

AS FERRUGENS (*Puccinia sorghi*, *P. polysora*, *Physopella zae*) DO MILHO (*Zea mays*). III. RAÇAS DA FERRUGEM COMUM (*P. sorghi*) E LINHAGENS DIFERENCIAIS DE MILHO¹

JOACHIM F. W. VON BÜLOW²

Sumário

São descritos métodos de inoculação de urediosporos de *P. sorghi* em plantas de milho e de isolamento monossórico ou monossório. Foram usadas proteção individual de vasos e proteção coletiva em recinto isolado. Das doze amostras colhidas em quatro estados do centro-sul do Brasil foram obtidos 55 isolamentos monossóricos. Dêstes, foram determinadas treze raças com auxílio da série diferencial de milho obtida da Universidade de Wisconsin (USA). As linhagens desta série não foi possível reproduzir nas condições fotoperiódicas locais mas foram obtidas noventa espigas de cruzamentos feitos com 16 linhagens do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro Sul (IPEACS). Nos testes, a diferencial B-38 nunca mostrou a formação de pústulas enquanto que a GG-208-R foi susceptível à maioria das treze raças, ao contrário dos resultados obtidos nos EUA. Pela descoberta da susceptibilidade ativa de onze linhagens locais do IPEACS, foi estabelecido o início de uma série diferencial adicional.

INTRODUÇÃO

Quem trabalha em microbiologia ou imunologia sabe da grande importância da determinação das raças ou estirpes de micro-organismos, tanto úteis como patogênicos. Em fitotecnia, os trabalhos de controle genético que tentam excluir das nossas plantas cultivadas inimigos desconhecidos pouco ou nenhum sucesso terão se não forem feitas estas determinações. O trabalho do melhorista deve, pois, levar em conta a variabilidade do patógeno, manifesta na sua interação com o hospedeiro e reconhecida pela escala de sintomas e sinais fenotípicos numa série diferencial de linhagens daquele hospedeiro.

Quanto a natureza de *Puccinia sorghi* Schw. poucas referências há na América do Sul (Bülow 1966a). Na Argentina há os estudos de Vallega (1942) mas no Brasil somente existe um breve estudo morfológico comparativo de *P. sorghi* com outras ferrugens de plantas afins (Bülow 1966b).

No presente trabalho queremos apresentar estudos sobre utilização e estabelecimento de séries diferenciais de linhagens de milho, empregando diversos métodos para os isolamentos e as inoculações.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de P. sorghi

Colhemos em seis localidades diferentes 12 amostras, das quais testamos 55 isolamentos monossóricos. Eis o que nos foi possível fazer no tempo e nas instalações disponíveis. Um levantamento de raças completo, exigiria uma coleção enorme de amostras de todos os recantos do Brasil (Silva *et al.* 1954).

Inoculação e Isolamento monossórico e monossório

Foram testados vários métodos de inoculação: 1) a aplicação de suspensão aquosa de urediosporos sobre o limbo foliar do qual se tirou a cerosidade (Mains 1931); 2) colocar um único esporo, tirado com agulha fina ou pêlo de cavalo (Schieber & Dickson 1963) de uma placa branca de porcelana debaixo da binocular, numa gotinha de água no limbo foliar do "seedling". Estes dois métodos implicam na incubação por 24 horas em câmara úmida, são trabalhosos e menos seguros; 3) injeção com fina agulha hipodérmica, entre as folhas ainda em formação e dobradas

¹ Este trabalho foi recebido para publicação em 15 de julho de 1966 e constitui o Boletim Técnico n.º 36 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS). Foi desenvolvido na Seção de Fitotecnia do IPEACS em 1964, com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas.

² Professor Assistente do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 47, Campo Grande, CB. ZC-26.

(Zehner & Humphrey 1929); 4) gotear a suspensão no *copo* apical dos "seedlings". Os dois últimos métodos não necessitam do recurso da câmara úmida e são muito seguros, sendo a aplicação apical mais simples e rápida. Por isso valemo-nos dela para quase tôdas as inoculações. (Fig. 1)

