Chen <i>et al.</i> , 2012
4.05	Podridão Colmo por Fusarium	Pè <i>et al.</i> , 1993
4.05	Queima da bainha por Rhizoctonia	Zhao <i>et al.</i> , 2006
4.05	Ferrugem comum	Brown <i>et al.</i> , 2001
4.07	Antracnose do colmo	Brogliè <i>et al.</i> , 2006; Jung <i>et al.</i> , 1994
4.10	Antracnose do colmo	Matiello, 2004
5.05	Antracnose do colmo	Matiello, 2004
5.06	Antracnose do colmo	Chung <i>et al.</i> , 2011
6.01	Antracnose do colmo	Matiello, 2004
6.05	Antracnose do colmo	Chung <i>et al.</i> , 2011
7.02	Antracnose do colmo	Matiello, 2004
8.04	Antracnose do colmo	Matiello, 2004
<u>9.02</u>	<u>Antracnose do colmo</u>	<u>Neste estudo, 2013</u>
9.02	Helminthosporiose	Poland <i>et al.</i> , 2011; Welz <i>et al.</i> , 1999

9.02	Mancha de Bipolaris	Kump <i>et al.</i> , 2011
<u>9.03</u>	<u>Antracnose do colmo</u>	<u>Neste estudo, 2013</u>
9.03	Helmintosporiose	Inghelandt <i>et al.</i> , 2012
9.03	Mancha de Bipolaris	Balint-Kurti <i>et al.</i> , 2006
9.03	Antracnose do colmo	Matiello, 2004
<u>10.01</u>	<u>Antracnose do colmo</u>	<u>Neste estudo, 2013</u>
10.01	Mancha de Bipolaris	Kump <i>et al.</i> , 2011
10.01	Ferrugem Polissora	Zhao <i>et al.</i> , 2013; Jines <i>et al.</i> , 2007; Chen <i>et al.</i> , 2004
10.01	Murcha bacteriana Stewart's	Brown <i>et al.</i> , 2001
10.03	Antracnose foliar	Rezende, 2004

* Sugarcane mosaic virus (SCMV); Maize streak virus (MSV); Maize mosaic virus (MMV); Maize chlorotic dwarf virus (MCDV); Wheat streak mosaic virus (WSMV).

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Embrapa Milho e Sorgo por auxiliar no apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- Badu-Apraku B, Gracen VE, Bergstrom GC, 1987a. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot and leaf blight in a maize inbred derived from a temperate by tropical germplasm combination. *Maydica* **32**, 221-237.
- Badu-Apraku B, Gracen VE, Bergstrom GC, 1987b. A major gene for resistance to anthracnose stalk rot in maize. *Phytopathology* **77**, 957-959.
- Balint-Kurti PJ, Krakowsky MD, Jines MP, Robertson LA, Molnár TL, Goodman MM, Holland JB, 2006. Identification of quantitative trait loci for resistance to southern leaf blight and days to anthesis in a maize recombinant inbred line population. *Phytopathology* **96**,1067-1071.
- Bergstrom GC, Nicholson RL, 1999. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Phytopathology* **83**, 596-608.
- Bonamico NC, Di Renzo MA, Ibañez MA, Borghi ML, Díaz DG, Salerno JC, Balzarini MG, 2012. QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *Journal of Agricultural Science* **150**, 619-629.
- Broglie KE, Butler KH, Butruille MG, da Silva Conceicao A, Frey TJ, Hawk JA, Jaqueth JS, Jones ES, Multani DS, Wolters PJCC, E.I. du Pont de Nemours and Company, Pioneer Hi-Bred International, Inc., University of Delaware United States (2006) Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. United States Patent 20060223102
- Brown AF, Juvik JA, Pataky JK, 2001. Quantitative trait loci in sweet corn associated with partial resistance to Stewart's wilt, northern corn leaf blight, and common rust. *Phytopathology* **91**, 293-300.
- Carson ML, Hooker AL, 1981. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **71**, 1190-1196.

Carson ML, Stuber CW, Senior ML, 2004. Identification and mapping of quantitative trait loci conditioning resistance to southern leaf blight of maize caused by *Cochliobolus heterostrophus* race O. *Phytopathology* **94**, 862-867.

Chen CX, Wang ZL, Yang DE, Ye CJ, Zhao YB, Jin DM, Weng ML, Wang B, 2004. Molecular tagging and genetic mapping of the disease resistance gene *RppQ* to southern corn rust. *Theoretical and Applied Genetics* **108**, 945-950.

Chen J, Ding J, Li H, Li Z, Sun X, Li J, Wang R, Dai X, Dong H, Song W, Chen W, Xia Z, Wu J, 2012. Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to Fusarium ear rot in maize. *Molecular Breeding* **30**, 1649-1656.

Christensen JJ, Wilcoxson RD, 1966. Stalk rot of corn. St. Paul: American Phytopathological, 59 p. (American Phytopathological Society. Monograph, 3).

Chung CL, Jamann T, Longfellow J, Nelson R, 2010a. Characterization and fine-mapping of a resistance locus for northern leaf blight in maize bin 8.06. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 205-227.

Chung CL, Longfellow J M, Walsh EK, Kerdieh Z, Esbroeck GV, Balint-Kurti P, Nelson RJ, 2010b. Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize – *Setosphaeria turcica* pathosystem. *BMC Plant Biology* **10**, 103-128.

Chung CL, Poland J, Kump K, Benson J, Longfellow J, Walsh E, Balint-Kurti P, Nelson R, 2011. Targeted discovery of quantitative trait loci for resistance to northern leaf blight and other diseases of maize. *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 307-326.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2013) Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, julho 2013/Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, CONAB.

Costa RV, Silva DD, Cota LV, Parreira DF, Ferreira AS, Casela CR, 2010a. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. *Summa Phytopathologica* **36**, 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* **160**, 680-684.

Duble CM, Melchinger AE, Kuntze L, Stork A, Lubberstedt T, 2000. Molecular mapping and gene action of *Scm1* and *Scm2*, two major QTL contributing to SCMV resistance in maize. *Plant Breeding* **119**, 299-303.

