

MÉTODO SIMPLES PARA DIFERENCIAR *Diplodia macrospora* DE *D. maydis* EM TESTES DE PATOLOGIA DE SEMENTES DE MILHO

JUSTINO LUIZ MARIO & ERLEI MELO REIS

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Cx. Postal 611, Passo Fundo-RS, CEP 99001-970, e-mail: erleireis@uol.com.br

(Aceito para publicação em 26/07/2001)

Autor para correspondência: Erlei Melo Reis

MARIO, J.L. & REIS, E.M. Método simples para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho. Fitopatologia Brasileira 26:670-672. 2001.

RESUMO

Descreve-se neste trabalho um método para diferenciar *Diplodia macrospora* de *D. maydis* em testes de patologia de sementes de milho (*Zea mays*). Os sintomas da podridão branca em espigas e grãos de milho infetados por esses fungos são idênticos, porém, os patógenos diferem, principalmente, pela coloração das colônias desenvolvidas a partir de sementes de milho infetadas. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio e dispostas em gerbox, contendo três camadas de papel-de-filtro embebido com água esterilizada e colocadas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C. A diagnose foi baseada na coloração das colônias desenvolvidas sobre o

papel-de-filtro. Após 15 dias de incubação, as colônias de *D. macrospora* permaneceram com coloração branca a bege, enquanto as de *D. maydis*, que originalmente eram brancas, tornaram-se de pardo-escuras a escuras com formação de picnídios. Conclui-se que muitos trabalhos feitos em patologia de sementes de milho referentes a *D. maydis* podem ter incluído na diagnose as duas espécies por não dispor-se de um método que possibilite a diferenciação segura entre os dois patógenos.

Palavras-chave: Podridão-de-diplodia e podridão branca da espiga.

ABSTRACT

A simple method to differentiate *Diplodia macrospora* from *D. maydis* in seed pathology tests with corn

A simple method to differentiate *Diplodia macrospora* from *D. maydis* in corn seeds is described in this paper. The white rots these fungi cause on corn (*Zea mays*) ear and grains have identical symptoms. However, *D. macrospora* and *D. maydis* give rise to colonies of different colours when infected seeds are incubated on filter paper. Corn seeds are disinfested with sodium hypochloride,

placed in gerboxes containing two layers of wet filter paper, and then incubated at 25 ± 2 °C. After 15 days, colonies of *D. macrospora* remain white to beige while those of *D. maydis*, originally white, turn dark and form picnidia. Because current seeds pathology tests do not differentiate these fungus species, we believe that *D. macrospora* may have been mistakenly diagnosed as *D. maydis*.

Nos últimos cinco anos, as indústrias que utilizam os grãos de milho (*Zea mays* L.) como matéria prima para alimentação humana e animal têm-se preocupado com a qualidade do produto, sobretudo com podridões de espiga que originam os chamados "grãos ardidos". Os grãos ardidos são causados principalmente por fungos dos gêneros *Diplodia* e *Fusarium*. Atualmente, a qualidade de grãos de milho tem sido mais considerada, especialmente na região Sul, onde as condições climáticas, com dias quentes (25-30 °C) e noites amenas (12-15 °C), têm favorecido principalmente as doenças incitadas por *Diplodia* spp. (Pereira, 1995).

Os fungos *Diplodia macrospora* Earle e *D. maydis* (Berk.) Sacc. são patogênicos ao milho, incitando podridões de raízes, do colmo e de espigas e também morte de plântulas (Laterell & Rossi, 1983; Mora & Moreno, 1984; Morant *et*

al., 1993). Quanto a *D. macrospora*, o patógeno pode também causar manchas foliares, como relatado no Sul dos Estados Unidos, África do Sul e sobretudo, em áreas de clima tropical e subtropical (Marasas & Van Der Westhuizen, 1970; Morant *et al.*, 1993). Quanto à ocorrência de *D. macrospora* no Brasil, causando mancha foliar em milho, encontraram-se duas citações: a primeira no estado de São Paulo, relatada por Johann (1935) e a segunda referente à presença da doença na Bahia, descrita por Ram *et al* (1973). O fungo tem sido encontrado com frequência nos cultivos de milho na região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul, contudo não lhe é dada a devida atenção por ser confundido com *D. maydis* (Mario & Prestes, 1997). Apenas com base nos sintomas decorrentes das infecções, não é possível distingui-los em espigas ou em grãos de milho. No entanto, quanto à infecção foliar causada por *D. macrospora*

(Marasas & Van Der Westhuizen, 1979; Mora & Moreno, 1984; Del Rio, 1990; Morant *et al.*, 1993) é facilmente diagnosticada.

