

## **Deteccção e quantificação da infecção natural de *Exserohilum turcicum* em sementes de milho e milho pipoca**

Roberto L. De Rossi<sup>1</sup>, Erlei Melo Reis<sup>1</sup> e Ricardo Brustolin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fitopatologia - Micologia, Universidade de Passo Fundo, Brasil. e-mail: robderossi@gmail.com, erleires@upf.com.br, ricardo.brustolin@bol.com.br

**RESUMO** Os fungos são considerados os principais microrganismos associados e transmitidos pela semente na cultura do milho. O fungo *Exserohilum turcicum* (Et), agente causal da helmintosporiose do milho, causa epidemias nas lavouras de milho de muitos países, mas sua presença em semente não foi claramente relatada. O objetivo deste trabalho foi detectar e quantificar a presença de *E. turcicum* infectando naturalmente sementes de milho, comparando diferentes métodos de deteção do patógeno em sementes. Foram analisadas sete amostras de milho e três de milho pipoca, coletados no Rio Grande do Sul. De cada amostra foram plaqueadas 1.200 sementes utilizou-se cinco métodos: i) papel de filtro com congelamento, ii) meio de batata dextrose ágar (BDA), iii) meio semi-seletivo de Reis, iv) meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA), e v) meio semi-seletivo de De Rossi e Reis. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O material foi incubado em câmara de crescimento com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 h durante 7 a 10 dias. A incidência do fungo foi feita com base na identificação de conidióforos e conídios desenvolvidos sobre as sementes. Os métodos de papel filtro com congelamento, meio de BDA e meio de Reis demonstraram não ter suficiente sensibilidade para detectar o fungo. No entanto, a deteção foi comprovada no meio LCHA com uma média de 0,016 % e no meio semi-seletivo de De Rossi e Reis com 0,12 % de incidência. Demonstrou-se e quantificou-se *E. turcicum* infectando naturalmente sementes de milho e sementes de milho pipoca, confirmado pela sua caracterização morfológica e pela prova de patogenicidade observando-se os postulados de Koch.

**Palavras-chave:** *Zea mays*, helmintosporiose

### **Introdução**

A helmintosporiose do milho (*Zea mays* L.) causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs (teleomorfo: *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs é uma das principais doenças foliares do milho (FREDERIKSEN, 1991).

Existe uma grande dificuldade em se detectar *E. turcicum* em sementes de milho e, por isso, tem sido citado que o fungo não é veiculado pelas sementes. Autores como Luttrell (1958), Boosalis et al (1967), Levy & Cohen (1983), Shurtleff (1992), White (1999), Pingali (2000) e Lipps & Mills (2002), descrevem que o fungo *E. turcicum* pode sobreviver de uma estação para a outra de cultivo, associado com restos culturais (folhas, bainha das folhas e palha da espiga), na forma de peritécios e/ou como estrutura de dormência denominada de clamidosporo, mas não citam a possibilidade da presença do fungo na semente.

Há a necessidade de se demonstrar a importância do inóculo na semente para a

sobrevivência, abrigo, transporte e introdução de *E. turcicum* na área cultivada.

A hipótese formulada foi de que, a partir do centro de origem (México), este fungo via semente, foi e tem sido transportado para todos os locais onde o milho é cultivado.

O objetivo deste trabalho foi comprovar a presença e quantificar *E. turcicum* infectando naturalmente sementes de milho, comparando diferentes métodos de detecção do patógeno em sementes.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção das amostras**

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fitopatologia - Micologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF). Amostras de sementes de milho e de milho pipoca das safras de 2010/11 e 2011/12, de lavouras que apresentavam sintomas foliares da helmintosporiose, foram recebidas, acondicionadas em sacos de papel e conservadas em câmara fria.

Foram utilizadas sete amostras de milho comercial: AG 8011 YG, Celeron TL, DKB 390, Exp 3949, P1630 (Erechim), P1630 (Passo Fundo) e P32R22 e três amostras de milho pipoca: Pipoca I (P625), Pipoca II e Pipoca III, sendo esses dois últimos sem marca comercial, fornecidos por produtor que produz semente própria (Tabela 1).