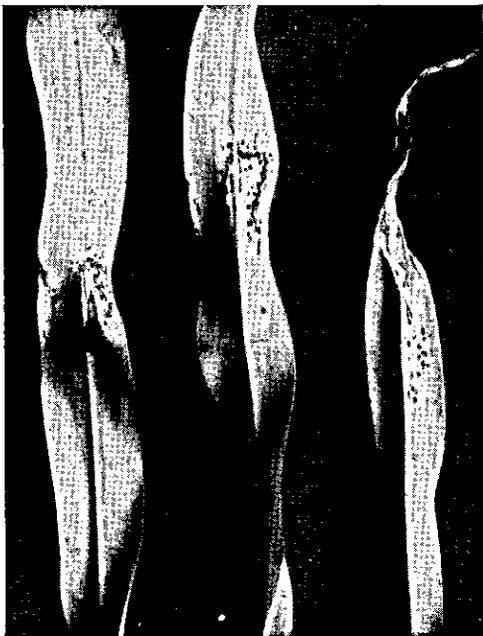


FIG. 1. Agrupamento de pústulas, produzido pela inoculação no "copo" da plântula.

Também aplicamos vários métodos de isolamento: 1) dos isolamentos monospóricos o melhor foi colocar um esporo na água do *copo* do "seedling". Mas pela baixa frequência de pústulas obtidas (7,3% quando o poder germinativo dos esporos era em média de 53%) em grande número de plantas e exigência de se trabalhar com binocular na estufa, não apresentava vantagem (para determinação de raças) sobre o método descrito a seguir; 2) método de isolamento monossórico em série, que requer, a partir da amostra trazida, quatro séries de plântulas para se chegar a cultura monossórica. 3) há um outro método que, executado com cuidado, dará a cultura desejada com duas séries apenas. A primeira série é para se injetar no "seedling" de seis fôlhas uma suspensão rala de urediosporos. Experimentamos concentrações de 1 até 80 esporos por gota-seringa, sendo que com 10-20 tivemos os resultados desejados ou seja garantia da formação de pústulas bem distanciadas umas das outras. Após três dias as fôlhas que apre-

sentarem manchas cloróticas serão destacadas e conservadas em placas de Petri. No 5.º dia as pústulas já podem começar a romper a epiderme, e no 8.º dia pode-se colher os esporos das pústulas solitárias e livres de esporos estranhos, inoculando-os na segunda série de plântulas. Daí parte-se para apenas multiplicar o material de esporos e inoculação nas variedades diferenciais.

Proteção para manutenção das culturas monossóricas

Proteção individual: inicialmente trabalhamos em estufa arejada, protegendo as plantas inoculadas contra o vento e insetos que poderiam contaminar as culturas. Isto foi muito problemático porque tivemos que confeccionar cilindros de celofane em grande número e de apreciável tamanho, pois as plantas crescem rapidamente (Fig. 2). Além disso, um mófo do gênero *Monosporium* se alastra muito e dificulta grandemente a colheita dos esporos.



FIG. 2. Método de proteção não muito adequado para milho.

Recinto isolado: conseguimos depois, um quarto no insetário, não funcional no momento, mas sem movimentos de ar, servindo para ali fazer isolamentos e multiplicar as culturas com mais facilidade.

Linhagens diferenciais

Obtivemos as seis linhagens de susceptibilidade ativa, usadas nos Estados Unidos para diferenciar as raças fisiológicas de *P. sorghi* (Flangas & Dickson 1961, Rhoades & Rhoades 1939):

CG-208 - R - Rp¹ Pop 35 - rp
 B- 38 - Rp² Pop 36 - rp
 K-148 - Rp³
 Cuzco - Rp⁴

Além destes quatro gens dominantes e dois recessivos, Lee *et al.* (1963) ainda citam mais dois gens dominantes, também da mesma série alélica e localizados no braço curto do cromossômio 10 (Rhoades & Rhoades 1939) do milho: Rp⁵ (linhagem B 49) e Rp⁶ (linhagem P.I. 172332).