Em exame microscópico, os dois fungos podem ser diferenciados morfológicamente pelo tamanho dos conídios, pois os esporos de *D. macrospora* são duas a três vezes mais longos e mais largos do que os de *D. maydis* (Marasas & Van Der Westhuizen, 1979). Outra maneira de diferenciá-los é pelo plaqueamento de grãos infetados com *Diplodia* spp. em meio agarizado de batata-sacarose + antibiótico. Nesse substrato, após 20 dias de incubação, as colônias de *D. maydis* apresentam-se com cor salmão-escura, com o reverso de cor bege a pardo-clara, podendo tornar-se escura. Por sua vez, as de *D. macrospora* permanecem com coloração superficial branca e o reverso da colônia com cor bege (Marasas & Van Der Westhuizen, 1979). Também se deve acrescentar que *D. macrospora*, em meio de cultura, tem uma produção de picnídios, lenta e em menor quantidade do que a de *D. maydis* (Johann, 1935; Morant *et al.*, 1993).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples que possa ser usado nos laboratórios de patologia de sementes, visando quantificar a presença e a frequência de cada uma das espécies de *Diplodia* patogênicas ao milho..

As duas espécies de *Diplodia* foram diferenciadas a partir de grãos de milho naturalmente infetados, obtidos de espigas com sintomas de podridão branca coletadas em plantas com infecção natural, ou inoculadas com *D. maydis* na Unidade Experimental da Braskalb em Coxilha - RS. As espigas foram debulhadas com debulhador manual e os grãos homogeneizados, previamente à coleta das amostras. Os grãos foram desinfestados durante três minutos com solução de hipoclorito de sódio a 2% e, posteriormente, lavados durante um minuto em água destilada esterilizada. Os grãos assim tratados foram dispostos em caixas gerbox de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm de altura), contendo três lâminas de papel-de-filtro embebidas em água destilada-esterilizada. Em cada caixa, foram colocados dez grãos e incubados a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 12 h propiciado por lâmpadas fluorescentes de 40 W, distantes 46,5 cm da superfície dos recipientes. Após cinco dias de incubação os grãos não infetados por *Diplodia* spp. foram retirados, sendo os demais mantidos sob incubação por mais 10 dias. A remoção foi feita para evitar que as colônias dos grãos infetados colonizassem os não infetados e confundissem o observador no processo de avaliação da incidência das espécies. Neste trabalho foram avaliados 3.600 grãos de milho.

Após três dias de incubação, detectou-se o crescimento de micélio branco a partir dos grãos infetados por *Diplodia* spp. No décimo segundo dia, o micélio começou a diferenciar-se pela alteração da coloração das colônias originadas dos grãos infetados. O micélio das colônias de *D. maydis* tornou-se gradativamente mais escuro ganhando, finalmente, uma cor pardo-escura. Com aproximadamente 15 dias de incubação, tornou-se nítida a diferenciação das colônias quanto à coloração; as de *D. maydis* adquiriram coloração pardo-escura a escura, com a formação de

numerosos picnídios na superfície da massa miceliana; enquanto que as de *D. macrospora* permaneceram com uma coloração branca, às vezes bege, sem a formação de picnídios (Figura 1). Tanto *D. macrospora* como *D. maydis* produzem toxinas, que podem causar problemas à saúde humana ou animal através do consumo de grãos ou de alimentos derivados de grãos contaminados (De Leon & Perz, 1970; Prozesky *et al.*, 1994). Por conseguinte, a metodologia desenvolvida nesse trabalho pode contribuir não somente com os testes de patologia de sementes mas também como uma ferramenta auxiliar em trabalhos toxicológicos com micotoxinas. Por outro lado, os pesquisadores que trabalham com melhoramento de milho também terão a possibilidade de fazer análise de grãos oriundos de espigas com sintomas de podridão branca, identificando qual a espécie de *Diplodia* predominante em seu trabalho de pesquisa de modo a avaliar a reação de material para cada espécie separadamente.

