

## ESPORULAÇÃO DE *Diplodia maydis* E *Diplodia macrospora* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

### SPORULATION OF *Diplodia maydis* AND *Diplodia macrospora* IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Adriana Rodrigues da SILVA<sup>1</sup>; Fernando Cezar JULIATTI<sup>2</sup>

**RESUMO:** Dentre os patógenos que atacam as espigas de milho causando podridões, *Diplodia maydis* e *D. macrospora* são os mais destrutivos, causando reduções na produtividade e na qualidade de grãos. A esporulação destas espécies foi avaliada nos meios de cultura farinha de aveia-ágar (FAA), farinha de milho-ágar (FMA), creme de milho-ágar, milho+estigma-ágar, espiga de milho-ágar, V-8, FAA+vitamina, FMA+vitamina, creme de milho+vitamina, milho+estigma+vitamina, espiga de milho+vitamina, V-8+vitamina, grãos de sorgo, trigo e milho. Os meios foram incubados em temperatura de 26°C ± 2 com fotoperíodo de 12 h. A esporulação foi avaliada no 20º dia de incubação. Para *Diplodia maydis*, os meios grão de sorgo e FAA+vitamina proporcionaram a melhor esporulação, com produção de 2,6 x 10<sup>6</sup> e 2,3 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Para *Diplodia macrospora*, FMA e FAA, com produção de 1,3 x 10<sup>6</sup> e 1,2 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, respectivamente, foram os melhores.

**UNITERMOS:** *Zea mays*; *Stenocarpella maydis*; *S. macrospora*; Reprodução; Inóculo; Picnidiosporos.

## INTRODUÇÃO

As podridões brancas das espigas de milho (*Zea mays* L.) são causadas pelos fungos *Diplodia maydis* (Berk) Sacc. [= *D. zeae* (Schw.) Lev.] e *D. macrospora* Earle. O gênero *Diplodia* pertence à classe *Deuteromycetes* (*Coelomycetes*), Ordem *Sphaeropsidales* e Família *Sphaeropsidaceae* (PINTO; FERNANDES; OLIVEIRA, 1997).

Estes fungos têm recebido muita atenção dos pesquisadores nos últimos anos devido ao aumento da área plantada com lavouras de milho altamente tecnificadas (MARIO, 1998) e por serem considerados responsáveis pela redução da produtividade e qualidade de grãos, afetando diretamente o rendimento da cultura (BIZZETTO, 1999; BIZZETTO; HOMECHIN; SILVA, 2000a; CASA, 1997; LUZ, 1995; MARIO, 1998).

A incidência destes fungos nos grãos normalmente ocorre pela infecção natural da espiga no campo, favorecida por clima úmido e quente na fase de polinização, mau empalhamento e danos externos causados por insetos servem de porta de entrada para o patógeno (AGRIOS,

1997; PEREIRA, 2002; SHURTLEFF, 1992). Segundo Agrios (1997), as podridões da espiga e de grãos são favorecidas por falta de água no começo do desenvolvimento da planta e chuvas próximo ou em seguida à antese. Pode-se somar a isso alta população de plantas, alto teor de nitrogênio e baixo teor de potássio na planta e precocidade de híbridos.

A resistência genética oferece maior vantagem no manejo de podridões de espigas causadas por *Diplodia*. As empresas produtoras de sementes melhoradas testam centenas e até milhares de genótipos ao mesmo tempo. As diferenças nos níveis de infecção em diferentes locais e anos estão diretamente relacionadas com a metodologia usada para a inoculação e, principalmente, entre a quantidade de inóculo utilizado. A seleção para linhas resistentes requer um método seguro de inoculação, com a produção de infecção consistente entre anos e dentro de linhas, e sobretudo, simulando a ocorrência natural da doença. A técnica tem que ser exequível, devido ao grande número de plantas a serem inoculadas num curto espaço de tempo (KLAPPROTH; HAWK, 1991).

<sup>1</sup> Engenheira Agrônoma, Mestranda, Discente do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutor, Docente, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia.

