

Deteccção e Quantificação da Infestação Natural de *Exserohilum turcicum* em Sementes de Milho

Roberto L. De Rossi¹, Erlei Melo Reis¹ e Ricardo Brustolin¹

¹Laboratório 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 é bem conhecida. O objetivo deste trabalho foi detectar e quantificar a presença de conídios de *Et* externamente aderidos à semente de milho. A deteção dos esporos foi feita pelo método de suspensão de lavagem das sementes. *Et* foi detectado infestando semente de milho com uma média de 1,04 conídios por semente. O agente causal foi confirmado pela sua caracterização morfológica e prova de patogenicidade seguindo os postulados de Koch.

Palavras-chave: *Zea mays*, helmintosporiose

Introdução

A helmintosporiose do milho (*Zea mays* L.) causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs é uma doença de ocorrência generalizada em todo mundo (CARSON & VAN DYRE, 1994). Pode causar redução da área foliar sadia durante o período de enchimento dos grãos resultando em danos de 50% ou mais em cultivares suscetível (PERKINS & PEDERSEN, 1987).

Segundo Barba (2001), a grande maioria dos parasitas necrotróficos utiliza-se da semente como veículo de disseminação, abrigo e meio de sobrevivência. Alguns autores afirmam que a semente infetada introduz os parasitas necrotróficos nas áreas de cultivo (REIS & CASA, 1996; PINTO, 1996; ZAMBOLIM et al., 2000).

Formulou-se a hipótese de que a semente infestada pode ser uma fonte de inóculo de *Et*, transportando e introduzindo-o nas áreas onde forem cultivados cultivares suscetíveis.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar e quantificar a presença de conídios de *Et* aderidos externamente à semente de milho.

Material e Métodos

Obtenção das amostras

Neste trabalho foi utilizada uma amostra de sementes de milho do híbrido P1630, coletada numa lavoura que apresentava sintomas da helmintosporiose na safra 2011/12,

localizada no município de Erechim, RS.

A amostra foi registrada e processada no Laboratório de Fitopatologia-Micologia da FAMV da UPF, acondicionada em saco de papel e armazenada em câmara fria.

Deteção de *Exserohilum turcicum*

A deteção dos esporos de *Et* aderidos à superfície das sementes foi feita pelo método de suspensão de lavagem, segundo o Manual de análise sanitário de semente do MAPA (BRASIL, 2009). Cinco repetições de 50 g de sementes foram introduzidas em um Erlenmyer de 250 mL de volume, contendo 50 mL de água destilada, mais uma gota de o tenso ativo poli-oxi-etileno-sorbitano monolaurato (Tween 20, Sigma Chemical Co) e agitadas manualmente por cinco minutos. O líquido foi separado das sementes através de um coador. A suspensão foi dividida em cinco alíquotas de 10 mL em cinco tubos de ensaio e centrifugados (centrífuga ALPHA II), por dez minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi eliminado com uma pipeta, restando o precipitado. Foi adicionado um mL de água destilada e esterilizada em cada tubo e, agitado para resuspender o precipitado. As suspensões dos cinco tubos foram transferidas para um único tubo com um volume final de cinco mL. Com o auxílio de um micropipetador, foram depositados 10 µL numa lâmina de microscopia e feita a contagem em microscópio óptico. Utilizaram-se cinco repetições de cinco gotas por amostra. Os dados foram expressos como média de conídios de *Et* por semente.

Confirmação do agente causal - *Exserohilum turcicum*

Para a confirmação do agente causal, foram pipetados 350 µL da suspensão dos conídios removidos das sementes por lavagem, para placas de Petri contendo meio semi-seletivo de lactose caseína hidrolisada ágar modificado (LCHA modificado) (De Rossi & Reis, no prelo), tendo-se como base o meio LCHA (Tuite, 1969), suplementado com carbendazim 60 mg/L, captana 30 mg/L, neomicina 600 mg/L e estreptomicina 500 mg/L. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, distribuiu-se homogeneamente a suspensão na superfície do meio e incubou-se a 25±2 °C, no escuro.

Caracterização morfológica dos conídios

Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, retiraram-se pequenas porções da colônia, com quinze dias de crescimento em meio LCHA, e depositou-se sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol e, sobre estes, 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 em quatro repetições.

