



ELIZABETH DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, FERNANDO TAVARES FERNANDES<sup>1</sup>, ENIA MARA CARVALHO<sup>2</sup> e JOSÉ DA CRUZ MACHADO<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: [beth@cnpmc.embrapa.br](mailto:beth@cnpmc.embrapa.br) [tavares@cnpmc.embrapa.br](mailto:tavares@cnpmc.embrapa.br)

<sup>2</sup> Depto de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: [machado@ufla.br](mailto:machado@ufla.br)

Palavras-chave: *Sclerophthora*, Peronosporaceae, esporângio, zoosporos, *Phyllosticta*

## INTRODUÇÃO

A Mancha por *Phaeosphaeria* em milho foi descrita pela primeira vez, na Índia, em 1965, assumindo-se como seu agente causal o fungo *Phaeosphaeria maydis*, f.imp. *Phyllosticta* sp (= *Sphaerulina maydis* P. Hennigs; sin. *Leptosphaeria zae-maydis* Saccas) (Rane et al., 1965). Desde que a Mancha por *Phaeosphaeria* em milho foi descrita, na Índia, sua ocorrência no Brasil tem sido relatada em várias publicações (Balmer et al., 1970; Fernandes & Sans 1994, Shuelter et al. 2003). Essa doença é uma das mais importantes em milho, no Brasil, uma vez que, encontra-se disseminada nas principais regiões produtoras desse cereal e, que, sob condições favoráveis, causa perdas severas (Fernandes & Oliveira, 1997). Contudo, o agente etiológico dessa doença permanece ainda questionável. Sob condições experimentais, várias tentativas de inoculação de esporos e/ou micélio de *P. maydis* ou *Phyllosticta* sp, obtidos em cultivo "in vitro", em milho, não resultaram na reprodução de sintomas dessa doença (Fernandes, F. T. dados não publicados). Além disso, a presença de estruturas desses fungos em lesões da doença não é comum, e, recentemente, a possibilidade de envolvimento de uma bactéria na etiologia da doença foi levantada Paccola-Meirelles et al. (2001). Considerando esses aspectos, o objetivo desse trabalho foi examinar lesões da Mancha por *Phaeosphaeria* em milho, sob microscopia ótica e eletrônica, para verificar a possível presença de fungo ou bactéria como possível agente etiológico dessa importante doença.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Caracterização dos sintomas e desenvolvimento da Mancha por *Phaeosphaeria* no Brasil:** Os sintomas e sinais geralmente se iniciam após o florescimento do milho, mais freqüentemente, durante o desenvolvimento dos grãos. As primeiras lesões podem ser observadas nas folhas inferiores e, sob condições favoráveis, a doença progride para as folhas superiores. A severidade dos sintomas depende da susceptibilidade do genótipo de milho, e nas cultivares mais susceptíveis as folhas doentes secam antes da maturidade. As lesões jovens são verde-claro a marron-claro, encharcadas, e aumentam em tamanho, tornando-se manchas secas, de cor palha. Ambas lesões, jovens e velhas, são geralmente arredondadas ou elípticas, espalhadas na superfície da folha e, em poucos casos, coalescem. O tamanho das lesões é variável de 0,3 a 2,0 cm. Em alguns genótipos muito susceptíveis, as lesões podem ultrapassar 2,0 cm e tornarem-se irregulares, embora ainda com delineamento, aparentemente, elíptico. **Amostragem e análises:** No período de setembro de 2000 a fevereiro de 2004 foram coletadas folhas de milho com lesões da Mancha por *Phaeosphaeria*, em diferentes genótipos, em diferentes meses, abrangendo a safrinha e a safra de verão, na área da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. Essas amostras foram utilizadas para exame sob microscopia de luz e microscopia eletrônica. **Microscopia eletrônica de varredura (MEV):** Lesões da Mancha por *Phaeosphaeria* foram cortadas em fragmentos e esses fixados em fixador de Millonigs, por uma noite a 4°C, e pós fixados por 1h em tetróxido de osmio (2%). Esses fragmentos foram desidratados através de imersões sucessivas em uma série álcool-acetona, (25, 50, 75%) e posteriormente em acetona 100%, por 20 min em cada concentração, então secas no secador "ponto crítico", e metalizadas com ouro, após fixadas nos porta-espécimens para análise ao MEV. Um total de 80 amostras, incluindo lesões jovens e velhas, foram analisadas ao MEV. **Microscopia eletrônica de transmissão (MET):** Dez pequenos fragmentos (cerca de 0,1 x 0,2 cm) de lesões da Mancha por *Phaeosphaeria* em milho, fixadas e desidratadas, como descrito acima, foram embebidas em resina spurr. Secções ultrafinas, obtidas em ultramicrotomo, foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, para análises ao MET (Hayat, 1989). **Microscopia de luz:** Muitas amostras foram diretamente analisadas sob microscópio ótico estereoscópico e sob microscópio composto. Para o microscópio composto, várias lâminas de vidro foram preparadas, contendo estruturas removidas das lesões, sob estereomicroscópio, usando lactofenol ou azul tripano em lactofenol 0,1%. Ainda, pequenas secções de folhas contendo lesões necróticas e cloróticas (encharcadas) foram examinadas após aquecimento em lactofenol claro e coloração com azul de Aman (0,1%), para observar hifas e outras estruturas no interior dos tecidos. **Incubação "in vitro":** Algumas lesões da Mancha por *Phaeosphaeria* foram superficialmente esterilizadas por imersão em cloramina T 1,5%, por 10 min e lavadas três vezes com água esterilizada, seguindo-se incubação em meio batata-dextrose-agar (BDA), a 25°C, com fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro. Algumas estruturas esféricas, encontradas sobre as lesões foram também removidas com pinça e incubadas em gotas de água, em lâminas escavadas. Outras estruturas esféricas, removidas das lesões, foram incubadas em agar-água 1% em placa de Petri.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras analisadas ao MEV, peritécios de *Phaeosphaeria maydis* e picnídios de *Phyllosticta* sp não foram encontrados. Contudo, estruturas de um fungo, aparentemente pertencente à Divisão Mastigomycotina foram encontradas em todas as amostras examinadas. Várias dessas estruturas foram identificadas como parte do ciclo de vida dessa espécie, como se segue: 1- Esporângio produzido na extremidade de um esporangióforo, com forma arredondada (diâmetro 23,9µm), com um orifício arredondado, ornamentado com espinhos. Esporângios colapsados apresentaram diâmetro variável de 11,74 a 19,70µm; 2- Zoosporos com formato reniforme e com remanescentes de flagelos (3,2-3,5µm x 1,7-2,0µm). 3- Oocito com parede ornamentada (diâmetro 10,4µm – 12,5µm); 4- Hifa muito fina (diâmetro 1,4µm a 2,0µm), sem septo visível, exceto na base do esporangióforo; ramificada, freqüentemente penetrando através de estômatos. Desenvolvimento do micélio sob e sobre a cutícula foliar. A ocorrência simultânea desse micélio fino e de, ao menos uma das estruturas reprodutivas (esporângio, oocito) (Figura 1) foi confirmada em 100% de todas as amostras analisadas. Em geral, o desenvolvimento do fungo foi mais intenso nas lesões jovens, em relação às lesões mais velhas. Nas amostras examinadas ao MET, apenas uma fina hifa, não septada, foi observada no interior de células do mesófilo, deterioradas. O exame sob microscópio estereoscópico permitiu (Figura 2) a observação de pequenas estruturas arredondadas, de coloração rosada ou amarelo-brilhante que, quando observadas sob microscópio composto, apareceram como estruturas hialinas, ornamentadas com espinhos e possuindo um orifício, sendo interpretadas como os mesmos esporângios observados ao microscópio eletrônico de varredura. Hifas finas, coradas em azul, foram observadas nas lesões submetidas à clarificação por aquecimento em lactofenol, com magnificação 400X. O fungo *Phaeosphaeria maydis* não foi isolado das lesões incubadas em BDA. Também não cresceu em meio BDA, qualquer fungo produzindo esporângios ou oocitos, semelhantes às estruturas observadas sob microscopia ótica e eletrônica. Nas preparações feitas em gota d'água em lâmina escavada, estruturas moveis, como zoosporos, foram observadas dois dias após incubação. O fungo encontrado foi identificado como uma espécie nova no gênero *Sclerophthora* (Peronosporaceae) (Ainsworth et al. 1973; Schaw, 1978; Alexopoulos et al. 1996) e considerada elevada a probabilidade, de ser esse o agente causal da doença, até então denominada "Mancha por *Phaeosphaeria*". Outros estudos são necessários para confirmação da identidade desse organismo, e de seu papel na etiologia da doença.

