

## **PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS REPRODUTIVAS SEXUADAS E ASSEXUADAS DE *Phyllosticta* sp (f.p. *Phaeosphaeria maydis*) EM LABORATÓRIO.**

**Eliane Patrícia Cervelatti<sup>(1)</sup>**; Luzia Doretto Paccola-Meirelles<sup>(2)</sup> & Fernando Tavares Fernandes<sup>(3)</sup>. <sup>(1)</sup> - Aluna do curso de mestrado em Genética e Melhoramento da UEL/Embrapa/Iapar, Londrina-PR, <sup>(2)</sup> - Docente da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Depto. de Biologia Gera, Londrina-PR, <sup>(3)</sup> - Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG.

Palavras-chave: *Phyllosticta* sp, *Phaeosphaeria maydis*, *Zea mays*, mancha foliar, estruturas reprodutivas

A mancha por *phaeosphaeria* é uma doença de ocorrência generalizada e de importância para a cultura do milho. Apesar de ter sido relatada pela primeira vez no Brasil em 1966, como sendo causada pelo fungo *Phyllosticta* sp (f.p. *Phaeosphaeria maydis*) (Fantim, 1994), muito pouco é conhecido sobre a biologia deste agente. Esse trabalho teve como objetivo adequar as condições de cultivo para a produção de picnídios, exsudação de conídios e produção de ascósporos “in vitro”, bem como monitorar, através de microscopia óptica, a formação do picnídio nesse fungo. Duas metodologias de inoculação foram utilizadas para a obtenção de picnídios: 1) discos de micélio (tratamentos com e sem a raspagem da colônia no quarto dia de crescimento) e 2) suspensão de conídios ( $10^4 \text{ml}^{-1}$ ). A produção de picnídios e a exsudação de conídios foram avaliadas através de notas de 0 a 4, em três meios de cultura, BDA, Meio Completo de Pontecorvo (MC) (Pontecorvo *et al.*, 1953) e Meio de Extrato de Folhas de Milho (MF), em três temperaturas ( $22^\circ \pm 2^\circ$ ,  $25^\circ$  e  $27^\circ\text{C}$ ), 12h claro / 12h escuro, presença e ausência completa de luz. Embora as duas metodologias de inoculação para produção de picnídios tenham mostrado resultados positivos, a utilização de suspensão de conídios foi mais eficiente, produzindo grande quantidade de picnídios nos diferentes meios de cultura e temperaturas após sete dias de incubação (Tabelas 1 e 2). A metodologia de inoculação por discos de micélio produziu picnídios somente após 32 dias de incubação. Independentemente da temperatura, a exsudação de conídios foi maior em meio de BDA, na ausência de luz, quando se usou como inóculo suspensão de conídios, com crescimento em presença de luz a  $27^\circ\text{C}$ . A produção de ascósporos foi avaliada através de notas de 0 a 3, inoculando-se disco micélio de *Phaeosphaeria maydis* em (MF) e MC, e suspensão de ascósporos em MF e BDA e cultivo na temperatura de  $22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ . A produção de ascósporos foi maior em MF, nas duas metodologias avaliadas enquanto que em BDA a produção só ocorreu quando se utilizou suspensão de esporos como inóculo (Tabela 3) (Figura 1). Não foi observada a produção de ascósporos em MC. Para o monitoramento da formação do picnídio, inoculou-se suspensão de esporos ( $10^4 \text{ml}^{-1}$ ) sobre membrana de diálise em meio BDA; as amostras foram levadas à câmara de crescimento a  $22^\circ\text{C}$ , e retiradas com 18h, 24h, 30h, 42h e 54h de germinação. As mesmas foram coradas com lactofenol azul para melhor visualização e observadas em microscópio óptico. O início do enovelamento hifal para formação do picnídio ocorreu por volta de 18h após o início da germinação e se completou com 54h.

**Tabela 1:** Avaliação da produção de picnídios (notas de 0 a 4) a partir da inoculação de discos de micélio de *Phyllosticta* sp., em seis diferentes meios de cultura, temperaturas 22° (+/- 2°), 25° e 27°C, em presença e ausência de luz, após sete dias de incubação. Sete Lagoas, MG. 1998.

Meio de cultura	Presença de luz			Ausência de luz		
	22°+/-2	25°	27°	22°+/-2	25°	27°
Meio Completo <sup>(1)</sup>	0,0	1,5	2,0	0,0	1,0	0,0
Meio Completo(R) <sup>(2)</sup>	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0
Meio de extrato folha de milho	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Meio de extrato de folha de milho (R) <sup>(3)</sup>	0,0	1,5	0,0	0,0	1,0	0,0
Meio de BDA	0,3	2,0	0,0	0,3	0,0	0,0
Meio de BDA (R) <sup>(4)</sup>	2,0	1,5	0,0	2,0	2,0	0,0

<sup>(1)</sup> - Meio Completo de Pontecorvo

<sup>(2)</sup> - Meio Completo de Pontecorvo, colônia raspada após quatro dias de incubação.

<sup>(3)</sup> - Colônia raspada após quatro dias de incubação

<sup>(4)</sup> - Colônia raspada após quatro dias de incubação.

**Tabela 2:** Avaliação da produção de picnídios, exsudação de conídios, distribuição de picnídios no meio de cultura (Individual- I ou em Grumos- G), quantidade de micélio produzido e tamanho dos picnídios, utilizando-se uma suspensão de esporos ( $10^4 \text{ml}^{-1}$ ), seis meios de cultura, três temperaturas, na presença e ausência de luz, após sete dias de incubação. Sete Lagoas, MG. 1998.