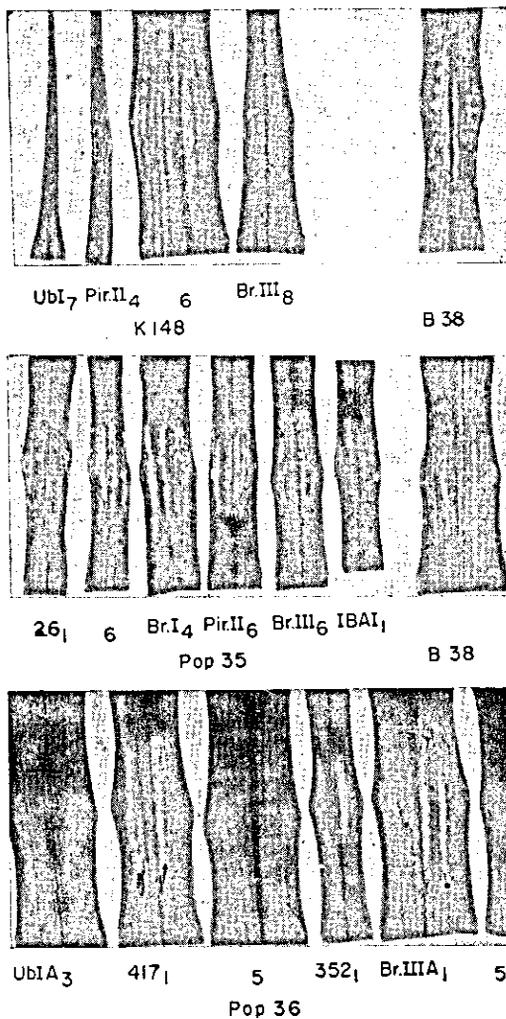
As seis linhagens diferenciais foram semeadas na estufa e oito dias após a emergência fizemos repetidas inoculações com todos os biótipos isolados, de 19 de junho até 17 de julho, fazendo-se as leituras de 10 a 15 dias após cada inoculação. Ao mesmo tempo semeamos também 16 linhagens nossas para serem testadas com alguns dos biótipos de ferrugem. Foram também plantadas no campo para teste de resistência à mistura de todas as raças disponíveis do patógeno.

As seis linhagens diferenciais foram também plantadas no campo no dia 2 de maio, doze dias após o plantio das 25 linhagens do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro Sul (IPEACS) para teste de campo e oito dias após o plantio de nove escolhidas dentro das 25, mais duas linhagens susceptíveis. Caso não conseguíssemos multiplicar as linhagens diferenciais, teríamos farto material para cruzamentos na época precisa da sua floração, prevista para cerca de dez dias antes das nosas, dada a diferença de fotoperiodismo.

RESULTADOS

Determinação de raças com auxílio da série diferencial americana

Achamos certa dificuldade nas leituras, pois além da falta de nitidez e interpretação difícil, às vezes ocorreu pequena variação na expressão fenotípica provocada por dado isolamento monossóricico em plantas da mesma linhagem. Além disso, não pudemos trabalhar em condições ambientais controladas, e por isso houve variação da reação de biótipos em inoculações de épocas repetidas (Pavgi & Dickson, 1961). (Figs. 3 a 5)



FIGS. 3, 4 e 5. Reações obtidas nas diferenciais americanas K 148, Pop 35 e Pop 36. Os biótipos são denominados por origem e número da amostra colhida, por ex. Br I₁ é o biótipo n.º 4 da amostra 1 proveniente de Brasília. Observe-se a incompatibilidade total da linhagem B 38 com qualquer dos biótipos testados.

Um resumo dos biótipos encontrados acha-se no Quadro 1 e das raças no Quadro 2. As diversas raças que ocorrem nas seis localidades de quatro estados, constam na seguinte relação:

Raça n.º	Localidade de procedência
1	Piracicaba (São Paulo).
2	Piracicaba, Km 47 (Rio de Janeiro), Brasília (Goiás), Mafra (Santa Catarina), Uberlândia (Minas Gerais).
3	Belo Horizonte (Minas Gerais).
4	Belo Horizonte.
5	Brasília.
6	Brasília.
7	Brasília, Km 47.
8	Uberlândia, Km 47.

- 9 Uberlândia, Km 47.
 10 Brasília.
 11 Km 47.
 12 Uberlândia, Km 47.
 13 Km 47.

Testes de linhagens do IPEACS

Pudemos testar também 16 linhagens nossas, pois delas tivemos sementes que sobraram do plantio de campo. Os resultados das linhagens que apresentaram alguma reação contra o fungo, acham-se reunidos no Quadro 3. Pelo exame das duas repetições que pudemos fazer, pode-se ver que aqui houve menos dificuldade nas leituras, cujos resultados nas duas repetições coincidem mais ou menos, com raras exceções de maiores discrepâncias. Pode-se comparar o tipo de reação bem definido nestas linhagens, (Figs. 6 e 7) com as reações nas linhagens americanas (Figs. 3 a 5), destas algumas difíceis de se interpretar.