Frey TJ, Weldekidan T, Colbert T, Wolters PJCC, Hawk JA, 2011. Fitness evaluation of *Rcg1*, a locus that confers resistance to *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. Using near-isogenic maize hybrids. *Crop Science* **51**, 1551-1563.

Hao Z, Li X, Xie C, Weng J, Li M, Zhang D, Liang X, Liu L, Liu S, Zhang S, 2011. Identification of functional genetic variations underlying drought tolerance in maize using SNP markers. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**, 641-652.

Inghelandt DV, Melchinger AE, Martinant JP, Stich B, 2012. Genome-wide association mapping of flowering time and northern corn leaf blight (*Setosphaeria turcica*) resistance in a vast commercial maize germplasm set. *BMC Plant Biology* **12**, 56-70.

Jines MP, Balint-Kurti P, Robertson-Hoyt LA, Molnar T, Holland JB, Goodman MM, 2007. Mapping resistance to Southern rust in a tropical by temperate maize recombinant inbred topcross population. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 659-667.

Jones MW, Redinbaugh MG, Anderson RJ, Louie R, 2004. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to maize chlorotic dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics* **110**, 48-57.

- Jung M, Weldekidan T, Schaff D, Paterson A, Tingey S, Hawk J, 1994. Generation-means analysis and quantitative trait locus mapping of anthracnose stalk rot genes in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **89**, 413-418.
- Jirak-Peterson JC, Esker PD, 2011. Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. *Plant Disease* **95**, 601-610.
- 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.
- Keller NP, Bergstrom GC, 1988. Developmental predisposition of maize to anthracnose stalk rot. *Plant Disease* **72**, 977-980.
- Kump K, Bradbury P, Wissner R, Buckler E, Belcher AR, Oropeza-Rosas MA, Zwonitzer JC, Kresovich S, McMullen MD, Ware D, Balint-Kurti PJ, Holland JB, 2011. Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population. *Nature Genetics* **43**, 163-169.
- Lana UGP, Gomes PC, Tinoco CFS, Oliveira BCFS, Guimarães CT, Magalhães JV, 2010. Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 19 p. (Circular técnica, 104).
- Lehmensiek A, Esterhuizen AM, van Staden D, Nelson SW, Retief AE, 2001. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 797-803.
- Lim SM, White DG, 1978. Estimates of heterosis and combining ability for resistance of maize to *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **68**, 1336-1342.
- Lu Y, Xu J, Yuan Z, Hao Z, Xie C, Li X, Shah T, Lan H, Zhang S, Rong T, Xu Y, 2012. Comparative LD mapping using single SNPs and haplotypes identifies QTL for plant height

and biomass as secondary traits of drought tolerance in maize. *Molecular Breeding* **30**, 407-418.

Luan J, Wang F, Li Y, Zhang B, Zhang J, 2012. Mapping quantitative trait loci conferring resistance to rice black-streaked virus in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **125**, 781-791.

Matiello RR, 2004. Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativas de danos na produção. Tese de Doutorado, Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ, Piracicaba-SP.

Matiello RR, Brunelli KR, Lopes MTG, Morello RMSC, Silva HP, Camargo LEA, 2012. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot (*Colletotrichum graminicola*) in tropical maize inbred lines. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **12**, 179-184.

Mammadov JA, Chen W, Ren R, Pai R, Marchione W, Yalçin F, Witsenboer H, Greene TW, Thompson SA, Kumpatla SP, 2010. Development of highly polymorphic SNP markers from the complexity reduced portion of maize (*Zea mays* L.) genome for use in marker-assisted breeding. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 577-588.

McMullen MD, Jones MW, Simcox KD, Louie R, 1994. Three genetic loci control resistance to wheat streak mosaic virus in the maize inbred Pa405. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 708-712.

Ming R, McMullen MD, Brewbaker JL, Pratt RC, Moon HG, Musket T, Kyetere DT, 1995. RFLP mapping of maize mosaic virus resistance gene. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* **69**, 60-61.

Ming R, Brewbaker JL, Pratt RC, Musket TA, McMullen MD, 1997. Molecular mapping of a major gene conferring resistance to maize mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 271-275.

Nelson BK, Kahler AL, Kahler JL, Mikel MA, Thompson SA, Ferriss RS, Smith S, Jones ES, 2011. Evaluation of the numbers of single nucleotide polymorphisms required to measure genetic distance in maize (*Zea mays* L.). *Crop Science* **51**, 1470-1480.

Oestreich, D. 2005. Biotechnology: Where is it coming from and where is it going. Proc. 60th Annual Corn and Sorghum Res. Conf. American Seed Trade Association, Washington, DC.

Palaversic B, Jukic M, Buhinicek I, Vragolovic A, Kozic Z, 2009. Breeding maize for resistance to stalk anthracnose. *Maydica* **54**, 229-232.

Pernet A, Hoisington D, Dintinger J, Jewell D, Jiang C, Khairallah M, Letourmy P, Marchand JL, Glaszmann JC, González de León D, 1999a. Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. II. Resistance in line CIRAD390 and stability across germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 540-553.

Pernet A, Hoisington D, Franco J, Isnard M, Jewell D, Jiang C, Marchand JL, Reynaud B, Glaszmann JC, González de León D, 1999b. Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. I. Resistance in line D211 and stability against different virus clones. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 524-539.

Pè ME, Gianfranceschi L, Taramino G, Tarchini R, Angelini P, Dani M, Binelli G, 1993. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Gibberella zeae* infection in maize. *Mol Gen Genet* **241**, 11-16.

Poland JA, Bradbury PJ, Buckler ES, Nelson RJ, 2011. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. *PNAS* **108**, 6893-6898.

R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org>.

Rezende VF, 2004. Análise genética da resistência à antracnose foliar em milho. Tese de Doutorado, Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ, Piracicaba-SP.

Resende MDV, 2004. Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo. Colombo: Embrapa Florestas, 65 p. (Documentos, 100).

Resende MDV, 2006. O software Selegen-Reml/Blup: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: Embrapa Florestas, 305 p.

Resende MDV, 2007. Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético. Colombo: Embrapa Florestas, 362 p.

