

## ***Phaeocystroma ambiguum*: Novo patógeno associado à podridão do colmo de milho no Brasil**

**Frederick Mendes Aguiar<sup>(1)</sup>; Fabrício Eustáquio Lanza<sup>(1)</sup>; Rodrigo Veras da Costa<sup>(2)</sup>; Dagma Dionísia da Silva<sup>(2)</sup>; Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>(3)</sup>; Elaine Aparecida Guimarães<sup>(4)</sup>; Glaucio Reginaldo Gomes<sup>(5)</sup>; Luciano Viana Cota<sup>(2)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Pós-doutorando em Fitopatologia, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais; frederick.aguiar@colaborador.embrapa.br e briciolanza@gmail.com; <sup>(2)</sup> Pesquisador(a), Embrapa milho e sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais; rodrigo.veras@embrapa.br, dagma.silva@embrapa.br e luciano.cota@embrapa.br; <sup>(3)</sup> Analista, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais; ubiraci.lana@embrapa.br; <sup>(4)</sup> Doutoranda em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais; elaineag@yahoo.com.br; <sup>(5)</sup> Graduando em Engenharia Ambiental, Faculdades Santo Agostinho/ FASASETE, Sete Lagoas, Minas Gerais; glaucio.reginaldo@hotmail.com.

**RESUMO:** A podridão de colmo destaca-se, no cenário mundial, como uma das mais importantes doenças que atacam a cultura do milho por causar reduções na produção e na qualidade de grãos e forragens. Atualmente, no Brasil, os fungos *Colletotrichum graminicola*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides* (Sin. *F. moniliforme*), *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis* são considerados os principais patógenos causadores dessa doença. Porém, nos últimos anos a ocorrência de um novo patógeno associado a essa doença vem sendo relatada em alguns países. Este trabalho teve como objetivo identificar a presença desse patógeno no Brasil. Para isso, amostras com sintomas típicos de podridão do colmo em milho provenientes da região Centro-Oeste do Brasil foram enviadas para a Embrapa Milho e Sorgo para isolamento, identificação e teste de patogenicidade. As colônias obtidas no isolamento apresentaram coloração branca, com conídios de cor marrom clara e tamanho variando de 10-19 µm de comprimento e de 4-6 µm de largura. As sequências de cada isolado foram comparadas com sequências depositadas no NCBI e estas apresentaram identidade de 99% para o fungo *Phaeocystroma ambiguum*. No teste de patogenicidade todos os isolados foram patogênicos aos híbridos avaliados nos dois métodos de inoculação utilizados. Os valores médios da porcentagem (%) de entrenó com sintomas de podridão do colmo, observados nesse trabalho, evidenciam o grande potencial do fungo *P. ambiguum* em causar prejuízos futuros na cultura do milho no Brasil.

**Palavras-chave:** Podridão de colmo, Híbridos, patogenicidade, *Zea mays* L..

### INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) destaca-se por ser um dos cereais mais importantes no mundo devido a seu importante papel na cadeia alimentar humana e animal. Cerca de 70% da produção de milho destina-se a alimentação de animais, principalmente nas cadeias produtivas de aves e suínos (MARCONDES, 2012).

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos (361 milhões de toneladas) e a China (215,6 milhões de toneladas). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, com uma produção de 85 milhões de toneladas na safra de 2015, em uma área plantada de 15,7 milhões de hectares (AGRIANUAL, 2016).

Com uma produtividade média de 5.414 Kg/ha, o Brasil detém os menores índices de produtividade entre os principais produtores de milho. Dentre os inúmeros fatores que levam a essa baixa produtividade, as doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides estão entre as mais importantes (REIS et al., 2004).

A podridão de colmo, por exemplo, destaca-se, no cenário mundial, como uma das mais importantes doenças que atacam a cultura do milho por causar reduções na produção e na qualidade de grãos e forragens (COSTA et al., 2008).