Linhagens diferenciais

Fizemos cruzamentos das seis americanas com linhagens nossas, resistentes e susceptíveis. Obtivemos 90 espigas como resultado deste trabalho.

As linhagens do IPEACS que testamos no teste final de campo foram autofecundadas obtendo-se razoável quantidade de sementes. Pelo Quadro 3, pode-se verificar que há 11 linhagens que apresentam uma susceptibilidade ativa diferencial, podendo algumas serem usadas dentro de uma série diferencial.



FIGS. 6 e 7. Reações dos biótipos Belo Horizonte II₂ (raça 3) (a esquerda) e Piracicaba II₁ (raça 1) em cinco diferentes linhagens locais (do IPEACS); de cima para baixo: linhagem 383/60. Susceptibilidade passiva: (3-4), linhagens seguintes. Susceptibilidade ativa: 400/60 - 1 e 4, 397/59 - 1 e 0, 385/62 - 3 e 0, 709/59 - 2 e 4.

QUADRO 1. Biótipos de *P. Sorghi* e seu agrupamento em raças fisiológicas*

Amostras	Isolamentos monosômicos			Expressões fenotípicas nas linhagens diferenciais					
	Raça	Isolamentos (n.º de ordem)	Frequência	Cuzco	K 148	Pop 35	Pop 36	B 38	GG-208-R
Piracicaba II	1	1, 2, 3	3	1	X	0;	0;	0;	X
	1	4	1	0;	3	0;	0;	0;	X
	2	5, 6	2	1	0;	1	0;	0;	2
Belo Horizonte II	3	2	1	1	2	2	2	0;	2
	4	1, 3	2	2	2	X	2	0;	X
Brasília III	5	1, 2	2	2	2	X	2	0;	1
	6	8	1	0;	2	X	X	0;	1
		3, 4, 6, 9	4	0;	0;	X	2	0;	1
Uberlândia I	8	1, 2	2	2	1	X	1	0;	X
	9	3, 6, 7	3	1	1	3	X	0;	2
IBA I (km 47)	8	1	1	X	0;	2	0;	0;	X
	2	2	1	1	0;	0;	0;	0;	X
Brasília I	2	4	1	1	0;	0;	1	0;	2
	10	1, 2, 3	3	2	0;	0;	X	0;	X
Mafra	2	1, 2	2	1	0;	1	0;	0;	X
		3	1	0;	0;	0;	0;	0;	2
417 (km 47)	1	1	1	2	0;	3	3	0;	3
	11	2, 3, 4, 5	4	1	0;	X	X	0;	1
Uberlândia I A	2	2, 5, 6	3	0;	0;	0;	0;	0;	2
	12	3, 4	2	2	0;	2;	0;	0;	X
Brasília III A	7	1, 7	7	1	0;	3	3	0;	1
352 (km 47)	2	1, 5	2	1	0;	0;	1	0;	3
		2, 3	2	0;	0;	0;	0;	0;	2
26 (km 47)	9	1, 2	2	1	0;	3	X	0;	2
	12	5	1	2	0;	3	1	0;	2
	13	6	1	0;	0;	2	1	0;	3

* Resultado de uma série de inoculações em seedlings das linhagens de susceptibilidade ativa dominante (Cuzco, K 148, B 38 e GG-208-R) e recessiva (Pop 35 e Pop 36). Os 55 isolamentos monosômicos provêm de 12 amostras colhidas em 6 localidades diferentes do Centro e Sul brasileiros (Figs. 3 a 7).

QUADRO 2. Raças fisiológicas de P.Sorghia

Localidade de origem	Raças N.º	Biótipos Frec.	Linhagens diferenciais					
			Cuzco	K 148	Pop 35	Pop 36	Pop 38	GG-208-R
Piracicaba II	1	4	R	S	R	R	R	S
	2	2	R	R	R	R	R	S
B. Horizonte II	3	1	R	S	S	S	R	S
	4	2	S	S	S	S	R	S
Brasília III	5	2	S	S	S	S	R	R
	6	1	R	S	S	S	R	R
	7	4	R	R	S	S	R	R
Uberlândia I	8	2	S	R	S	R	R	S
	9	3	R	R	S	S	R	S
IBA I (km 47)	8	1	S	R	S	R	R	S
	2	1	R	R	R	R	R	S
Brasília I	2	1	R	R	P	R	R	S
	10	3	S	R	R	S	R	S
Mafra	2	3	R	R	R	R	R	S
417 (km 47)	11	1	S	R	S	S	R	S
	7	4	R	R	S	S	R	R
Uberlândia J A	2	3	R	R	R	R	R	S
	12	2	S	R	S	R	R	S
Brasília III A	7	7	R	R	S	S	R	R
352 (km 47)	2	4	R	R	R	R	R	S
26 (km 47)	9	2	R	R	S	S	R	S
	12	1	S	R	S	R	R	S
	13	1	R	R	S	R	R	S