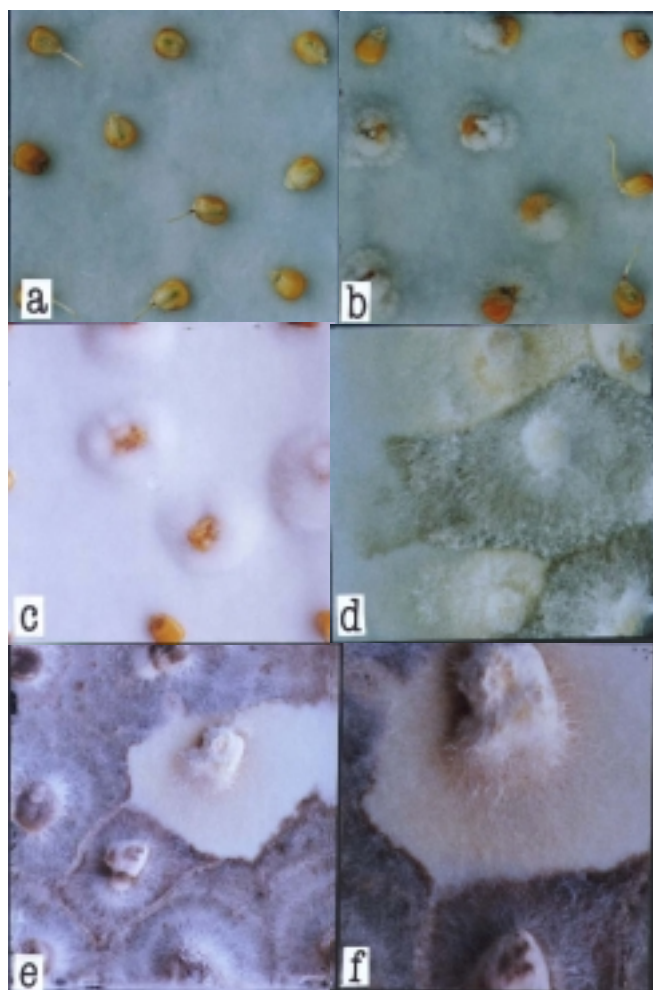


FIG. 1 - Diferenciação pela cor das colônias de *Diplodia macrospora* (colônias claras) e *D. maydis* (colônias escuras), em grãos de milho (*Zea mays*), pelo método de papel-de-filtro. Fotografia no primeiro (a), quarto (b), sexto (c), décimo (d) e 15º dia de incubação (e, f).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE LEON, C. & PEREZ, J. Micotoxinas produzidas por *Diplodia maydis* y su efecto en pollitos. In: Memorias del Sexto Congreso Nacional de Fitopatología. México. 1970
- DEL RIO, L. Maiz muerto en Honduras provocado por el complejo *Diplodia Fusarium*. Manejo Integrado de Plagas 18:42-53. 1990.
- JOHANN, H. *Diplodia macrospora* on corn in Brazil. Plant disease reporter 19:9-10. 1935.
- LATTERELL, F.M. & ROSSI, A.E. *Stenocarpella macrospora* (= *Diplodia macrospora*) and *S. maydis* (= *D. maydis*) compared as pathogens of corn. Plant disease 67:725-729. 1983.
- 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 Africa. Phytophylactia 11:61-64. 1979.
- MARIO, J.L. & PRESTES, A.M. Avaliação da resistência à mancha foliar causada por *Diplodia macrospora* em genótipos de milho. Fitopatologia brasileira 22 (Suplemento):280. 1997.
- MORA, L.E. & MORENO, R.A. Cropping pattern and soil management influence on plant disease: I. *Diplodia macrospora* leaf spot of maize. Turrialba 34:35-40. 1984.
- MORANT, M.A., WARREN, H.L. & VON QUALEN, S.K. A synthetic medium for mass production of picnidiospores of *Stenocarpella* species. Plant disease 77:424-426. 1993.
- PROZESKY, L., KELLERMAN, T.S. & SWART, D.P. Perinatal mortality in lambs of ewes exposed to cultures of *Diplodia maydis* (= *Stenocarpella maydis*) during gestation. A study on the central-nervous-system lesions. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 61:247-253. 1994.