### **Detecção de *Exserohilum turcicum* nas sementes**

Para a detecção de *E. turcicum* nas sementes de milho, foram utilizados cinco métodos: i) papel de filtro com congelamento, ii) meio de batata dextrose ágar (BDA), iii) meio de Reis (REIS, 1983), iv) meio de lactose caseína hidrolisada ágar (LCHA) (TUIITE, 1969), e v) meio semi-seletivo LCHA modificado (DE ROSSI e REIS, no prelo). Para este último meio, tomou-se como base o meio LCHA o qual foi suplementado com carbendazim 60 mg/L, captana 30 mg/L, neomicina 600 mg/L e estreptomicina 500 mg/L.

As sementes foram desinfestadas, antes do plaqueamento, imersas numa solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1% por três minutos, após foram lavadas três vezes em água destilada para remover o resíduo do hipoclorito.

No método de papel filtro com congelamento (i), as sementes foram dispostas individualmente sobre duas camadas de papel de filtro umedecido com água destilada, mantendo se distanciadas 1-2 cm uma das outras, no interior de recipientes de plástico 16x20x5 cm de altura. Os recipientes foram deixados 24 horas em câmara de crescimento com

temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas, em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm acima dos recipientes, finalizado esse tempo foram colocadas em geladeira a -20 °C por 24 horas, e após retornaram na câmara de crescimento por sete dias.

Nos métodos com meio agarizado (ii, iii, iv e v) as sementes foram plaqueadas, com auxílio de pinça previamente flambada, e distribuídas de forma equidistante, 25 sementes em cada gerbox (11x11x3,5 cm de altura). As sementes foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas, em prateleiras com três lâmpadas fluorescentes de 40 W de potência, localizadas a 50 cm acima dos gerboxes, por 7-10 dias.

Todos os métodos constaram de quatro repetições de 100 sementes por tratamento, num total 400 sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada ensaio foi repetido três vezes, totalizando assim 1.200 sementes analisadas por tratamento.

A avaliação foi realizada depois de 7 a 10 da incubação, sob lupa binocular (50 x), considerando-se infectada a semente com a presença de conidióforos e conídios de Et.

O experimento relatado foi realizado após a execução de vários ensaios preliminares que visaram a detecção de Et em sementes.

### **Confirmação do agente causal - prova de patogenicidade**

Para a confirmação do agente causal, todas as sementes infectadas por Et, foram transferidas para placas de Petri contendo meio LCHA, para induzir a esporulação do fungo. As placas foram incubadas em câmara climatizada, em ambiente controlado, por 15 dias e, após transferiu-se parte da colônia jovem do fungo para tubos de ensaio contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e armazenados na micoteca do laboratório, em refrigerador a 5°C. A caracterização morfológica dos conídios foi realizada após a montagem de lâminas individuais dos isolados do fungo feitos das sementes infectadas. Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, retiraram-se pequenas porções da colônia, com quinze dias de crescimento em meio LCHA, depositando-se sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol e, sobre estas, uma lamínula. Foi determinado o comprimento, a largura e o número de septos de 50 conídios por lâmina, em microscópio óptico, aumento de 400 x observando-se quatro repetições.

### **Prova de patogenicidade**

Seis sementes de milho foram semeadas em vasos plásticos contendo 1 Kg de solo utilizando-se sementes do híbrido do milho Pioneer P1630, suscetível a Et. Após a emergência, realizou-se o desbaste, permanecendo três plântulas por recipiente. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. A inoculação foi realizada por meio da deposição de 0,5 mL do inoculo (concentração de  $5 \times 10^4$  conídios/mL) no cartucho das plântulas, quando atingiram o estágio fenológico V4 (quarta folha expandida, apresentando colar, lígula e aurículas visíveis) (RITCHIE, 1993). Para melhorar a cobertura e o molhamento das folhas, foi adicionado o tenso ativo poli-oxi-etileno-sorbitano monolautaro (Tween 20, Sigma Chemical Co) na proporção de uma gota/L. No tratamento controle (testemunha), a deposição foi feita apenas com água mais o tenso ativo.