Sanz-Alferez S, Richter TE, Hulbert SH, Bennetzen JL, 1995. The *Rp3* disease resistance gene of maize: Mapping and characterization of introgressed alleles. *Theoretical and Applied Genetics* **91**, 25-32.

Semagn K, Magorokosho C, Vivek BS, Makumbi D, Beyene Y, Mugo S, Prasanna B, Warburton ML, 2012. Molecular characterization of diverse CIMMYT maize inbred lines from eastern and southern Africa using single nucleotide polymorphic markers. *BioMed Central (BMC) Genomics* **13**, 113-124.

Shi LY, Hao ZF, Weng JF, Xie CX, Liu CL, Zhang DG, Li MS, Bai L, Li XH, Zhang SH, 2012. Identification of a major quantitative trait locus for resistance to maize rough dwarf virus in a Chinese maize inbred line X178 using a linkage map based on 514 gene-derived single nucleotide polymorphisms. *Molecular Breeding* **30**, 615-625.

Souza IRP, Schuelter AR, Guimarães CT, Schuster I, Oliveira E, Redinbaugh M, 2008. Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. *Hereditas* **145**, 167-173.

Toman Júnior J, White DG, 1993. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot of corn. *Phytopathology* **83**, 981-986.

Venard C, Vaillancourt L, 2007. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. *Phytopathology* **97**, 438-447.

Xiang K, Reid LM, Zhang ZM, Zhu XY, Pan GT, 2012. Characterization of correlation between grain moisture and ear rot resistance in maize by QTL meta-analysis. *Euphytica* **183**, 185-195.

Xu ML, Melchinger AE, Xia XC, Lübberstedt T, 1999. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers. *Mol Gen Genet* **261**, 574-581.

Zhao P, Zhang G, Wu X, Li N, Shi D, Zhang D, Ji C, Xu M, Wang S, 2013. Fine mapping of *RppP25*, a southern rust resistance gene in maize. *Journal of Integrative Plant Biology* **55**, 462-472.

Zhao M, Zhang Z, Zhang S, Li W, Jeffers DP, Rong T, Pan G, 2006. Quantitative trait loci for resistance to banded leaf and sheath blight in maize. *Crop Science* **46**, 1039-1045.

Weldekidan T and Hawk JA, 1993. Inheritance of anthracnose stalk rot resistance in maize. *Maydica* **38**, 189-192.

Welz HG, Xia XC, Bassetti P, Melchinger AE, Lübberstedt T, 1999. QTLs for resistance to *Setosphaeria turcica* in an early maturing Dent x Flint maize population. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 649-655.

Weng J, Liu X, Wang Z, Wang J, Zhang L, Hao Z, Xie C, Li M, Zhang D, Bai L, Liu C, Zhang S, Li X, 2012. Molecular mapping of the major resistance quantitative trait locus *qHS2.09* with simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism markers in maize. *Phytopathology* **102**, 692-699.

Wisser RJ, Balint-Kurti PJ, Nelson RJ, 2006. The genetic architecture of disease resistance in maize: A synthesis of published studies. *Phytopathology* **96**, 120-129.

Wiser RJ, Murray SC, Kolkman JM, Ceballos H, Nelson RJ, 2008. Selection Mapping of Loci for Quantitative Disease Resistance in a Diverse Maize Population. *Genetics* **180**, 583-599.

Wu JY, Ding JQ, Du YX, Xu YB, Zhang XC, 2007. Genetic analysis and molecular mapping of two dominant complementary genes determining resistance to sugarcane mosaic virus in maize. *Euphytica* **156**, 355-364.

Yan J, Yang X, Shah T, Sánchez-Villeda H, Li J, Warburton M, Zhou Y, Crouch JH, Xu Y, 2010. High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. *Molecular Breeding* **25**, 441-451.

CAPÍTULO 3

Correlação entre antracnose do colmo e antracnose foliar em milho

RESUMO

A antracnose é considerada uma das doenças mais importantes na cultura do milho, ocorrendo com maior importância nas folhas e no colmo. A principal medida de controle dessa doença é o uso de genótipos resistentes, entretanto, a reação das plantas pode ser diferente quando a infecção ocorre nas folhas ou colmo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação desses dois órgãos do milho a isolados de *Colletotrichum graminicola*, visando analisar a correlação entre a severidade da doença nos mesmos. Em casa-de-vegetação, foram conduzidos cinco experimentos para avaliar a antracnose foliar e cinco para antracnose do colmo. Na folha, a inoculação foi realizada por meio de pulverização das plantas aos 15 dias após o plantio e as avaliações 15 dias depois. Os colmos foram inoculados na fase de pré-pendoamento e avaliados 30 dias após inoculados. Outro experimento foi realizado para avaliar a antracnose nos híbridos 2B710 e 2B707 inoculados com dez isolados previamente selecionados. A correlação entre a severidade da antracnose foliar e do colmo foi significativamente positiva no híbrido BRS 1010 ($r = 0,80$) e P3862 ($r = 0,76$), entretanto, nos híbridos 2B710, 2B707 e P30F35 a correlação foi não significativa. O uso de vários isolados foi importante devido ao maior número de dados para comparações e os resultados indicam que para os genótipos mais resistentes não houve correlação quanto à resposta ao patógeno em folhas e colmo, evidenciando a não existência de relação entre os mecanismos de resistência entre esses dois órgãos. Assim, para adoção de híbridos resistentes a antracnose, é preciso verificar a reação nas folhas e no colmo, e o cruzamento entre materiais resistentes a antracnose foliar e do colmo podem ser considerados. Além disso, é recomendado que estudos de herança da resistência e sobre raças fisiológicas de *C. graminicola* sejam realizados em órgãos separados.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) está entre as culturas mais importantes no cenário da produção agrícola do mundo e o Brasil está entre os maiores produtores, com aproximadamente 70 milhões de toneladas registrada na última safra (Conab, 2013). Os produtos derivados do milho são utilizados principalmente na alimentação humana e na formulação de rações para criação de vários animais como aves, suínos, bovinos e outros (Souza & Braga, 2004; Garcia *et al.*, 2006). No entanto, a presença de doenças representa uma das principais causas que podem levar ao menor rendimento da cultura. Entre essas doenças, a antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. é considerada uma das mais importantes, podendo ocorrer em todas as partes das plantas, mas com maior importância na folha e no colmo (Badu-Apraku *et al.*, 1987a; Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007; Costa *et al.*, 2010a; Jirak-Peterson & Esker, 2011; Cota *et al.*, 2012).