#### **LITERATURA CITADA**

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACWELL, M. **Introductory mycology** 4.ed. New York: J. Wiley , 1996. 869 p.

AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. **The fungi an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1973. v. IVB: A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi. 504 p.

BALMER, E. Doenças do milho. In: GALLI, F. (Coord.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. cap. 27, p 371-391.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais Doenças na Cultura de Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA – CNPMS, 1997. 80 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 26).

FERNANDES, F.T.; SANS, L.M.A. Influência das condições climáticas na ocorrência das lesões foliares por *Phaeosphaeria maydis*. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 20, 1994, Goiânia. **Resumos...** Goiânia, GO. ABMS/EMGOPA/EMBRAPA-CNPMS/UFG/ Emater-GO, 1994. p. 136.

HAYAT, M.A. **Principles and techniques of electron microscopy: Biological Applications**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 1989. 469 p.

PACCOLA-MEIRELLES, D. L., FERREIRA, A. S., MEIRELES, W.F., MARRIEL, I. E.,

CASELA, C. R. Detection of a bacterium associated with a Leaf Spot Disease of maize in Brazil. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 275-279, 2001.

RANE, M.S.; PAYAK, M.M.; RENFRO, B.L.A. **Phaeosphaeria leaf spot of maize**. [s.l.]: Indian Phytopathological Society, 1965. 10 p. (Bulletin, 3).

SHAW, C. G. Peronosclerospora species and other downy mildews of the gramineae. **Mycologia**, New York, v. 70, p. 594-604, 1978.

SHUELTER, A. R.; SOUZA, I. R. P.; TAVARES, F. F.; SANTOS, M. X. dos ; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, C. T. Controle genético da resistência do milho à mancha por *Phaeosphaeria*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.2, n.1, p.80-86, 2003.

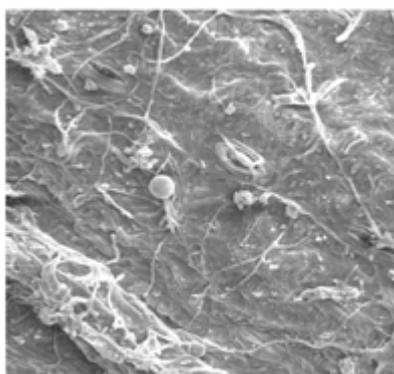


Figura 1. Esporângio e hifas na superfície da folha, MEV, 1000 X



Figura 2. Esporogios na superfície da folha, microscópio estereoscópio 100 X



---

XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

---