Foram observadas quatro repetições para cada isolado do fungo obtido das sementes, sendo a repetição um vaso contendo três plantas. Após a inoculação, as plantas permaneceram em casa-de-vegetação com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. Para completar o teste de patogenicidade, realizou-se o reisolamento do fungo, desde as folhas com sintomas da helmintosporiose.

## **Resultados e Discussão**

### **Detecção de *Exserohilum turcicum* nas sementes**

Foi detectado Et infectando naturalmente sementes de milho e sementes de milho pipoca (Tabela 1), confirmado pela sua caracterização morfológica e prova de patogenicidade.

Os métodos de papel filtro com congelamento e meio de BDA, métodos utilizados rotineiramente nos laboratório de sementes, em análise sanitária, demonstraram não ter sensibilidade suficiente para detectar o fungo. O meio de Reis, utilizado para a determinação de fungos de parede obscura como *Bipolaris sorokiniana*, também não foi efetivo.

No entanto, a detecção foi comprovada no meio LCHA (Tuite, 1969) meio indicado para estimular a esporulação de Et, com uma incidência média de 0,016 %. Mas a utilização desse meio melhorado (LCHA modificado, por De Rossi & Reis, no prelo) foi o mais sensível para detectar Et em semente de milho e de milho pipoca, com uma média de detecção de 0,12 % de incidência.

A maior incidência foi determinada na amostra do híbrido P1630 (Erechim) com 0,92 % em meio LCHA modificado. Utilizando o mesmo meio, nas amostras Exp 3949 e Pipoca I (P625) apresentaram uma semente infectada das 1.200 analisadas, sendo assim a incidência de 0,08 %, sendo que a amostra P1630 (Passo Fundo) apresentou 0,16 % de incidência (duas

sementes apenas em 1.200 analisadas). Com o meio LCHA foi possível detectar a infecção do fungo nas amostras P1630 (Passo Fundo) e Pipoca I (P625), ambas com 0,08 % de incidência.

As incidências das infecções determinadas do fungo *Et* nas semente são consideradas baixas (de 0,08 % a 0,92 %), sendo que nas amostras aonde foi detectado, apresentaram, em repetições dos experimentos, valores de zero.

As baixas incidências determinadas, não poderiam ser detectadas com os métodos utilizados rotineiramente (papel filtro com congelamento e BDA) por não serem sensíveis para a detecção deste patógeno. Esta pode ser a principal dificuldade pela qual não foi encontrada nenhuma referência, na literatura consultada, sobre a presença de *Et* infectando sementes de milho.

Pesquisadores que detalham o ciclo de vida do *Et* como Luttrell (1958), Boosalis et al. (1967), White (1999), Pingali (2000) e Lipps & Mills (2002), não fazem referência a sua presença, ou o não, em sementes.

Os manuais para análise sanitária de sementes de milho do CIMMYT (WARHAM et al., 2002) e do MAPA (BRASIL, 2009), apresentam a possibilidade da presença de *Et* em sementes de milho, baseados no texto “Identificação das espécies de *Drechslera* em sementes” de CHIDAMBARAM et al. (1979), onde os pesquisadores citam a presença do fungo *Drechslera turcica* (sinônimo de *E. turcicum*) em milho e outras espécies, referindo-se a presença do patógeno em sementes de *Sorghum bicolor* e *S. vulgare*.

A ISTA, Associação Internacional de Testes de Sementes (MACHADO et al., 2002), determina a utilização de 400 sementes em quatro repetições de 100 sementes para realizar análise sanitária. Essa quantidade de sementes para um fungo com tão baixa incidência é insuficiente, sendo que foi necessária a repetição de três vezes o determinado pela ISTA, para se obter valores numéricos.

