

# Pré-melhoramento visando resistência às doenças do milho<sup>1</sup>

Amanda Cristina Conrado Pereira<sup>2</sup>, Rodrigo Veras da Costa<sup>3</sup> e Luciano Viana Cota<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Patologia Clínica da Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas, Bolsista BIC JR do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

## Introdução

A cultura do milho está entre as mais importantes economicamente, ocupando o terceiro lugar como o cereal mais cultivado no mundo (FAO, 2009). Dentre os fatores que constituem limitantes para esta cultura, estão as doenças, que aumentam em severidade, acompanhando a expansão de área cultivada e a disponibilidade de cultivares geneticamente resistentes.

Trabalhos com as principais doenças do milho têm demonstrado que a mancha branca, a antracnose (*Colletotrichum graminicola*), a cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis*), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora*), a ferrugem tropical (*Physopella zeae*). (Mains), a ferrugem comum (*Puccinia sorghi*), a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) e enfezamento vermelho (“maize bushy stunt phytoplasma”) estão entre as principais doenças dessa cultura. Além das doenças acima mencionadas, novos desafios têm surgido ao longo dos últimos anos, como o aumento na severidade da antracnose foliar em algumas regiões do país e a ocorrência de podridões causadas por *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora*, antes mais comuns em áreas de plantio na região Sul do país, e em algumas áreas do Centro-Oeste (CASELA et al., 2008). Deste modo, a resistência a doenças é uma preocupação constante em programas de melhoramento de milho e a realização de estudos sobre a variabilidade de patógenos e a natureza da resistência nas condições brasileiras tornam-se imprescindíveis para um adequado controle das doenças que atacam o cereal. Entre as atividades que geram informações úteis para programas de melhoramento estão aquelas referentes a estudos da variabilidade genéticas dos patógenos, avaliação e caracterização de linhagens e estudos da herança da resistência. Estas atividades demandam a realização de uma série de atividades de rotina em laboratórios de Fitopatologia, tais como a obtenção de culturas monospóricas, preparo de meio de cultura, preservação de isolados e inoculações em casas de vegetação. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver atividades de manipulação, preservação e cultivo, isolamento e inoculação dos microrganismos causadores de doenças na cultura do milho.

## Metodologia

O trabalho foi realizado no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas-MG. Os trabalhos foram realizados com fungos foliares da cultura do milho de diversas regiões do Brasil.

Para atender aos objetivos do projeto foram realizados isolamentos e preservação de patógenos foliares da cultura do milho, caracterização e preservação de espécies de fungos, preparo de meios de cultura, preparo de inóculo para pesquisas em casa de vegetação, organização e esterilização de vidrarias usadas no laboratório e atividades em pesquisas de campo.

## **Material e Métodos:**

### **Recebimento e catalogação de amostras**

Todas as amostras recebidas foram catalogadas de acordo com:

- Localização da amostra e genótipo de origem;
- Sintomas observados nas folhas;
- Mês e ano da retirada do material da cultura do milho.

Para a identificação, isolamento, seleção de meios de cultura, reconhecimento dos sintomas e armazenamento foram usadas metodologias de acordo com as recomendações para fitopatologia (ALFENAS; MAFIA, 2007).

### **Preparo de meios de cultura para crescimento de microrganismos**

Para o crescimento de colônias dos patógenos, usadas nos experimentos ou na identificação, foram realizadas atividades de preparo e esterilização de diferentes meios de cultura, tais como meio FAA (farinha de aveia ágar), BDA (batata dextrose ágar), meio de lactose, meio V8, trypticase soy broth (TSB) e meio ágar-ágar (AA) para germinação de conídios e obtenção de culturas monospóricas utilizadas nos experimentos sobre variabilidade.

### **Isolamento e preservação de patógenos foliares das culturas de milho e sorgo**

Fragmentos de amostras foliares e de colmo com sintomas de doenças foram cortados, desinfestados em hipoclorito de sódio a 2% e, em seguida, plaqueados em meio de cultura adequado, tais como meio de FAA para *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora*, meio de lactose para *Exserohilum turcicum*, meio V8 para *Cercospora zeae-maydis* e TSB para *Pantoea ananatis*.

As placas foram incubadas em câmara de crescimento com temperatura de 27°C por quatro dias, seguindo-se uma raspagem para indução de esporulação, quando necessário. Após a produção de esporos, culturas monospóricas foram obtidas, como descritas abaixo.

### **Cultura monospórica**

Fragmentos do meio de cultura foram transferidos para tubos contendo água deionizada e esterilizada, fazendo-se uma diluição em série até  $10^{-4}$ . Em seguida, 1 mL foi distribuído em três placas de Petri contendo meio ágar-ágar, e estas foram incubadas em câmara de crescimento a 27°C até a germinação dos conídios. Após a germinação dos conídios, com uma peça própria, acoplada ao microscópio de luz, um único conídio foi coletado do meio de agar-ágar e transferido para tubos de ensaio contendo meio de farinha de aveia no qual, após crescimento da colônia, foi adicionado óleo mineral para preservação até o momento de uso.

### **Preparo de inóculo para pesquisas em casa de vegetação**

No momento do uso, os isolados monospóricos foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura adequado e mantidos sob luz contínua por 7 a 8 dias, até o momento de utilização.

Para indução de abundante esporulação em *C. graminicola*, realizou-se raspagem micelial aos 5 dias de crescimento e, após 5 a 6 dias, os isolados foram repicados para novas placas contendo meio FAA. O mesmo procedimento foi adotado para as placas contendo o fungo em crescimento, para a indução da esporulação necessária ao preparo de inóculo. Cinco dias depois, as placas de cada isolado foram inundadas com água destilada e raspadas com uma espátula para a liberação de conídios e contagem em câmara de Neubauer para padronizar a concentração de inóculo para  $10^6$  conídios/mL.

### **Atividade em pesquisas de campo**

Avaliações de experimentos em campo, tais como podridão de colmo, foram realizadas e acompanhadas durante o período de estágio.

Amostragem e catalogação de isolados também fizeram parte das atividades desenvolvidas em campo.

### **Conclusão**

O estágio realizado na Embrapa Milho e Sorgo, no período de maio de 2009 a março de 2010, foi de grande importância para minha formação como técnica em Patologia, pois permitiu a expansão de meus conhecimentos sobre microrganismos e metodologias utilizadas em laboratório, como técnicas e manutenção de microrganismos.

A experiência na Embrapa Milho e Sorgo foi de suma importância profissional, pessoal e acadêmica.

### **Referências**

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382 p.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 15 set. 2009.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. da S.; FERNANDES, F. T.; PINTO, N. F. J. A. Doenças foliares. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Sistemas de produção, 2). Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/doencasfoliares.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2010.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2005. v. 2, 663 p.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução a fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.