Na cultura do milho, a podridão do colmo pode ocorrer tanto antes da fase de enchimento dos grãos, quanto após a maturação fisiológica deles. Geralmente, a infecção inicia-se pelas raízes,

passando para os entrenós superiores ou diretamente pelo colmo, através de ferimentos. As perdas causadas pela podridão do colmo se devem à morte prematura das plantas com efeitos negativos no tamanho e no peso dos grãos devido à redução na absorção de água e nutrientes, bem como ao tombamento das plantas, o que dificulta a colheita mecânica e expõe as espigas à ação de roedores e ao apodrecimento (COSTA et al., 2008).

Externamente, os sintomas da podridão de colmo em milho apresentam, próximo aos entrenós inferiores, lesões marrom claras, quase negras e, internamente, o tecido da medula adquire coloração marrom escura, podendo-se desintegrar ou não, e, neste caso, somente os vasos lenhosos apresentam-se intactos (COSTA et al., 2008).

No Brasil, a ocorrência da podridão de colmo em milho tem aumentado significativamente nas últimas safras em todas as regiões produtoras. Os fungos *C. graminicola*, *M. phaseolina*, *F. graminearum*, *F. verticillioides* (Sin. *F. moniliforme*), *S. macrospora* e *S. maydis* são considerados os principais patógenos causadores dessa doença. Porém, nos últimos anos a ocorrência de um novo patógeno associado à podridão de colmo em milho, foi relatado na Austrália, França, em países da América do Norte, na Tanzânia, África do Sul e recentemente na Bulgária (BOBEV et al. 2016; FARR; ROSSMAN, 2016).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar a presença do fungo *Phaeocystostroma ambiguum* (Mont.) Petrak, associado à podridão do colmo em milho no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento, Identificação e Patogenicidade

Em julho de 2015, amostras de colmo de milho com sintomas típicos de podridão do colmo foram coletadas de três híbridos (2B512PW, 2B810PW e DKB390PRO), provenientes da região Centro-Oeste do Brasil e levadas para o laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

Para o isolamento dos fungos, fragmentos do colmo foram removidos a partir das margens das lesões, em seguida, esterilizados em hipoclorito de sódio a 0,5%, durante dois minutos e posteriormente transferidos para meio de cultura farinha de aveia-ágar (FAA) com tetraciclina.

Após essa etapa, isolados pré-selecionados foram identificados por meio da caracterização morfológica e molecular. Na caracterização morfológica foram realizadas observações quanto a coloração da colônia e medições dos conídios. Para a caracterização molecular foi realizado o sequenciamento da região ITS (*internal transcribed*

*spacer*) e do gene fator de alongação 1- $\alpha$  (TEF), por meio da técnica de PCR (*Reação da Polimerase em Cadeia*).

Para confirmar a patogenicidade, dois isolados classificados como CFMS 1292 e CFMS 1295, foram inoculados em três híbridos de milho (P3646YH, P30F53YH e DKB390PRO) cultivados em vasos de 14,5 L de solo em casa de vegetação, utilizando-se dois métodos de inoculação. No primeiro método, os palitos foram imersos em suspensão de esporos ( $10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>), e no segundo método, os palitos foram mantidos por sete dias a 25 °C, sob escuro contínuo em placas de Petri contendo meio aveia-ágar com um disco de micélio do fungo, até o micélio recobrir todos os palitos. As plantas de milho foram inoculadas na fase de pré-pendoamento (aproximadamente 40 dias após o plantio), no terceiro entrenó previamente desinfestado com álcool 70%. Três plantas perfuradas apenas com palito estéril foram utilizadas como testemunha. A avaliação foi realizada aos 30 dias após a inoculação. A percentagem (%) do entrenó com sintomas da doença foi obtida por meio da escala diagramática proposta por Nicoli et al. (2015).

