

# Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zae-maydis*

Kátia Regiane Brunelli<sup>1,2</sup>, Ana Carolina Fazza<sup>1</sup>, Cândido Athayde Sobrinho<sup>1,3</sup>, Luis Eduardo Aranha Camargo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola – ESALQ-USP, CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP; <krbrunelli@yahoo.com.br>.

<sup>2</sup> Bolsista CAPES. <sup>3</sup> Embrapa Meio-Norte, CP 01, 64006-220, Teresina – PI, bolsista CNPq. Parte da Tese de Doutorado da primeira autora.

Autor para correspondência: Kátia Regiane Brunelli. <krbrunelli@yahoo.com.br>.

Data de chegada: 09/08/04. Aceito para publicação em: 15/08/05.

1099

## ABSTRACT

Brunelli, K.R.; Fazza, A.C.; Athayde Sobrinho, C.; Camargo, L.E.A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zae-maydis*. *Summa Phytopatologica*, v. 32, p. 92-94, 2006.

Some fungal species, like *Cercospora zae-maydis*, causal agent of maize gray leaf spot, do not satisfactorily produce spores in artificial media. The conidial production of *C. zae-maydis* was evaluated on seven culture media (V8, tomato juice, coconut water, oat, PDA, maize leaf extract and maize leaf extract plus CaCO<sub>3</sub>) under two light exposure regimens (12-hours photoperiod or six days under continuous light followed by three days of continuous darkness). The experiment was

arranged as a 7 x 2 factorial design in a completely randomized design with five replicates. A single petri dish containing 20 mL of culture media inoculated with 200 µL of conidial suspension (8 x 10<sup>4</sup> conidia/mL) comprised the experimental unit. Plates were incubated at 27°C for nine days. The highest conidial production was obtained on V8 and tomato juice media under 12-hours photoperiod, resulting in the production of 22.4 and 28.62 x 10<sup>4</sup> conidia/mL respectively.

Additional keywords: *Zea mays*, maize, gray leaf spot.

## RESUMO

Brunelli, K.R.; Fazza, A.C.; Athayde sobrinho, C.; Camargo, L.E.A. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zae-maydis*. *Summa Phytopatologica*, v. 32, p. 92-94, 2006.

Algumas espécies fúngicas não esporulam satisfatoriamente em meio de cultura, a exemplo de *Cercospora zae-maydis*, agente causal da cercosporiose do milho. A esporulação deste patógeno foi avaliada em sete meios de cultura agarizados (V8, suco de tomate temperado, água de coco, aveia, BDA, extrato de folha de milho e extrato de folha de milho + CaCO<sub>3</sub>) sob dois regimes luminosos (fotoperíodo de 12 horas e seqüencial – 6 dias claro/3 dias escuro). O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 7 x 2, com os tratamentos dispostos em delineamento

inteiramente casualizado com cinco repetições. A parcela experimental compreendeu uma placa de petri contendo 20 mL de meio de cultura sobre o qual foram colocados 200 µL de uma suspensão de 8 x 10<sup>4</sup> esporos/mL. As culturas foram posteriormente incubadas a 27°C durante nove dias. Os meios V8 e suco de tomate temperado (STT) sob regime de fotoperíodo 12h/12h, foram aqueles que apresentaram melhor indução de esporulação, resultando na produção de 22,4 x 10<sup>4</sup> conídios/mL e 28,62 x 10<sup>4</sup> conídios/mL, respectivamente.

Palavras-chave: *Zea mays*, milho, mancha de cercospora.

*Cercospora zae-maydis* Tehon & Daniels é um importante patógeno da cultura do milho, causando a doença foliar conhecida como mancha de cercospora ou cercosporiose. Sob condições ambientais adequadas e hospedeiro suscetível já foram relatados danos de até 65% na produção (10). Essa redução deve-se basicamente à indução precoce de senescência na planta causada pelo abundante número de lesões. No Brasil, esta doença causou sérias epidemias nas safras de 2000/2001, quando muitos dos híbridos mostraram-se suscetíveis. Nas safras de 2002/

2003, a mancha de cercospora foi controlada, em parte, pelo emprego de híbridos resistentes. Porém, em algumas regiões de Goiás e Minas Gerais, o patógeno ainda causa danos significativos à produção. Como o controle da doença é realizado, prioritariamente, pelo uso de híbridos resistentes, a determinação de condições ótimas para a produção de esporos *in vitro* é importante para trabalhos que utilizam inoculação artificial para identificar genótipos resistentes ao patógeno.