A antracnose foliar é caracterizada por lesões de coloração necróticas com halos amarelos e de formas variadas, podendo causar uma extensa queima foliar e surgir em qualquer época durante desenvolvimento das plantas. Nas nervuras é comum a presença de lesões elípticas com frutificações (acérvulos) do patógeno (Bergstrom & Nicholson, 1999; Casela *et al.*, 2006). Os sintomas da antracnose do colmo são mais visíveis após o florescimento das plantas, mas o processo infeccioso inicia pelos propágulos provenientes das lesões foliares ou daqueles presentes em restos culturais. Na casca, surgem lesões estreitas, longitudinais e com aspecto encharcado, que são inicialmente de coloração pardo-avermelhada e posteriormente tornando-se marrom-escuras a negras. Nos tecidos internos do colmo ocorre uma coloração marrom-escuro, que entra em processo de desintegração, afetando o fluxo de água e nutrientes do colmo para a parte superior, podendo ocasionar morte prematura e acamamento ou quebraimento das plantas (Wheeler *et al.*, 1974; Keller & Bergstrom, 1988; Bergstrom & Nicholson, 1999; Venard & Vaillancourt, 2007).

Para o controle da antracnose, um conjunto de medidas é recomendado como a rotação de culturas, incorporação de resíduos no solo, adubação equilibrada, densidade de plantas adequada e evitar a ocorrência de injúrias como as que podem ocorrer no colmo. No entanto, a principal medida de controle dessa doença é o uso de genótipos de milho com bom nível de resistência genética (Bergstrom & Nicholson, 1999; Casela *et al.*, 2006). Com isso, diversas pesquisas já foram realizadas visando estudar o controle genético e a obtenção de genótipos resistentes a antracnose foliar e do colmo (Poneleit *et al.*, 1972; Carson & Hooker, 1981a, b; Badu-Apraku *et al.*, 1987 a, b, c; Toman & White, 1993; Coêlho *et al.*, 2001; Palaversic *et al.*,

2009; Frey *et al.*, 2011; Matiello *et al.*, 2012). Entretanto, alguns trabalhos tem verificado que a resposta de genótipos de milho à antracnose pode ser diferente quando a infecção pelo *C. graminicola* ocorre nos tecidos das folhas ou do colmo, sugerindo assim uma ocorrência de mecanismos genéticos diferentes controlando resistência a antracnose foliar e do colmo. De acordo com os resultados, a reação de milho à antracnose foliar não é correlacionada com antracnose do colmo (Lim & White, 1978; Zuber *et al.*, 1981; Pereira, 1983; Badu-Apraku *et al.*, 1987a; Barbosa 2001; Chung *et al.*, 2011). No entanto, a maior parte dos estudos foi realizada utilizando apenas um isolado de *C. graminicola*.

Portanto, estudo com vários isolados do patógeno pode torna-se interessante para analisar a reação desses dois órgãos da planta à antracnose, sendo essa informação de grande utilidade em um programa de melhoramento. Não existindo correlação, várias medidas podem ser consideradas, como o cruzamento entre materiais resistentes a antracnose foliar e do colmo, adoção de híbridos com resistência específica para região com maior problema de antracnose foliar ou colmo e, estudos sobre raças de *C. graminicola* em folha e colmo separadamente. No entanto, na presença de um alto coeficiente de correlação positiva, a inoculação poderá ser realizada apenas em folha e com isso, a resposta será mais rápida, economizando tempo e sendo menos trabalhoso em comparação com avaliação da antracnose do colmo.

Considerando esses fatores, este trabalho teve como objetivo estudar a reação da folha e colmo de híbridos a vários isolados de *C. graminicola*, visando evidenciar a existência ou não de relação entre os mecanismos de resistência entre esses dois órgãos das plantas de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos cinco experimentos para avaliar a antracnose foliar e cinco para avaliar a antracnose do colmo em casa-de-vegetação. O delineamento foi inteiramente casualizado, utilizando 20 isolados de *C. graminicola* (Table 1) e uma testemunha, com três repetições (vasos) para cada tratamento. Os genótipos utilizados para inoculação dos isolados foram os híbridos comerciais BRS 1010 (Embrapa), 2B710 (Dow Agrosience), 2B707 (Dow Agrosience), P30F35 (Pioneer) e P3862 (Pioneer).

O inóculo dos isolados foi preparado em condições de laboratório. Para isso, cada isolado foi transferido para placas de Petri contendo o meio de cultura FAA (60 g farinha de

aveia, 18 g de ágar e 1000 ml água deionizada) e mantidos em câmara de crescimento a 28 ± 2 °C sob luz fluorescente contínua. Após cinco dias de crescimento, foi realizada uma raspagem superficial do micélio para induzir a esporulação do fungo. Para a produção do inóculo, o isolado foi novamente repicado para placas contendo meio FAA e realizado o mesmo procedimento de raspagem para a obtenção de placas contendo esporulação suficiente para o preparo do inóculo. Para a inoculação, foi ajustada uma concentração de 10^6 conídios ml^{-1} para cada isolado (Ferreira & Casela, 1986; Costa *et al.*, 2010b; Cota *et al.*, 2010).

Para o estudo da antracnose foliar, foram utilizados vasos de 5 L contendo quatro plantas, e para o ensaio com antracnose do colmo, foram vasos de 20 L com apenas uma planta. Os vasos foram preenchidos com solo utilizado para práticas agrícolas e na adubação de plantio, foi utilizado 10 g por vaso do fertilizante NPK comercial (8:28:16 + 0.4% Zn) e 500 mg do formulado FTE BR 12. Os vasos de 20 L receberam uma outra cobertura aos 40 DAE. Os experimentos foram mantidos na casa-de-vegetação com temperatura controlada de 28 ± 5 °C e com a presença de umidade relativa de 40 ± 10 %. Todos os tratamentos foram irrigados diariamente e receberam aproximadamente a mesma quantidade de água.