Para completar o teste de patogenicidade, o reisolamento do fungo foi realizado nos colmos inoculados e da testemunha.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições por tratamento, sendo cada tratamento constituído de um vaso com 3 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização morfológica e molecular

Inicialmente, as colônias apresentaram crescimento micelial moderadamente rápido, de cor branca, característica semelhante às colônias do gênero *Stenocarpella*. No entanto, após duas semanas de incubação, numerosas estruturas de coloração preta foram observadas, imersas no meio FAA. Estas estruturas foram identificadas como picnídios de formato irregular, inicialmente solitários, multilocular com um a vários pescoços. Os alfa conídios apresentaram coloração marrom claro, liso, elipsoide para piriforme, mais largo no meio do conídio, vértice sem corte arredondado, base truncada, variando de 10-19  $\mu$ m de comprimento e de 4-6  $\mu$ m de largura (n = 50) (Figura 1). Estes valores corroboram os de Sutton (1980), na descrição do fungo *P. ambiguum*.

Após caracterização morfológica, os isolados

recuperados a partir de diferentes plantas e locais foram depositados na coleção de fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo. Na caracterização molecular, foram utilizados três isolados identificados como CFMS 1293, CFMS 1294 e CFMS 1295. As sequências de cada isolado foram comparadas com sequências depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando-se a ferramenta BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*), estas apresentaram identidade de 99% para o fungo *P. ambiguum* com número de acesso FR748044.1, FR748043.1 para a região ITS e FR748066.1, FR748068.1 para o gene TEF.

As sequências obtidas nesse trabalho foram depositadas no GenBank com o nº de Acesso KU323506-KU323508 (ITS) e KU351846-KU351848 (TEF).

### Patogenicidade

A patogenicidade foi comprovada pelos dois métodos de inoculação mediante avaliação dos colmos dos híbridos P3646YH, P30F53YH e DKB390PRO. Observamos que todas as plantas de milho apresentaram sintomas típicos de podridão do colmo. Somente as plantas inoculadas com palito estéril não apresentaram sintomas da doença (Figura 2).

O reisolamento realizado a partir dos colmos inoculados apresentaram características morfológicas idênticas à cultura original de *P. ambiguum*. De acordo com nosso conhecimento, este foi o primeiro relato do fungo *P. ambiguum* causando podridão do colmo em milho no Brasil. Após essa constatação, foi submetida no dia 20/04/2016 uma nota científica de primeiro relato desse patógeno na revista *Plant Disease*.

Os resultados do teste de patogenicidade indicam que houve uma interação significativa entre as variáveis isolados, híbridos e método de inoculação (Tabela 1). O isolado CFMS 1295 apresentou maior agressividade, quando comparado ao isolado CFMS 1292. Quanto a severidade da doença, o híbrido DKB390PRO foi o mais suscetível entre os híbridos testados, com média de percentagem (%) de entrenó com sintomas da doença de 81,3% (Tabela 1). Em geral, o método do palito coberto por micélio foi o mais eficiente com 88,19% de entrenó com sintomas da doença. Somente o híbrido DKB390PRO não apresentou diferença significativa entre os métodos de inoculação testados (Tabela 1).

Na Tabela 1, os valores médios da percentagem (%) de entrenó com sintomas de podridão do colmo, causado pelos isolados de *P. ambiguum*, evidenciam o grande potencial desse fungo em causar sérios prejuízos na cultura do milho no país.

Resultados de severidade bastante semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram relatados por Nicoli et al. (2015) com o fungo *Colletotrichum graminicola* na cultura do milho no Brasil.

### CONCLUSÕES

Com base nos resultados de patogenicidade apresentados, bem como na representatividade das amostras coletadas nas regiões produtoras, podemos concluir que o fungo *Phaeocystostroma ambiguum* pode ser considerado um novo patógeno associado a podridão do colmo em milho no Brasil.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq, FAPEMIG e a Clóvis Geraldo Ribeiro.

### REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL . Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2016. p. 409-444.
- BOBEV, S. G.; VAN POUCKE, K.; MAES, M. First report of *Phaeocystostroma ambiguum* causing root and stem base rot on maize in Bulgaria. **Plant Disease**, v. 100, n. 6, p. 1237, 2016.
- COSTA, R. V.; FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R.; SILVA, D. D. **Podridões fúngicas de colmo na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 100).
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases, systematic mycology and microbiology laboratory**. Washington: USDA, 2016. Disponível em: <[http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new\\_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Corynespora%20cassicola&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Corynespora%20cassicola&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes)>. Acesso em: 16 maio 2016.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- MARCONDES, M. M. **Incidência de podridão de colmo e grãos ardidos em híbridos de milho sob diferentes densidades de plantas e épocas de colheita**. 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2012.
- NICOLI, A.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; ZAMBOLIM, L.; LANZA, F. E.; GUIMARÃES, D. P.; LANDAU, E. C. Validação de escala diagramática para

quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 10, p. 1720-1726, out, 2015.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Lages: Graphel, 2004. 44 p.

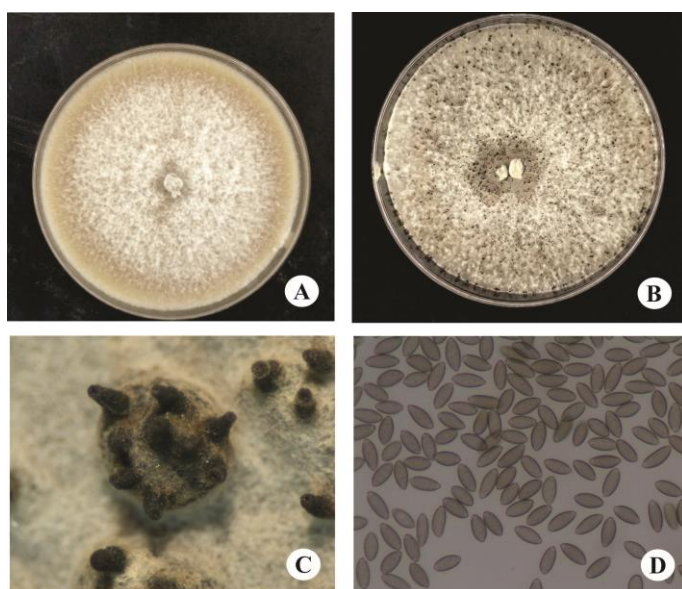
SUTTON, B. C. **The coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.



**Tabela 1** - Média de percentagem (%) de entrenó com sintomas de podridão do colmo dos isolados de *Phaeocystostroma ambiguum*, inoculados em colmos de híbridos de milho, utilizando dois métodos de inoculação, suspensão de esporos e micélio.

Cultivar	Isolado CFMS 1292		Isolado CFMS 1295	
	Suspensão	Micélio	Suspensão	Micélio
P3646YH	18.80 <sup>*</sup> Aa <sup>**</sup>	68.80 Ab	18.80 Aa	87.40 Ab
P30F53YH	31.30 Aa	93.80 Bb	47.96 Ba	93.80 Ab
DKB390PRO	47.96 Ba	93.80 Bb	84.20 Ca	91.56 Aa
<b>Média</b>	32.70 %	85.50 %	50.30 %	90.90 %

\*Segundo a escala diagramática proposta por Nicoli et al. (2015). \*\* Médias seguidas por mesma letra minúscula entre as linhas ou letras maiúsculas entre as colunas não se diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1.** A: Colônia com 7 dias de crescimento; B: Colônia com 20 dias de crescimento; C: Picnídios; D: Alfa conídios de *Phaeocystostroma ambiguum*.



**Figura 1.** Teste de patogenicidade. A: Método do palito imerso em suspensão de esporos de *Phaeocystostroma ambiguum*; B: Método

do palito coberto por micélio. A planta à esquerda das figuras A e B corresponde às testemunhas sem o patógeno inoculado.