Espécies do gênero *Cercospora* caracterizam-se pelo lento

crescimento e pela reduzida esporulação em meios de cultura. Agentes físicos são capazes de induzir ou inibir o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da maioria dos fungos, dentre eles os mais importantes são a temperatura e a luminosidade. A temperatura modula a produção de proteínas e enzimas responsáveis pela manutenção da célula fúngica (2). Estudos envolvendo espécies de *Cercospora* demonstram que temperaturas entre 25 e 27°C são ideais para produção de esporos (1, 6). A luminosidade exerce efeito direto sobre a célula fúngica, induzindo ou inibindo a formação de estruturas de reprodução, embora haja algumas espécies que são indiferentes à quantidade e/ou qualidade da luz (4). Este trabalho teve por objetivo selecionar combinações de meios de cultura e regime luminoso que promovam abundante esporulação de *C. zeaе-maydis*.

Os meios de cultura utilizados foram: V8 (200 mL de suco de vegetais V8 “Campbell Soup Co.”; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO<sub>3</sub> e 800 mL de água destilada), STT (200 mL de suco de tomate temperado “Super bom”; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO<sub>3</sub> e 800 mL de água destilada), AV (20 g de farinha de aveia “Otker”; 16 g de ágar e 1000 mL de água), CO (1000 mL de água de coco “Sococo” e 16 g de ágar), FM (extrato de 80 g de folha de milho picada e levada ao fogo até levantar fervura; 16 g de ágar e água até completar 1000 mL), FM-CaCO<sub>3</sub> (FM + 3,2 g de CaCO<sub>3</sub>) e BDA (extrato de 200 g de batata; 20 g de dextrose; 16 g de ágar e água até completar o volume de 1000 mL). Após o preparo, estes meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e vertidos assepticamente em placas de petri.

O isolado monospóricó IN-5 utilizado neste ensaio foi obtido por isolamento direto a partir de folha com sintoma típico da doença coletada em campo de produção no município de Indaiatuba (MG). Este isolado foi cultivado em meio V8 durante nove dias, sob fotoperíodo 12h/12h (12 horas de claro seguido de 12 horas de escuro), até a formação de esporos. Foi preparada uma suspensão de 8 x 10<sup>4</sup> esporos/mL e 200 µL foram depositados em cada placa de petri contendo 20 mL de meio de cultura. Estas foram incubadas durante nove dias sob um dos regimes de luminosidade: fotoperíodo 12h/12h ou seqüencial com seis dias de claro contínuo seguido por três dias de escuro. As colônias foram incubadas em câmaras de crescimento (Tecnal TE-400) à temperatura de 27°C.

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 7 x 2 (meios de cultura x luminosidade), totalizando 14 tratamentos com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Cada parcela consistiu de uma placa de petri.

Decorrido o período de incubação, as placas receberam 10 mL de água destilada contendo 0,01% de Tween 20 e, com o auxílio de uma lâmina de vidro, as colônias foram delicadamente raspadas para liberação dos conídios. A suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze para retenção dos fragmentos miceliais e restos de meio de cultura. O número de conídios de cada parcela foi determinado ao microscópio ótico com auxílio de hemacitômetro. Os dados da contagem conidial de cada parcela foram transformados para  $\sqrt{(x+1)}$  e submetidos a análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Tukey em nível de 1% de significância, com o auxílio do programa estatístico SAS (versão 6.2 – SAS Institute, Cary, NC).

Houve diferenças significativas entre tratamentos com relação à esporulação de *C. zeaе-maydis* (Tabela 1). As colônias

fúngicas formadas nos meios V8, STT, AV e CO apresentaram grande quantidade de conidióforos, mas apenas os meios V8 e STT induziram abundante formação de esporos, tanto sob fotoperíodo quanto sob regime de luz seqüencial (Tabela 1). O meio BDA estimulou a formação de pequena quantidade de conidióforos. Já nos meios FM e FM-CaCO<sub>3</sub>, praticamente não houve formação destas estruturas. Os meios V8 e STT são aqueles que apresentam maior riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos complexos. Estas características são citadas por diversos autores como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos mitospóricos (5, 8). O meio V8 é relatado como bom indutor de esporulação em várias espécies do gênero *Cercospora* (1, 3, 6). Também o meio STT, uma variação do meio V8, foi indicado por Queiroz & Menezes (6) como capaz de induzir formação de esporos em *Cercospora nicotianae*. Comparando ambos os meios, STT mostra-se mais vantajoso do ponto de vista prático, uma vez que o mesmo é composto por um produto nacional facilmente adquirido no Brasil.