Tabela 1: Isolados de *Colletotrichum graminicola* utilizados para inoculação de folhas e colmo dos cinco híbridos de milho.

Isolados	Órgão de origem	Cidade de coleta
61.07	colmo	Sete Lagoas - MG
62.07	colmo	Sete Lagoas - MG
64.07	colmo	Sete Lagoas - MG
84.07	colmo	Sete Lagoas - MG
85.07	colmo	Sete Lagoas - MG
88.07	colmo	Sete Lagoas - MG
91.07	colmo	Chapecó - SC
01.08	colmo	Sete Lagoas - MG
04.08	colmo	Sete Lagoas - MG
06.08	colmo	Sete Lagoas - MG
23.08	folha	Sete Lagoas - MG
25.08	folha	Sete Lagoas - MG
29.08	folha	Sete Lagoas - MG
30.08	folha	Sete Lagoas - MG
35.08	folha	Sete Lagoas - MG
44.08	folha	Sete Lagoas - MG
03.09	folha	Sete Lagoas - MG
19.09	folha	Campo Mourão - PR
22.09	folha	Campo Mourão - PR
47.09	folha	Cascavel - PR

2.1 Inoculação e avaliação da antracnose foliar

A inoculação com os isolados foi realizada por meio de pulverização das plantas até o ponto de escoamento, sendo aos 15 dias após o plantio. Em seguida, as plantas foram mantidas em umidade relativa de 80% durante 15 horas. As avaliações da doença foram realizadas aos 15 dias após a inoculação, com auxílio de uma escala de notas (Ferreira & Casela, 1986) descrita a seguir:

- 1,0 (ausência de sintomas);
- 1,5 a 2,0 (infecção leve, presença de pequeno número de lesões alongadas sem esporulação, com até 10% da área foliar afetada);
- 2,1 a 2,5 (infecção leve a moderada, presença de lesões alongadas sem esporulação ou de reação de hipersensibilidade, com até 11% a 15% da área foliar afetada);
- 2,6 a 3,0 (infecção severa com grande número de lesões esporulantes e com alguma coalescência, de 16% a 20% da área foliar afetada);
- 3,1 a 4,9 (infecção severa com grande número de lesões esporulantes e com alguma coalescência, de 21% a 40% da área foliar afetada);
- 5,0 (Infecção muito severa, com lesões abundantes e coalescidas. Mais de 40% da área foliar afetada).

A avaliação da antracnose foi utilizada para a análise estatística e nos tratamentos onde foram observadas notas médias iguais ou maiores a 3,0, as plantas foram consideradas como suscetíveis, conforme proposto por Ferreira & Casela (1986).

2.2 Inoculação e avaliação da antracnose no colmo

A inoculação com os isolados foi realizada na fase de pré-pendoamento, adotando-se o método do palito imerso na suspensão de esporos. Primeiramente, as folhas inferiores das plantas foram removidas, expondo-se os entrenós da base do colmo e realizada uma desinfestação superficial. Para inoculação, o terceiro entrenó mais desenvolvido das plantas foi perfurado com uso de um furador manual esterilizado e inserido o palito contendo a suspensão de esporos, o qual permaneceu no colmo até o momento das avaliações (Costa *et al.*, 2010b; Cota *et al.*, 2010).

As avaliações foram realizadas aos 30 dias após a inoculação. Primeiramente, os colmos foram cortados longitudinalmente e a severidade da doença foi avaliada utilizando-se

uma escala de notas proposta no primeiro capítulo. Para análise estatística, foram adotados os pontos médios de cada nota (Tabela 2).

Tabela 2 – Escala de nota para avaliação da antracnose do colmo em milho.

Nota	Severidade (%)	Ponto médio (%)
0,5	00,00 - 12,50	6,25
1,0	12,60 - 25,00	18,80
1,5	25,10 - 37,50	31,30
2,0	37,60 - 50,00	43,80
2,5	50,10 - 62,50	56,30
3,0	62,60 - 75,00	68,80
3,5	75,10 - 87,50	81,30
4,0	87,60 - 100,00	93,80

2.3 Análise estatística

Os valores da severidade da antracnose foliar e do colmo avaliadas nos híbridos foram submetidos às pressuposições da ANOVA, em que foram verificados e atendidos quanto à normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett's ao nível de 5% de probabilidade, usando o programa MINITAB versão 14. Posteriormente, foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GENES (Cruz, 2006). Uma análise de correlação de Pearson também foi realizada para avaliar a relação entre as variáveis severidade da antracnose foliar e do colmo.

2.4 Avaliação em 2B710 e 2B707

Após as avaliações da antracnose nos híbridos, foram selecionados dez isolados de *C. graminicola* que causaram severidade com intensidade diferente entre folha e colmo. Para confirmação dos resultados, os dez isolados foram inoculados nas folhas e colmo dos híbridos

2B710 e 2B707, verificando assim a correlação entre as duas variáveis. Os procedimentos para inoculação, avaliação e análises foram os mesmos descritos anteriormente.

3 RESULTADOS

A reação dos híbridos de milho aos 20 isolados de *C. graminicola* pode ser observada na Tabela 3 e a correlação entre a antracnose foliar e do colmo na Tabela 5. Nas folhas do BRS 1010, todos os isolados apresentaram esporulação, obtendo nota superior a 3,0. No colmo, a maioria dos isolados causaram 93,80% de severidade e apenas os isolados 04.08 e 19.09 foram diferentes, apresentando 89,63 e 72,96%, respectivamente. Com isso, foi observado um alto coeficiente de correlação positiva entre a antracnose foliar e do colmo ($r = 0,80$) para o BRS 1010.

No híbrido 2B710, sete isolados causaram nota média igual a 3,0 com esporulação evidente do fungo. Os outros isolados apresentaram infecção leve a moderada, sem esporulação e presença de reação de hipersensibilidade. No colmo, o 2B710 foi resistente a maioria dos isolados, com severidade baixa a moderada e apenas os 44.08, 23.08 e 29.08 causaram severidade acima de 60%. Não foi encontrada correlação da severidade na folha e colmo nesse híbrido. O híbrido 2B707 foi suscetível a doze isolados inoculados na folha, e no colmo a severidade foi em maior parte considerada moderada (30 a 50%), não apresentando correlação entre a reação foliar e do colmo.