Received: 11/03/04

Accept: 15/07/04

Em teste preliminar Silva (2004) avaliou diferentes meios de cultura para *Diplodia maydis* e *D. macrospora*, incubados à 20°C ± 2 na câmara de crescimento e em diferentes fotoperíodos. Após 90 dias de incubação, os fungos não haviam formado picnídios em nenhuma das combinações: diferentes meios e fotoperíodos. Esta observação confirmou a necessidade de temperaturas elevadas para a esporulação destes fungos em laboratório, conforme relatos de Correa (1978), Bizzetto, Homechin e Silva (2000b), Mario (1998) e Ullstrup (1949).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as duas espécies de *Diplodia* de ocorrência natural nos Cerrados em diferentes meios de cultura, em laboratório, para a obtenção de esporos viáveis e em quantidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias - ICIAG, da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

Isolados de *Diplodia maydis* e *D. macrospora* foram provenientes de espigas de milho coletadas em Itumbiara-GO, em abril de 2002, na Estação Experimental de Pesquisa da Empresa de Sementes Pioneer Ltda. Esporos viáveis retirados de picnídios formados sobre os grãos contaminados foram isolados em BDA acidificado e incubados em câmara de crescimento à 20°C ± 2, com fotoperíodo de 12 h, por 7 dias.

Os meios de cultura testados foram: diferentes grãos colocados separadamente em placas de Petri (milho, sorgo e trigo), farinha de aveia-ágar (FAA), FAA+vitamina (1 mL por litro de meio do complexo vitamínico Nutri-Ped® Poliminerais + associações), farinha de milho-ágar (FMA), FMA+vitamina, creme de milho-ágar, creme de milho-ágar+vitamina, milho+estigma-ágar, milho+estigma-ágar+vitamina, espiga de milho-ágar, espiga de milho-ágar+vitamina, V-8 e V-8+vitamina.

Os grãos foram embebidos em água destilada esterilizada por 12 h e depois autoclavados (20 min à 120°C) por 2 dias consecutivos.

Os meios creme de milho-ágar (200g de grãos de milho verde), milho+estigma-ágar (200g de grãos de milho verde, 100g de estigmas frescos) e espiga de milho-ágar (200g de grãos de milho verde, 100g de estigmas frescos, 30g de palha fresca) foram batidos em liquidificador, por

3 min, peneirados e cozidos em banho-maria por 20 min. Após o cozimento, foram acrescentados 20g de ágar e 20g de sacarose por litro de meio de cultura.

O meio com V-8 foi feito usando uma lata de suco V-8 (Campbell Co). O conteúdo da lata foi vertido num balão volumétrico com capacidade para 1 litro. Completou-se, então, o volume do balão com água destilada e esterilizada e acrescentou-se 20g de ágar e 20g de sacarose por litro de meio. Os meios foram então esterilizados em autoclave por 20 min à 120°C. Após a esterilização, corrigiu-se o pH para 5,5. Os meios foram então vertidos em placas de Petri. A adição da vitamina ocorreu após a esterilização dos meios em autoclave, com temperatura de aproximadamente 50°C.

A espécie avaliada, *D. maydis* ou *D. macrospora*, individualmente, foi repicada para placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura. Cada placa recebeu 1 disco de BDA de 6 mm de diâmetro colonizado com micélio ativo do fungo. As placas contendo os diferentes meios de cultura foram incubadas em fotoperíodo de 12 h e à 26°C ± 2 na câmara de crescimento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por uma placa de Petri contendo a combinação meio a ser avaliado e o fungo *D. maydis* ou *D. macrospora*.

A esporulação de *D. maydis* e *D. macrospora*, nos diferentes meios de cultura, foi avaliada no 20º dia de incubação. Cada placa de Petri, individualmente, foi triturada em liquidificador por 3 min com 150 mL de água destilada e esterilizada. A suspensão resultante da filtragem foi utilizada para determinar a concentração de esporos (picnidiosporos mL<sup>-1</sup>), através de quatro leituras em câmara de Neubauer.

## RESULTADOS

Os esporos de *Diplodia maydis* apresentaram 1 septo e mediram 15 - 37,5 µm x 5 - 6,25 µm, enquanto os de *Diplodia macrospora* apresentaram 0, 1 ou 2 septos e mediram 42,5 - 82,5 µm x 6,25 - 12,5 µm.

Foram observadas diferenças significativas entre os meios de cultura avaliados para as duas espécies de *Diplodia*. A produção de esporos dos fungos *Diplodia maydis* e *D. macrospora*, em laboratório, é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Número de esporos de *Diplodia maydis* e *D. macrospora* nos diferentes meios de cultura, após 20 dias de incubação em câmara de crescimento à 26°C. UFU, Uberlândia-MG, 2004.