* Agrupamento de frequências dos biótipos determinados, conforme a sua incompatibilidade (resistente, tipos de uredios 0; e 1) ou compatibilidade parcial ou total (susceptível, tipos de uredios, 2, X, 3 e 4) em 13 raças diferentes.

QUADRO 3. Teste inicial para estabelecimento de uma série diferencial

Biótipos da P. sorghi.	Raça n.º	Algumas linhagens do IPEACS (Km 47) que apresentaram susceptibilidade ativa teste de seedlings em duas repetições											
		290/61		373/61		400/60		397/59		108/59		385/62	
		1.ª	2.ª	1.ª	2.ª	1.ª	2.ª	1.ª	2.ª	1.ª	2.ª	1.ª	2.ª
Piracicaba II ₁	1	3	3	0;	2	2	3	0;	0;	—	3	0;	0;
Belo Horizonte II ₂	3	X	3	0;	0;	2	X	1	0;	—	3	3	X
Brasília III	5	2	3	0;	0;	2	2	1	1	X	3	—	3
Uberlândia I ₃	9	2	X	0;	0;	1	1	1	1	X	3	3	3
417 ₁₋₂	11+7	2	—	0;	—	—	—	1	—	X	—	3	—
Brasília I ₂	10	3	—	0;	—	3	—	1	—	X	—	0;	—
Piracicaba II ₁	1	0;	1	X	3	3	3	0;	1	0;	3	X	X
Belo Horizonte II ₂	3	0;	1	2	2	3	3	—	1	X	3	0;	0;
Brasília III ₁	5	0;	1	—	2	3	3	1	2	—	3	—	0;
Uberlândia I ₃	9	1	1	1	X	2	3	1	1	3	X	0;	0;
417 ₁₋₂	11+7	—	—	3	—	3	—	1	—	X	—	0;	—
Brasília I ₂	10	—	—	—	—	1	—	—	—	X	—	0;	—

DISCUSSÃO

Não dispendo de instalações especiais, tivemos que escolher métodos simples que conduziram a uma razoável exatidão de resultados. Examinando as reações provocadas por nossos biótipos de *P. sorghi* na série diferencial desenvolvida nos Estados Unidos, vemos que são difíceis de se interpretar, não havendo a clareza desejável. Além disso a B 38 foi inteiramente incompatível com os biótipos testados e, portanto, foi incapaz de diferenciá-los. Mas este último fato prova que os nossos biótipos na sua grande maioria são diferentes dos testados por Roux e Dickson (1957) pois dentre 15 raças deles quatro eram capazes de formarem pústulas na B 38 e nenhuma na Cuzco. Esta última linhagem foi susceptível a seis das nossas 13 raças achadas. A CG-208-R ofereceu resistência a todas as raças achadas pelos citados autores, com exceção da raça n.º 3, enquanto que dos nossos isolamentos nenhum mostrou incompatibilidade completa com aquela diferencial.

Pelos bons resultados iniciais referentes a diferenciação dos nossos biótipos com auxílio de linhagens adaptadas ao nosso meio, poderemos ter facilmente uma série diferencial adicional que facilitará grandemente o trabalho.

CONCLUSÕES

Os melhores métodos de inoculação para posterior isolamento foram: 1) gotejar a suspensão de urediosporos no *copo* central e 2) injeção da suspensão bem diluída, com seringa.

O método mais prático de isolamento foi o método convencional de isolamento monossóricico em séries.

O melhor método de manutenção das culturas isoladas foi o uso do recinto isolado contra entrada de insetos e correntes de ar.

As linhagens diferenciais da série americana revelaram eficiência sofrível para reconhecimento das raças brasileiras de *P. sorghi*.

Das 13 raças diferenciadas, nas condições ambientais e pelos métodos aplicados nos nossos testes, nenhuma apresenta reação igual das raças achadas pelos investigadores americanos.

Das linhagens de milho do IPEACS, onze revelaram susceptibilidade ativa em testes com vários biótipos de *P. sorghi*, podendo algumas servir dentro de uma série diferencial adicional.