Nas folhas do P30F35, mesmo com a diferença estatística entre os isolados, todos causaram uma infecção severa com grande número de lesões esporulantes. A severidade da antracnose no colmo foi considerada de moderada a alta (35 a 73%), mas sem correlação com a antracnose foliar. O híbrido P3862 foi suscetível a todos os isolados inoculados nas folhas, não ocorrendo diferença estatística. Mesmo com diferença entre os isolados, a severidade da antracnose do colmo foi em maior parte considerada alta e a correlação com a severidade na folha foi positiva ($r = 0,76$).

As avaliações da antracnose nos híbridos 2B710 e 2B707 inoculados com os dez isolados selecionados estão presentes na Tabela 4. Os valores da severidade da doença na folha e colmo foram correlacionados com os dados do primeiro experimento para esses isolados, com coeficiente de correlação de 0,87 e 0,94 para folha e colmo no 2B710, respectivamente. No híbrido 2B707, os coeficientes de correlação na folha e no colmo foram

0,83 e 0,95, respectivamente. Assim, conforme observado no primeiro experimento, também não ocorreu correlação entre a antracnose foliar e do colmo nesses dois híbridos (Tabela 5).

4 DISCUSSÃO

As avaliações realizadas em folha e colmo mostraram que os híbridos BRS1010 e P3862 foram os mais suscetíveis a todos os isolados de *C. graminicola*, influenciando em uma correlação positiva entre a severidade da antracnose foliar e do colmo. Em relação ao P30F35, embora os isolados causaram lesões esporulantes na área foliar acima de 20%, no colmo a severidade foi moderada para alguns isolados, como valores entre 35 a 44%. Portanto, esse fato provavelmente está relacionado com a ausência de correlação entre a doença nos dois órgãos inoculados.

Os híbridos 2B710 e 2B707 foram resistentes a certos isolados, principalmente o 2B710. Entretanto, o coeficiente de correlação não foi significativo porque alguns isolados não causaram a mesma intensidade de severidade da antracnose na folha e colmo. Assim, dez isolados foram novamente inoculados, confirmando a ausência de correlação nesses dois híbridos. O 2B710 é considerado um material com bom nível de resistência a antracnose foliar e antracnose do colmo (Gardingo, 2008; Costa *et al.*, 2010b; Cota *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2013), no entanto, pode ser moderadamente suscetível ou mesmo suscetível a alguns isolados de *C. graminicola*, como observado em nossos resultados.

Essa ausência de correlação foi verificada em genótipos mais resistentes a antracnose foliar e do colmo, como nos híbridos 2B710 e 2B707, e mesmo que o P30F35 não apresentou resistência na folha, no colmo foi resistente a alguns isolados. Portanto, a utilização de vários isolados foi de grande importância neste trabalho, pois com um maior número de dados para comparações, o estudo é mais concreto para conclusões. Esses resultados estão de acordo com outras pesquisas realizadas, onde também não foi encontrada correlação entre a antracnose foliar e do colmo (Lim & White, 1978; Zuber *et al.*, 1981; Pereira, 1983; Badu-Apraku *et al.*, 1987a; Barbosa 2001; Jirak-Peterson & Esker, 2011; Chung *et al.*, 2011).

Conforme relatado por Pereira (1983), não foi evidenciada relação entre as reações a *C. graminicola* nas diferentes fases de desenvolvimento do milho, e por considerar que a podridão do colmo é o maior problema durante o ciclo da cultura, o estudo de herança da resistência foi realizado apenas com a antracnose do colmo. Em estudo para detectar regiões genômicas associadas com resistência a várias doenças no milho, a correlação não foi

observada entre resistência a antracnose foliar e do colmo, e nenhum dos QTLs (*quantitative trait loci*) identificados para a fase de colmo apresentaram efeitos para a antracnose na folha (Chung *et al.*, 2011). Além desses, nenhuma associação mais clara foi encontrada entre esses dois órgãos do milho quando foi estudado o efeito de resíduo presente no solo no desenvolvimento da antracnose (Jirak-Peterson & Esker, 2011).

Com o objetivo de estudar o modo de herança da resistência a antracnose, Badu-Apraku *et al.* (1987a) concluíram que o genótipo RD6502 possui dois genes codominantes para resistência a antracnose foliar e uma herança com característica poligênica para a antracnose do colmo, sugerindo que a resistência para essas duas fases são controladas por mecanismos genéticos diferentes. Assim, essa ausência de relação no sistema de defesa pode dificultar no desenvolvimento de híbridos resistentes, devido à diferente resposta da planta quando a antracnose ocorre na folha ou no colmo (Lim & White, 1978; Zuber *et al.*, 1981).

Recentemente, Balmer *et al.* (2013) trabalharam com a resposta de defesa de raiz e folha de milho ao *C. graminicola* e verificaram diferenças significativas na composição de metabólitos secundários, indicando um sistema químico de defesa distinto entre esses órgãos. Além disso, foi observado que a raiz apresenta uma resposta mais rápida ao patógeno e acumula maior nível de hormônios de defesa do que a folha. Portanto, considerando as diferenças relatadas neste patossistema, um estudo como esse envolvendo também o colmo, será de grande interessante para verificar os compostos químicos relacionados com os mecanismos de defesa ao fungo *C. graminicola*.

Nossos resultados indicaram que os genótipos mais resistentes à antracnose não possuem correlação entre a reação de folha com colmo, evidenciando a não existência de relação entre os mecanismos de resistência entre esses dois órgãos do milho. Assim, estudos de herança da resistência devem ser conduzidos em órgãos separados e cruzamentos entre materiais resistentes à antracnose foliar e do colmo podem ser considerados em um programa de melhoramento genético, conforme verificado por Pereira (1983). Além disso, sugere-se que seja primeiramente verificada a reação da folha e colmo para posterior adoção de híbridos considerados resistentes a antracnose e que os possíveis estudos sobre raças fisiológicas de *C. graminicola* sejam realizados em órgãos separados.