<i>Diplodia maydis</i>		<i>Diplodia macrospora</i>	
MEIO DE CULTURA	Esporos/mL	MEIO DE CULTURA	Esporos/mL
Grãos de sorgo	2,6x10 <sup>6</sup> * a**	FMA	1,3x10 <sup>6</sup> * a**
FAA+vitamina	2,3x10 <sup>6</sup> a	FAA	1,2x10 <sup>6</sup> a
FAA	1,4x10 <sup>6</sup> b	Espiga de milho+vitamina	2,3x10 <sup>5</sup> b
FMA+vitamina	8,5x10 <sup>5</sup> c	Espiga de milho	2,1x10 <sup>5</sup> bc
Grãos de trigo	5,0x10 <sup>5</sup> cd	Creme de milho+ vitamina	1,9x10 <sup>5</sup> bcd
V8+vitamina	2,4x10 <sup>5</sup> de	Milho+estigma+ vitamina	1,4x10 <sup>5</sup> bcde
Espiga de milho+vitamina	1,6x10 <sup>5</sup> ef	Creme de milho	1,3x10 <sup>5</sup> bcde
Creme de milho+vitamina	1,4x10 <sup>5</sup> ef	Grãos de milho	1,1x10 <sup>5</sup> cdef
V8	1,0x10 <sup>5</sup> ef	FAA+ vitamina	1,0x10 <sup>5</sup> def
Espiga de milho	8,7x10 <sup>4</sup> ef	Grãos de trigo	8,5x10 <sup>4</sup> efg
Creme de milho	7,2x10 <sup>4</sup> ef	Milho+estigma	7,2x10 <sup>4</sup> efg
Milho+estigma	4,5x10 <sup>4</sup> ef	V8+ vitamina	5,2x10 <sup>4</sup> efg
Milho+estigma+vitamina	3,5x10 <sup>4</sup> f	V8	3,2x10 <sup>4</sup> fg
FMA	1,5x10 <sup>4</sup> f	FMA+ vitamina	1,5x10 <sup>4</sup> g
Grãos de milho	1,0x10 <sup>4</sup> f	Grãos de sorgo	1,0x10 <sup>4</sup> g

\*Dados originais. Para análise estatística os dados foram transformados em  $\sqrt{x+10}$ .

\*\*Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

## DISCUSSÃO

Os esporos de *Diplodia maydis* apresentaram somente um septo transversal. A presença de duas células é uma característica marcante desta espécie, mas, de acordo com Pereira (2002) e Sutton (1980) o número de septos pode variar de 0 a 2 em *Diplodia maydis* e de 0 a 3 em *Diplodia macrospora*. As dimensões dos esporos das duas espécies mostram que, os de *Diplodia macrospora* podem ter até três vezes o comprimento do esporo de *D. maydis*. A largura dos esporos varia menos devido ao seu formato fusiforme. Portanto, a medida dos isolados avaliados não apresentam variação significativa em relação ao relatado por Marasas e Van Der Westhuizen (1979), Mario (1998) e Pereira (2002).

O meio de grãos de sorgo e o FAA+vitamina proporcionaram a melhor produção de esporos para *Diplodia maydis*, com produção de 2,6 x 10<sup>6</sup> e 2,3 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, respectivamente, diferindo estatisticamente de todos os outros meios. O meio de grãos de milho proporcionou a menor produção, que foi de 1,0 x 10<sup>4</sup> esporos mL<sup>-1</sup>.

Os meios de FMA e FAA proporcionaram a melhor produção de esporos para *D. macrospora*, com 1,3 x 10<sup>6</sup> e 1,2 x 10<sup>6</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, respectivamente, diferindo estatisticamente de todos os outros meios.

O meio de grãos de sorgo e o FMA+vitamina

apresentaram as menores esporulações para *Diplodia macrospora*, com 1,0 x 10<sup>4</sup> e 1,5 x 10<sup>4</sup> esporos mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Nota-se que, as melhores médias de esporulação de *Diplodia macrospora* estão bem abaixo das melhores médias de *Diplodia maydis*, em laboratório. Isto enfatiza a dificuldade em se trabalhar com *Diplodia macrospora*, conforme já observado por Johann (1935), Mario (1998) e Morant, Waren e Von Qualen (1993).

Além das evidentes diferenças na quantidade de esporos produzidos pelas espécies estudadas, observa-se que há uma interação entre o meio de cultura e o fungo. Apesar da ocorrência natural e simultânea das duas espécies de *Diplodia* nas regiões cultivadas com milho, *D. macrospora* apresentou produção de esporos muito inferior àquela de *D. maydis*. Em ambiente das Regiões de Cerrado e do Rio Grande do Sul, *D. macrospora* apresenta infestação maior que a de *D. maydis* (informação verbal<sup>1</sup>; MARIO, 1998).