Prova de Patogenicidade

Cultivo das plantas

Seis sementes de milho foram semeadas em vasos plásticos contendo 1 Kg de solo utilizando-se sementes do híbrido Pioneer P1630. 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.

Multiplicação do inóculo

Com o auxílio de uma agulha histológica flambada, pequenas porções da colônia, de cada isolado de *Et*, preservadas na micoteca do laboratório, foram transferidas para placas de Petri contendo o meio LCHA. As placas foram vedadas com papel filme e levadas para uma câmara climatizada, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e escuro, por um período de 15 dias, até obter-se esporulação abundante.

Inoculação em plantas de milho

A inoculação foi realizada por meio da deposição de 0,5 mL do inóculo (concentração de 5×10^4 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 de cada isolado de fungo obtido de semente, cada repetição foi 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.

Reisolamento do fungo de folhas de milho com sintomas da helmintosporiose

Para completar a prova de patogenicidade, realizou-se o reisolamento do fungo, desde as folhas com sintomas da helmintosporiose, em meio semi-seletivo de De Rossi e Reis. Previamente, realizou-se a desinfestação de discos do tecido foliar com sintomas em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos, após lavados com água destilada,

retirando o excesso do desinfestante. Em seguida, os discos foram distribuídos em caixas de acrílico, tipo gerbox, no fundo do recipiente foi depositado uma espuma de polietileno e, sobre esta, duas folhas de papel filtro. O material absorvente foi embebido com água destilada, até a saturação da espuma, constituindo uma câmara úmida, e mantida em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após dois dias de incubação, com um microscópio estereoscópico, foi identificada a presença de *Et*. Da esporulação do fungo no tecido vegetal, retiraram-se conídios, com o auxílio de uma agulha histológica flambada e transferida para placas de Petri contendo o meio semi-seletivo de De Rossi e Reis. Decorridas duas semanas foi realizada a caracterização morfológica dos conídios após a montagem de lâminas individuais dos isolados do fungo.

Resultados e Discussão

Detecção de *Exerohilum turcicum*

O fungo *Et* foi detectado infestando semente de milho com uma média de 0,51 conídios/10 μL , correspondendo a 1,04 conídios por semente (Tabela 1). A maior quantidade de conídios por semente determinada foi de 1,33 e a menor de 0,65.

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 na média 10,7-23,0 x 43,5-138,7 μm , apresentando 2-8 septos por conídio. Os valores obtidos de largura e comprimento foram próximas 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 (não especificando os valores mínimos e os máximos) 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 & JENKINS (1946) e por BACH & KIMATI (1995).

Os resultados positivos das inoculações confirmaram a patogenicidade dos conídios de

Et infestando sementes de milho.

Conclusões

Confirma-se a presença de *Exserohilum turcicum* infestado semente de milho.

Confirma-se mediante o isolamento, inoculação, caracterização morfológica e pela comparação com descrições da espécie disponíveis na literatura, que os esporos presentes sobre as sementes de milho pertencem à espécie *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose do milho.

Literatura Citada

BACH, E. & KIMATI, H. Comparação morfológica e patogênica de *Exserohilum turcicum*, isolado de milho, sorgo e capim massambará. *Summa Phytopathologica*, v.21, p.134-139. 1995.

BARBA, J.T. *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*) em sementes de cevada: detecção, transmissão e controle. 2000. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2001.

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.

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

PERKINS, J.M. & PEDERSEN, W.L. 1987. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn. *Plant Disease*, St. Paul, MN, 71:940-943

REIS, E.M. & CASA, R.T. Manual de identificação e controle de doenças de milho. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. How a corn plant develops. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26p. Special Report, 48.

SHURTLEFF, M.C. Compendium of corn diseases. American Phytopathological Society, 1992. 105p.

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

Tabela 1. Infestação natural de sementes de milho P1630, com conídios de *Exserohilum turcicum*

Repetição	Conídios/10 µL (n°)	Sementes/50 gr (n°)	Conídios/semente (n°)
I	0,56	193	1,16

II	0,56	190	1,17
III	0,68	203	1,33
IV	0,32	197	0,65
V	0,44	192	0,91
Média	0,51	195	1,04