Tabela 3: Severidade da antracnose foliar e do colmo em cinco híbridos de milho inoculados com 20 isolados de *Colletotrichum graminicola*.

Isolados	BRS1010		2B710		2B707		P30F35		P3862	
	Folha	Colmo	Folha	Colmo	Folha	Colmo	Folha	Colmo	Folha	Colmo
03.09	4,67* a	93,80* a	1,67* b	10,43* e	2,50* c	18,80* d	3,00* c	43,80* c	3,50* a	77,13* a
88.07	4,50 a	93,80 a	2,83 a	18,80 d	2,83 b	18,80 d	3,33 b	52,13 b	3,17 a	77,13 a
64.07	4,50 a	93,80 a	1,83 b	14,62 d	3,17 b	47,97 b	3,17 b	43,80 c	3,50 a	52,13 c
61.07	4,33 a	93,80 a	2,00 b	27,13 c	2,67 b	31,30 c	3,33 b	47,97 c	3,50 a	52,13 c
22.09	4,33 a	93,80 a	1,83 b	14,62 d	2,17 c	39,63 b	3,00 c	52,13 b	3,33 a	56,30 c
25.08	4,33 a	93,80 a	3,00 a	14,62 d	3,17 b	18,80 d	3,83 a	39,63 c	3,67 a	56,30 c
85.07	3,83 b	93,80 a	3,00 a	31,30 b	2,50 c	35,47 b	3,17 b	39,63 c	3,50 a	68,80 b
62.07	3,83 b	93,80 a	2,00 b	35,47 b	2,17 c	43,80 b	3,00 c	48,13 c	3,50 a	47,97 c
30.08	3,83 b	93,80 a	2,83 a	6,25 e	3,33 b	27,13 c	3,33 b	52,13 b	3,67 a	64,63 b
01.08	3,67 b	93,80 a	3,00 a	6,25 e	3,33 b	22,97 c	3,67 a	39,63 c	3,67 a	72,97 a
84.07	3,67 b	93,80 a	3,00 a	18,80 d	3,17 b	27,13 c	3,00 c	56,30 b	3,83 a	77,13 a
44.08	3,67 b	93,80 a	3,00 a	68,80 a	2,33 c	31,30 c	3,00 c	68,80 a	3,50 a	72,97 a
47.09	3,50 b	93,80 a	2,00 b	6,25 e	3,00 b	22,97 c	3,17 b	72,97 a	3,17 a	64,63 b
04.08	3,33 b	89,63 b	3,00 a	35,47 b	3,00 b	43,80 b	3,83 a	47,97 c	3,00 a	64,63 b
91.07	3,33 b	93,80 a	1,83 b	10,43 e	2,33 c	18,80 d	3,00 c	64,63 a	3,17 a	64,63 b
19.09	3,33 b	72,96 c	2,00 b	18,80 d	3,00 b	43,80 b	3,00 c	64,63 a	3,83 a	64,63 b
35.08	3,33 b	93,80 a	3,00 a	22,97 c	3,83 a	18,80 d	3,67 a	35,47 c	3,83 a	68,80 b
23.08	3,33 b	93,80 a	2,83 a	64,63 a	3,17 b	60,47 a	3,17 b	64,63 a	3,17 a	47,97 c
06.08	3,17 b	93,80 a	2,83 a	10,43 e	3,00 b	22,97 c	3,17 b	35,47 c	3,50 a	81,30 a
29.08	3,17 b	93,80 a	2,83 a	68,80 a	3,17 b	43,80 b	3,83 a	39,63 c	3,33 a	47,97 c
testemunha	1,00 c	6,25 d	1,00 c	6,25 e	1,00 d	6,25 e	1,00 d	6,25 d	1,00 d	6,25 d

* Médias de 3 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Tabela 4: Severidade da antracnose foliar e do colmo nos híbridos 2B710 e 2B707 inoculados com 10 isolados de *Colletotrichum graminicola* selecionados.

Isolados	2B710		2B707	
	Folha	Colmo	Folha	Colmo
35.08	3,33 * a	18,80 * b	3,50 * a	27,13 * c
01.08	3,17 a	14,62 b	3,50 a	31,30 c
25.08	3,17 a	18,80 b	3,50 a	27,13 c
06.08	3,00 a	18,80 b	3,00 b	27,13 c
84.07	3,00 a	22,93 b	3,00 b	35,47 c
29.08	3,00 a	47,97 a	3,50 a	52,13 b
23.08	3,00 a	52,13 a	3,17 b	64,63 a
30.08	3,00 a	14,62 b	3,33 a	31,30 c
62.07	2,83 b	43,80 a	2,83 c	47,97 b
22.09	2,50 c	18,80 b	2,67 c	35,47 c
testemunha	1,00 d	6,25 c	1,00 d	6,25 d

* Médias de 3 repetições seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

Tabela 5: Coeficiente de correlação entre as variáveis severidade da antracnose foliar e do colmo avaliadas nos cinco híbridos.

Variáveis		Coeficiente de correlação (r)				
		BRS1010	2B710	2B707	P30F35	P3862
Severidade (folha)	Severidade (colmo)	0,80*	0,385 ^{ns}	0,225 ^{ns}	0,347 ^{ns}	0,759*
Severidade (folha)**	Severidade (colmo)**		0,338 ^{ns}	0,516 ^{ns}		