## CONCLUSÕES

1. O meio de cultura de grãos de sorgo e o de farinha de aveia-ágar+vitamina proporcionaram a melhor esporulação para *Diplodia maydis*.
2. Para *Diplodia macrospora*, os meios de cultura farinha de milho-ágar e farinha de aveia-ágar proporcionaram a melhor esporulação.

**ABSTRACT:** Among the pathogens that produce ear rot, *Diplodia maydis* and *D. macrospora* are the most destructive. They are responsible for the reduction of both yield and quality of grains. The sporulation of both species was evaluated in the following culture media: agar oat flour (AOF), agar corn meal (ACM), agar corn cream, agar corn + silk, agar corn ear, v-8, AOF + vitamin, ACM + vitamin, corn cream + vitamin, corn + silk + vitamin, corn ear + vitamin, v-8 + vitamin, grains of sorghum, wheat and corn. At 26°C ( $\pm 2$ ) in a photoperiod of 12 hours. The sporulation was evaluated on the 20<sup>th</sup> day of incubation. For *D. maydis*, the media sorghum grains and AOF + vitamin yielded the best sporulation, with production of  $2.6 \times 10^6$  and  $2.3 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup>, respectively. For *D. macrospora*, ACM and AOF, with production of  $1.3 \times 10^6$  and  $1.2 \times 10^6$  spores mL<sup>-1</sup>, respectively, were the best media.

**UNITERMS:** *Zea mays*; *Stenocarpella maydis*; *S. macrospora*; Reproduction; Inoculum; Picnidiospores.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Academic, 1997. 635 p.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; SILVA, H. P. Técnicas de inoculação de *Diplodia maydis* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.1, p. 21-29. maio. 2000a.

BIZZETTO, A.; HOMECHIN, M.; SILVA, H.P. *Diplodia maydis* e *Gibberella zea*: produção micelial e esporulação em substratos naturais e meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 88-91. jan. 2000b.

BIZZETTO, A. **Podridão de espigas de milho (*Diplodia maydis*): técnicas de inoculação**. 1999. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

CASA, R. T. ***Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* associados à semente de milho**. 1997. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

CORREA, C. F. P. **Métodos de inoculação e fontes de resistência para *Diplodia maydis* (Berk) Sacc. e *Fusarium moniliforme* Sheldon, agentes causadores de podridões de espigas de milho (*Zea mays* L.)**. 1978. 127 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz. Piracicaba.

FLETT, B. C.; McLAREN, N. W. Optimum disease potential for evaluating resistance to *Stenocarpella maydis* ear rot in corn hybrids. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 587-589, June. 1994.

JOHANN, H. *Diplodia macrospora* on corn in Brazil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 19, n. 9, p. 9-10, sept. 1935.

KLAPPROTH, J. C.; HAWK, J. A. Evaluation of four inoculation techniques for infecting corn ears with *Stenocarpella maydis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 10, p. 1057- 1060, Oct. 1991.

LUZ, W. C. **Podridão de *Diplodia*: Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa CNPT, 1995. 28 p. (Circular Técnica n. 5).

MARASAS, W. F. O.; VAN DER WESTHUIZEN, G. C. A. *Diplodia macrospora*: the cause of a leaf blight and cob rot in maize (*Zea mays* L) in South África. **Phytophylactica**, v.11, n. 1, p. 61-64, feb. 1979.

MARIO, J. L. **Comparação de métodos de inoculação de *Diplodia maydis* em espigas de milho e reação de híbridos em condições de infecção natural de *D. macrospora***. 1998. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo.

MORANT, M. A.; WARREN, H. L.; VON QUALEN, S. K. A synthetic medium for mass production of picnidiospores of *Stenocarpella* species. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 4, p. 424-426, oct. 1993.

PEREIRA, J. L. A. **Fungos causadores de podridões em colmos e espigas**. Disponível em: <<http://www.orbita.starmedia.com/~fitopatologia/diplodia>>. Acesso em: 18 maio 2002.

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. Milho (*Zea mays* L.): controle de doenças. In: DO VALE, F. X. R. & ZAMBOLIM, L. (ed.) **Controle de Doenças de plantas: Grandes Culturas**. Viçosa: UFV, 1997. p. 538-555.

SILVA, A. R. Métodos de inoculação de *Diplodia maydis* e *Fusarium moniliforme* em três populações de milho. 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. 105 p.

SUTTON, B. C. **The coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

ULLSTRUP, A. J. A method for producing artificial epidemics of *Diplodia* ear rot. **Phytopathology**, St. Paul, v. 39, n. 2, p. 93-101, feb. 1949.