

Identificação de fungos causando podridão do pedúnculo em espigas de milho¹

Yule Rocha de Melo², Dagma Dionísia da Silva³, Rodrigo Vêras da Costa³, Ubiraci Gomes de Paula Lana³, Walter Fernandes Meirelles³, Luciano Viana Cota³

1 Trabalho financiado pelo CNPq; 2 Estudante do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de São João del-Rei, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa; 3 Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo

INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura bastante consumida no Brasil e no mundo inteiro. Possui um grande valor nutricional e suas aplicações podem ser variadas. Contudo, está sujeito ao ataque de um número extenso de doenças, sendo elas consideradas um dos principais fatores limitantes na produção desta cultura no País, que podem acarretar perdas substanciais da lavoura. As doenças requerem uma atenção especial, devendo ser conhecidas e estudadas, de modo a garantir o aumento gradual e contínuo dos níveis de produtividade nas regiões de plantio (Chagas et al., 2015).

Recentemente, relatos da ocorrência de podridões de pedúnculo em milho causaram preocupação entre os produtores de diversas regiões no Brasil. Sintomas de apodrecimento de espigas, com escurecimento das palhas, de fora para dentro, foram relatados. Para identificar o agente causal dessa podridão, espigas de milho foram enviadas para a Embrapa Milho e Sorgo, a partir de junho de 2020 e início de 2021. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os patógenos associados à podridão de pedúnculo em milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Espigas de milho com sintomas de podridão do pedúnculo foram enviadas para o laboratório de fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas-MG para isolamento e identificação dos possíveis patógenos da podridão do pedúnculo.

Fragmentos sintomáticos da palha da espiga, pedúnculo das espigas, base da espiga e grãos foram cortados e desinfestados em hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos, foram e plaqueados em meios BDA (batata, dextrose, ágar) e FAA (farinha de aveia, ágar) e em seguida, transferidos para as placas de Petri com os meios de cultura. As placas de Petri foram então incubadas em câmara de crescimento a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, onde ficaram em regime de luz de 12 horas. Após sete dias de crescimento, colônias dos possíveis agentes etiológicos foram transferidas para novas placas de Petri com meio BDA para purificação e realização de culturas monospóricas para que os fungos fossem analisados molecularmente. Após sete dias de crescimento nas mesmas condições anteriores em câmara de crescimento, culturas monospóricas foram realizadas. As placas com culturas monospóricas foram mantidas nas condições de crescimento anteriores e, após dez dias, estas foram enviadas para o laboratório de análise molecular da Embrapa Milho e Sorgo, onde foi feita a identificação molecular baseada no sequenciamento das regiões ITS4 x 5 e EF1.

Após a identificação das espécies, quatro isolados de fungos foram inoculados em dois híbridos de milho, após emissão das espigas, (70-80 dias de semeadura) em casa de vegetação para avaliar se os mesmos sintomas observados em campo seriam reproduzidos, e confirmar a patogenicidade dos isolados. Foi inoculado o micélio de cada espécie pelo método do palito estéril, em que os palitos são colocados em placas de Petri com as colônias fúngicas e, após o crescimento de micélio fúngico sobre os palitos, estes são inseridos nas espigas de forma asséptica para infecção das plantas. Após 15 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dezessete isolados de fungos com diferentes características morfológicas (cor da colônia, parte da planta isolada, tipo de conídios) foram identificados como pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Bipolaris* e *Exserohilum*, sendo cinco isolados de *Fusarium* sp., sete isolados de *Bipolaris* sp. e três de *Exserohilum* sp. Uma amostra foi perdida por contaminação.

Entre os quatro isolados do gênero *Fusarium*, dois foram identificados como a espécie *Fusarium equiseti*, dois como *Fusarium proliferatum* e um como *Fusarium verticillioides*. O isolamento de espécies de *Fusarium* é frequente em todas as partes do milho. Todas as espécies de *Fusarium* isoladas neste trabalho são patógenos comuns em milho no Brasil, porém os sintomas de tais espécies diferem das podridões observadas em 2020/2021.

Entre os fungos foram identificados, três como *Bipolaris zeicola*, quatro como *Bipolaris setariae*, dois como *Bipolaris sorokiniana* e três como *Exserohilum rostratum*, todos do complexo helmintospórico (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de fungos identificados em amostras de milho com sintomas de podridão no pedúnculo das espigas. Sete Lagoas-MG.

Isolado	Região alvo	Fragmento DNA (pb)	Parte da planta	Espécie	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)
01	ITS4 x 5	519	Palha	<i>Bipolaris zeicola</i>	100	0	98,86
	EF1	259		<i>Bipolaris zeicola</i>	80	8e ⁻¹⁰³	100,00
02	ITS4 x 5	547	Pedúnculo externo	<i>Bipolaris zeicola</i>	99	0	98,73
	EF1	271		<i>Bipolaris zeicola</i>	80	8e ⁻¹⁰⁸	100,00
03	ITS4 x 5	554	Base da espiga	<i>Bipolaris setariae</i>	99	0	99,46
	EF1	344		<i>Bipolaris setariae</i>	83	1e ⁻¹²⁶	95,32
04	ITS4 x 5	548	Base da espiga	<i>Bipolaris setariae</i>	99	0	99,82
	EF1	345		<i>Bipolaris setariae</i>	83	4e ⁻¹²⁷	95,33
05	ITS4 x 5	537	Base da espiga	<i>Fusarium equiseti</i>	99	0	99,81
	EF1	278		<i>Fusarium</i> sp.	99	4e ⁻¹⁴¹	100,00
06	ITS4 x 5	548	Base da espiga	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	100	0	99,82
	EF1	344		<i>Bipolaris</i> sp.	99	2e ⁻¹³⁹	93,31
07	ITS4 x 5	533	Sabugo	<i>Fusarium</i> sp.	100	0	99,07
	EF1	474		<i>Fusarium verticillioides</i>	59	2e ⁻¹⁴¹	99,30
08	ITS4 x 5	548	Pedúnculo interno	<i>Fusarium equiseti</i>	100	0	99,27