* significativo pelo teste t ($P < 0,01$); ^{ns} não significativo pelo teste t ($P < 0,05$); ** severidade relacionada aos 10 isolados selecionados para inoculação de 2B710 e 2B707.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Embrapa Milho e Sorgo pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- Badu-Apraku B, Gracen VE, Bergstrom GC, 1987a. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot and leaf blight in a maize inbred derived from a temperate by tropical germplasm combination. *Maydica* **32**, 221-237.
- Badu-Apraku B, Gracen VE, Bergstrom GC, 1987b. A major gene for resistance to anthracnose stalk rot in maize. *Phytopathology* **77**, 957-959.
- Badu-Apraku B, Gracen VE, Bergstrom GC, 1987c. A major gene for resistance to anthracnose leaf blight in maize. *Plant Breed.* **98**, 194-199.
- Balmer D, Papajewski DV, Planchamp C, Glauser G, Mauch-Mani B, 2013. Induced resistance in maize is based on organ-specific defense responses. *The Plant Journal* **74**, 213-225.
- Barbosa MPM. Variabilidade patogênica de *Colletotrichum graminicola* isolado de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 2001. 112p. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- Bergstrom GC, Nicholson RL, 1999. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Phytopathology* **83**, 596-608.
- Carson ML, Hooker AL, 1981a. Inheritance of resistance to anthracnose leaf blight in five inbred lines of corn. *Phytopathology* **71**, 488-491.
- Carson ML, Hooker AL, 1981b. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **71**, 1190-1196.
- Carvalho DO, Pozza EA, Casela CR, Costa RV, Pozza AAA, Carvalho CO, 2013. Adubação nitrogenada e potássica na severidade da antracnose em dois cultivares de milho. *Rev. Ceres*, **60**, 380-387.

Casela CR, Ferreira AS, Pinto NFJA. Doenças na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 83).

Chung CL, Poland J, Kump K, Benson J, Longfellow J, Walsh E, Balint-Kurti P, Nelson R, 2011. Targeted discovery of quantitative trait loci for resistance to northern leaf blight and other diseases of maize. *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 307-326.

Christensen JJ, Wilcoxson RD, 1966. Stalk rot of corn. St. Paul: American Phytopathological, 59 p. (American Phytopathological Society. Monograph, 3).

Coelho RMS, Silva HP, Brunelli KR, Camargo LEA, 2001. Controle genético da antracnose foliar em milho. *Fitopatologia Brasileira* **26**, 640-643.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2013) Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, julho 2013/Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília, CONAB.

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

Costa RV, Cota LV, Parreira DF, Silva DD, Guimarães PE, Guimarães LJM, Parentoni SN, Pacheco CA, 2010b. Desenvolvimento de metodologia para inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 8 p. (Circular técnica, 139).

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* **160**, 680-684.

Cota LV, Costa RV, Guimarães PE, Guimarães LJM, Parentoni SN, Pacheco CA, Silva DD, Parreira DF, 2010. Métodos de inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 7 p. (Circular técnica, 137).

Cruz CD, 2006. Programa Genes: Estatística Experimental. Viçosa MG. Editora Folha de Viçosa, 382 p.

Ferreira AS, Casela CR, 1986. Raças patogênicas de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Fitopatologia Brasileira* **11**, 83-86.

Frey TJ, Weldekidan T, Colbert T, Wolters PJCC, Hawk JA, 2011. Fitness evaluation of *Rcg1*, a locus that confers resistance to *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. Using near-isogenic maize hybrids. *Crop Science* **51**, 1551-1563.

Garcia JC, Mattoso JM, Duarte JO, Cruz JC. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. Circular Técnica, EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas, MG, n. 74, 2006. 12p.

Gardingo DA. Potencial de resistência de variedades crioulas de milho à infecção artificial por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. Ponta Grossa, 2008. 36p. (OTCC), Universidade Estadual de Ponta Grossa - Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia.

Jirak-Peterson JC, Esker PD, 2011. Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. *Plant Disease* **95**, 601-610.

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

Lim SM, White DG, 1978. Estimates of heterosis and combining ability for resistance of maize to *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **68**, 1336-1342.

Matiello RR, Brunelli KR, Lopes MTG, Morello RMSC, Silva HP, Camargo LEA, 2012. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot (*Colletotrichum graminicola*) in tropical maize inbred lines. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **12**, 179-184.

Palaversic B, Jukic M, Buhinicek I, Vragolovic A, Kozic Z, 2009. Breeding maize for resistance to stalk anthracnose. *Maydica* **54**, 229-232.

Pereira OAP. Herança da resistência à podridão do colmo em milho (*Zea mays* L.) causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. Piracicaba, 1983. 115p. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Poneleit CG, Politis DJ, Wheeler H, 1972. Resistance to corn anthracnose. *Crop Science* **12**, 875-876.

Souza PM, Braga MJ. Aspectos econômicos da produção e comercialização do milho no Brasil. pp.13-53 In: Galvão JCC, Miranda GV (Eds.) Tecnologias de produção do milho. Viçosa: Editora UFV, 2004.

Toman Júnior J, White DG, 1993. Inheritance of resistance to anthracnose stalk rot of corn. *Phytopathology* **83**, 981-986.

Venard C, Vaillancourt L, 2007. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. *Phytopathology* **97**, 438-447.

Zuber MS, Ainsworth TC, Blanco MH, Darrah LL, 1981. Effect of anthracnose leaf blight on stalk rind strength and yield in F₁ single crosses in maize. *Plant Disease* **65**, 719-722.

Wheeler H, Politis DJ, Poneleit CG, 1974. Pathogenicity, host range, and distribution of *Colletotrichum graminicola* on corn. *Phytopathology* **64**, 293-296.

CONCLUSÕES GERAIS

CAPÍTULO 1

- 1) A escala validada neste estudo melhorou a acurácia, precisão e reprodutibilidade das estimativas da severidade da antracnose em colmo do milho.
- 2) O uso dessa escala será uma importante ferramenta para quantificação da antracnose do colmo em vários estudos com esse patossistema, como no melhoramento de plantas visando à resistência, estudos epidemiológicos, e na caracterização de isolados de *C. graminicola*.

CAPÍTULO 2

- 1) Oito marcadores SNP com efeito genético aditivo e quatro com efeito genético de dominância foram detectados associados com resistência a antracnose do colmo.
- 2) Estudos futuros devem ser realizados para validação desses marcadores SNP, verificando o potencial na utilização em seleção assistida em programas de melhoramento de milho.

CAPÍTULO 3

- 1) Genótipos de milho mais resistentes a antracnose não apresentaram correlação entre a reação na folha e colmo ao *C. graminicola*.
- 2) É importante verificar a reação da folha e colmo de milho à antracnose para recomendação de híbridos.
- 3) Sugere-se que os estudos de herança da resistência a antracnose e sobre raças fisiológicas de *C. graminicola* devem ser realizados em órgãos separados.