### **Identificação e caracterização do agente causal**

Quanto às características morfológicas de largura e de comprimento, obtidas por meio das mensurações de 200 conídios, os esporos mediram 10,0-22,5 x 47,5-110,1 µm, apresentando 2-8 septos por conídio. Os valores obtidos de largura e comprimento ficaram próximos das mensurações descritas por Ellis (1971), de 18-32 x 50-144 µm, mas variaram quanto ao número de septos, onde Ellis cita entre 4-9 septos. Segundo Shurtleff (1992), os conídios apresentam tamanho 20 x 105 µm e entre 3 e 8 septos por conídio. Os valores relatados por Shurtleff ficaram ainda mais aproximados aos determinados neste trabalho.

## **Patogenicidade**

Uma semana após a inoculação do patógeno nos cartuchos das plantas do milho do híbrido suscetível P1630, observou-se as primeiras lesões folhares de formato elíptico e alongado de cor verde-acinzentadas, coincidentes com o registrado por ELLIOT e JENKINS (1946) e por BACH e KIMATI (1995). Os resultados positivos das inoculações confirmaram a patogenicidade dos isolados obtidos das sementes infectadas de *E. turcicum* em milho e milho pipoca.

## **Conclusões**

Confirma-se a presença de *E. turcicum* infectando naturalmente semente de milho e de milho pipoca. As dificuldades em sua detecção podem ser devidas à baixa incidência e aos métodos utilizados para sua detecção, pouco sensíveis.

Confirma-se mediante isolamento, inoculação, caracterização morfológica e pela comparação com descrições da espécie disponíveis na literatura, que o fungo isolado de sementes pertence à espécie *E. turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho.

## **Literatura Citada**

BRASIL (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Análise Sanitária de Sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2009. 200 p.

CHIDAMBARAM , P., MATHUR, S.B., & NEERGAARD, P. Identification of seed-borne *Drechslera* species. Friesia.10: 165-207. 1973

ELLIS, M.B. Dematiaceous hyphomycetes. Kew: CAB. 1971. 608p.

FREDERIKSEN, R.A. Compedium of Sorghum Diseases. American Phytopathology Society, St. Paul. 1991. 82 pp.

LUTTREL, E.S. The perfect state of *Helminthosporium turcicum*, Phytopathology 48:281-287. 1958.

MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOUD-FILHO, D.S. Seed-borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis. ISTA. 2002.134 pp.

REIS, E.M. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. Plant Disease 67:68-70. 1983.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers, n° 158, Kew, I.M.I. C.A.B. 1987.

TUITE, J. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University. Lafayette, Indiana. 1969.

WARHAM, E.; BUTLER, L.D. & SUTTON, B.C. Seed Testing of Maize and Wheat. A Laboratory Guide. Sustainable Maize and Wheat Systems for the Poor. International Maize and Wheat Improvement Center CIMMYT. Mexico. D.F. Mexico. ISBN: 968-6923-70-5

WHITE, D.G. Compendium of corn diseases. Third edition. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA. 1999.

**Tabela 1.** Incidência (%) da infecção natural de *Exserohilum turcicum* em sementes de milho e milho pipoca em cinco métodos de detecção

Amostra	Método/Meio				
	Papel de filtro	BDA	Reis	LCHA	LCHA modificado
AG 8011 YG	0	0	0	0	0
Celeron TL	0	0	0	0	0
DKB 390	0	0	0	0	0
Exp 3949	0	0	0	0	0,08
P1630 (Erechim)	0	0	0	0	0,92
P1630 (Passo Fundo)	0	0	0	0,08	0,16
P32R22	0	0	0	0	0
Pipoca I (P625)	0	0	0	0,08	0,08
Pipoca II (sem nome)	0	0	0	0	0
Pipoca III (sem nome)	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	0	0	0	0,016	0,124

Cada amostra com quatro repetições de 100 sementes.

Médias da repetição de três experimentos, totalizando 1200 sementes analisadas.