Meio de cultura	Temperatura (°C)	Produção de picnídios (0 a 4)	Exsudação dos conídios (0 a 4)	Distribuição dos picnídios (I e G)	Quantidade de micélio (1 a 3)	Tamanho do picnídio (1 a 3)
MC (P) <sup>1</sup>	22	4,0	2,6	I	2,8	1,0
MC (A) <sup>2</sup>	22	4,0	3,0	I	2,0	1,0
MC (P)	25	4,0	2,0	I	2,5	1,0
MC (A)	25	4,0	3,0	I	1,0	1,0
MC (P)	27	4,0	2,3	I	2,6	1,0
MC (A)	27	4,0	3,0	I	1,3	1,0
BDA (P) <sup>3</sup>	22	4,0	2,0	G	2,0	3,0
BDA (A) <sup>4</sup>	22	4,0	4,0	I	1,0	3,0
BDA (P)	25	4,0	2,6	G	2,3	3,0
BDA (A)	25	4,0	4,0	I	1,0	3,0
BDA (P)	27	4,0	4,0	G	2,0	3,0
BDA (A)	27	4,0	4,0	G	1,0	3,0
MF (P) <sup>5</sup>	22	4,0	3,0	G	2,0	2,0
MF (A) <sup>6</sup>	22	4,0	3,0	I	1,0	2,0
MF (P)	25	4,0	3,0	I	1,6	2,0
MF (A)	25	4,0	3,0	I	1,0	2,0
MF (P)	27	4,0	3,0	G	1,5	2,0
MF (A)	27	4,0	3,0	I	1,0	2,0

<sup>1</sup> MC (P) = Meio Completo de Pontecorvo; presença de luz.

<sup>2</sup> MC (A) = Meio Completo de Pontecorvo; ausência de luz.

<sup>3</sup> BDA (P) = Batata Dextrose Ágar, presença de luz.

<sup>4</sup> BDA (A) = Batata Dextrose Ágar; ausência de luz.

<sup>5</sup> MF (P) = Meio de extrato de folhas de milho; presença de luz.

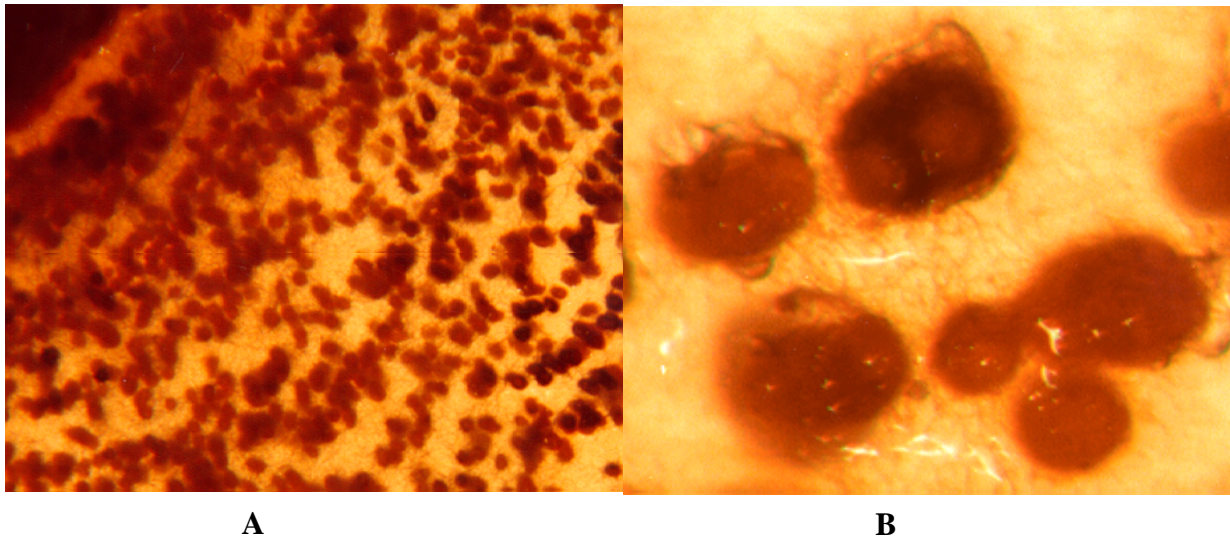
<sup>6</sup> MF (A) = Meio de extrato de folhas de milho; ausência de luz.

**Tabela 3:** Produção de ascósporos (notas de 0 a 3 ) a partir da inoculação com discos de micélio de *Phaeosphaeria maydis*, e suspensão de ascósporos, em três meios de cultura, após 20 dias de incubação. Sete Lagoas, MG. 1998.

Meio de cultura	Suspensão de ascósporos	Disco de micélio
Batata dextrose agar	2,0	----
Extrato de folha de milho	3,0	3,0
Meio completo <sup>1</sup>	---- <sup>2</sup>	0,0

<sup>1</sup>- Meio completo de Pontecorvo

<sup>2</sup>- inoculação não realizada



**Figura 1:** **A:** Pseudotécios de *Phaeosphaeria maydis* (f.imp. *Phyllosticta* sp), produzidos em meio de extrato de folhas de milho; **B:** Pseudotécios de *Phaeosphaeria maydis* (f.imp. *Phyllosticta* sp) mostrando massa de ascos em seu interior.

## Bibliografia

Fantim, G.M. Mancha de *Phaeosphaeria*, doença do milho que vem aumentando sua importância. *Biológico*, v.56, p. 39. 1994.

Pontecorvo, G; Roper, J. A; MacDonald, K.D.&Bufton, AW.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, v.5, p. 141-238. 1953.