Neste estudo, a luz não influenciou a morfologia da colônia, crescimento micelial ou o tempo de formação da colônia. Porém, a quantidade de conídios produzidos sob fotoperíodo foi significativamente superior (Tabela 1). A luminosidade pode exercer efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas reprodutivas. Trione & Leach (9) relataram que, para fungos cuja esporulação é induzida pela luz, este agente físico age diretamente na ativação de enzimas-chave envolvidas na esporogênese. Os mesmos autores afirmam ainda que a quantidade e a qualidade da luz necessária para induzir a formação de estruturas reprodutivas variam de acordo com a espécie fúngica. Beckman & Paine (1) já haviam relatado a maior produção de conídios quando submetteram um isolado de *C. zeaе-maydis* a fotoperíodo

**Tabela 1.** Produção de conídios de *Cercospora zeaе-maydis* submetido a sete meios de cultura e dois regimes luminosos.

Meio de cultura <sup>2</sup>	Esporulação (10 <sup>4</sup> conídios/mL) <sup>1</sup>		Média
	Fotoperíodo	Luz seqüencial <sup>3</sup>	
STT	28,62	12,36	20,50 a
V8	22,40	5,350	13,90 a
CO	0,225	0,850	0,54 b
AV	0,550	0,125	0,34 b
BDA	0,275	0,025	0,15 b
FM	0,850	0,00	0,42 b
FM-CaCO <sub>3</sub>	0,425	0,025	0,22 b
Média	7,62 A	2,68 B	
CV%	5,8		

<sup>1</sup> Concentração de esporos obtida pela adição de 10 mL de água/placa; médias de cinco repetições; médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p=0,01).

<sup>2</sup> Meios de cultura agarizados: STT - suco de tomate temperado + CaCO<sub>3</sub>, V8 - suco de vegetais V8 + CaCO<sub>3</sub>, CO - água de coco, AV - farinha de aveia, BDA - batata dextrose, FM - extrato de folhas de milho, FM - CaCO<sub>3</sub> - extrato de folha de milho + CaCO<sub>3</sub>.

<sup>3</sup> Luz seqüencial = seis dias de luz contínua seguidos por três dias de escuro.

do 12/12. Estes verificaram que dez dias de claro contínuo seguido de três dias de escuro induziram a esporulação, embora em quantidade inferior aquela do fotoperíodo. A ausência de luz para indução da esporulação já foi relatada para diversos fungos fitopatogênicos como *Alternaria brassicae* (7), *Alternaria solani* (5) e *Mycosphaerella fijiensis* (3). Nestes casos, a luz age como foto-inibidor da esporulação. Assim, o fornecimento de luz seguido por um período de escuro é necessário para a completa reprodução destes patógenos. Estudos preliminares (dados não publicados) indicaram que a submissão de colônias de *C. zeaе-maydis* a regime de luz contínua inibiram a formação de esporos, mas não a de conidióforos. Assim, infere-se que esta espécie fúngica necessita de alternância de regime luminoso para completar a reprodução.

Com base no exposto, a melhor condição de incubação visando a produção de conídios de *C. zeaе-maydis* deu-se pela associação do regime de luz 12 horas claro/12 horas escuro com os meios de cultura STT ou V8.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beckman, P.M.; Payne, G.A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeaе maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.2, p.286-289, 1983.
2. Griffin, D. H. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.
3. Hanada, R.E.; Gasparotto, L.; Pereira, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.2, p.170-173, 2002.
4. Hawker, L.E. **The physiology of reproduction in fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 1957. 128p.
5. Lukens, R.J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. **American Journal of Botany**, New York, v.50, n.7, p.721-724, 1963.
6. Queiroz, F.M.; Menezes, M. Efeito de meios de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.4, p.545-547, 1993.
7. Rotem, J.; Bickle, W.; Kranz, J. Effect on environment and host on sporulation of *Alternaria macrospora* in cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, n.3, p.263-266, 1989.
8. Strandberg, J.O. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, St. Paul, v.77, n.7, p.1008-1012, 1987.
9. Trione, E.J.; Leach, C.M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, n.8, p.1077-1083, 1969.
10. Ward, J.M.J.; Stromberg, E.L.; Nowell, D.C.; Nutter JR, F.W. Gray leaf spot – A disease of global importance in maize production. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, n.10, p.884-895, 1999.