	EF1	282		<i>Fusarium</i> sp.	99	4e-141	99,64
09	ITS4 x 5 EF1		Base da espiga	Amostra contaminada Amostra contaminada			
10	ITS4 x 5 EF1	554 634	Base da espiga	<i>Fusarium proliferatum Fusarium</i> sp.	100 44	0 1e ⁻¹³⁹	98,19 98,95
11	ITS4 x 5 EF1	548 659	Pedúnculo interno	<i>Fusarium proliferatum Fusarium</i> sp.	98 43	0 7e ⁻¹⁴²	99,08 99,30
12	ITS4 x 5 EF1	574 350	Pedúnculo interno	<i>Bipolaris setariae Bipolaris</i> sp.	99 98	0 6e ⁻¹³⁵	99,13 92,49
13	ITS4 x 5 EF1	566 -	Palha	<i>Bipolaris setariae</i> -	99 -	0 -	99,11 -
14	ITS4 x 5 EF1	597 350	Palha	<i>Bipolaris sorokiniana Bipolaris</i> sp.	99 98	0 6e ⁻¹³⁵	97,99 92,49
15	ITS4 x 5 EF1	590 298	Grão	<i>Exserohilum rostratum Exserohilum rostratum</i>	99 82	0 5e ⁻¹¹⁵	99,32 99,16
16	ITS4 x 5 EF1	589 289	Grão	<i>Exserohilum rostratum Exserohilum rostratum</i>	96 82	0 1e ⁻¹¹⁶	99,30 99,58
17	ITS4 x 5 EF1	569 183	Grão	<i>Exserohilum rostratum Exserohilum rostratum</i>	98 99	0 1e ⁻⁸⁸	98,59 100

Os isolados inoculados em casa de vegetação resultaram em sintomas similares aos observados em condições de campo (Figura 1), porém, não foi possível completar os postulados de Koch em razão da ocorrência de contaminantes quando as espigas foram amostradas para reisolamento. Este experimento foi novamente implantado em casa de vegetação e foi inoculado no dia 20 de agosto de 2021.



Figura 1. Sintomas de podridão em plantas de milho inoculadas com três espécies de *Bipolaris* e *Exserohilum rostratum* em casa de vegetação.

A taxonomia do complexo helmintosporíco é complexa e foi alterada após pesquisas, que separaram o grupo em vários gêneros que incluem *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* e *Exserohilum* (Sivanesan, 1987; Manamgoda et al., 2014). A prevalência de espécies do gênero *Bipolaris* e *Exserohilum* nas amostras recebidas indica que este grupo de fungos está associado à podridão de pedúnculo em espigas de milho. Os gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum* estão relacionados a um grande número de plantas com ampla distribuição mundial e são capazes de infectar diversas partes das plantas como colmos, espigas e folhas (Manamgoda et al., 2014; Ellis, 1971; Sivanesan, 1987; Berbee et al., 1999). No Brasil, *B. setariae* não está relatada em milho (Farr; Rossman, 2021). Porém, *B. setariae* foi recentemente relatado causando mancha foliar em milho na China (Xiao et al., 2020; Sun et al., 2020), e também existem relatos no Canadá, na Índia e no Paquistão (Sivanesan, 1987).

CONCLUSÃO

Prevaleceram as espécies *Bipolaris zeicola*, *Bipolaris setariae* (não relatado em milho no Brasil), *Bipolaris sorokiniana* e *Exserohilum rostratum* nos isolamentos de podridão de pedúnculo do milho. Sintomas de podridão nas espigas inoculadas em casa e vegetação foram semelhantes aos observados nas amostragens de campo, porém, pesquisas estão em

andamento para confirmação da patogenicidade das espécies isoladas como responsáveis pela podridão de pedúnculo em milho.

REFERÊNCIAS

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, v. 91, n. 6, p. 964-977, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061106>.

CHAGAS, J. F. R.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SIMON, J.; MOURÃO, D. S. C. **Principais doenças foliares da cultura do milho no estado do Tocantins**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 13 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 213).

ELLIS, M. B. **Dematiaceous *Hyphomycetes***. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases**: U.S. National Fungus Collections. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 1 dez. 2021.

MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 221-288, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>.

SIVANESAN, A. **Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs**. Wallingford: CABI, 1987. 261 p. (Mycological Papers, n. 158).

SUN, X.; QI, X.; WANG, W.; LIU, X.; ZHAO, H.; WU, C.; CHANG, X.; ZHANG, M.; CHEN, H.; GONG, G. Etiology and symptoms of maize leaf spot caused by *Bipolaris* spp. in Sichuan, China. **Pathogens**, v. 9, n. 3, article 229, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens9030229>.

XIAO, S. Q.; ZHANG, D.; ZHAO, J. M.; YUAN, M. I.; WANG, J. H.; XU, R. D.; LI, G. F.; XUE, G. D. S. First report of leaf spot of maize (*Zea mays*) caused by *Bipolaris setariae* in China. **Plant Disease**, v. 104, n. 2, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1586-PDN>.