Para o futuro faz-se necessário: 1) levantamento de raças na base de maior número de amos-

tras colhidas em todo Brasil; 2) possibilitar o trabalho de diferenciação de raças em condições ambientais controladas e reguláveis.

AGRADECIMENTOS

Ficamos gratos pela orientação recebida do Eng.º Agrônomo Octávio de Almeida Drummond; pelo apoio recebido do Conselho Nacional de Pesquisas e do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul. Agradecemos aos funcionários que nos ajudaram no laboratório, no campo e na parte de datilografia. Estamos especialmente gratos ao Dr. A. L. Flangas da Universidade de Wisconsin, que nos remeteu as linhagens diferenciais e publicações recentes.

REFERÊNCIAS

- Bülow, J.F.W. von 1966a. As ferrugens (*Puccinia sorghi* Schw., *P. polysora* Underw., *Physopella zaeae* Cummins) do milho (*Zea mays* L.). I. Revisão bibliográfica. *Pesq. agropec. bras.* 1:249-262.
- Bülow, J. F. W. von 1966b. As ferrugens (*Puccinia sorghi* Schw., *P. polysora* Underw., *Physopella zaeae* Cummins) do milho (*Zea mays* L.). II. Estudo comparativo e inimigos naturais. *Pesq. agropec. bras.* 1:289-293.
- Flangas, A.L. & Dickson, J.G. 1961. The genetic control of pathogenicity, serotypes and variability in *P. sorghi*. *Am. J. Bot.* 48 (4):275-285.
- Lee, B.H., Hooker, A.L., Russel, W.A., Dickson, J.G. & Flangas, A. L. 1963. Genetic relationships of alleles on chromosome 10 for resistance to *P. sorghi* in 11 corn lines. *Crop Sci.* 3: 24-26.
- Mains, E.B. 1931. Inheritance of resistance to rust, *P. sorghi*, in maize, *J. agric. Res.* 43: 419-430.
- Pavgi, M. S. & Dickson, J. G. 1961. Influence of environmental factors on development of infection structures of *P. sorghi*. *Phyt.* 51 (4): 224-226.
- Rhoades, M.H. & Rhoades, V.H. 1939. Genetic studies with factors in the tenth chromosome in maize. *Genetics* 24: 302-314.
- Roux, P.M. Le & Dickson, J.G. 1957. Physiology, specialization, and genetics of *P. sorghi* on corn and of *P. purpurea* on sorghum. *Phyt.* 47 (2): 101-107.
- Schieber, E. & Dickson, J.G. 1963. Comparative pathology of three corn rusts. *Phyt.* 53 (5): 517-521.
- Silva, A.R. de, Adroaldo, V. & Rincon, R.P. 1954. Levantamento de raças fisiológicas de *Puccinia graminis triticeae* e *P. rubigovera triticeae* no Brasil. *Rev. "Agros"* n.º 1 e 2.
- Vallega, J. 1942. Observaciones preliminares sobre especialización fisiológica de *P. sorghi* em Argentina. *An. Inst. Fitot. Santa Catalina* 1944: 14-16.
- Zehner, M. G. & Humphrey, H. B. 1929. Smuts and rusts produced in cereals by hypodermic injection of inoculum. *I. agric. Res.* 38 (11): 1-6.

CORN (*Zea mays*) RUSTS (*Puccinia sorghi*, *P. polysora*, *Physopella zae*).
III. RACES OF COMMON RUST (*P. sorghi*) AND DIFFERENTIAL CORN LINES

Abstract

Methods of *P. sorghi* urediospore inoculation in corn seedlings and monospore or monosore isolation methods are outlined. Individual protection of pots and isolated room protection was used. Twelve samples from four states of the Brazilian Center-South yielded 55 monosore isolates. From these, were separated thirteen physiologic races by means of the US-differential series. The author failed to reproduce the series in local photoperiodic conditions, but crosses with sixteen Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul-lines yielded ninety hybrid ears.

During the inoculation test, US-differential line B-38 never permitted any pustule formation, but GG-203-R was susceptible to nearly all 13 races. Thus the author concluded the biotypes tested by him might have a different genetic constitution of those tested in North America.

By finding out active susceptibility in eleven local corn lines the inicial basis for a local additional differential series was established. Reading of reaction types was much easier than on US-differential series (Figs. 3 to 7).