

194

Circular  
TécnicaSete Lagoas, MG  
Dezembro, 2013

## Autores

**Luciano Viana Cota**Engenheiro Agrônomo,  
D.Sc. em Fitopatologia,  
Pesquisador Embrapa Milho  
e Sorgo, Rod. MG 424,  
Km 65, caixa postal 151,  
CEP: 35701-970, Sete  
Lagoas, MG. luciano.cota@  
embrapa.br**Dagma Dionísia da Silva**Engenheira Agrônoma,  
D.Sc. em Fitopatologia,  
Pesquisadora Embrapa  
Milho e Sorgo, Rod. MG  
424, Km 65, caixa postal  
151, CEP: 35701-970, Sete  
Lagoas, MG. dagma.silva@  
embrapa.br**Rodrigo Veras da Costa**Engenheiro Agrônomo,  
D.Sc. em Fitopatologia,  
Pesquisador da Embrapa  
Milho e Sorgo, Rod. MG  
424, Km 65, caixa postal  
151, CEP: 35701-970,  
Sete Lagoas, MG. rodrigo.  
veras@embrapa.br

## Avaliação de Metodologia para Inoculação de *Stenocarpella maydis* em Espigas de Milho

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de milho, com mais 77 milhões de toneladas produzidas na safra 2012/2013 e uma produtividade média 4.956 kg/ha (CONAB, 2013). A produtividade média brasileira, ainda é baixa, se comparada com o potencial produtivo dos híbridos disponíveis no mercado. Nos últimos anos, as doenças têm se tornado fator limitante para o aumento da produtividade brasileira, seja pela redução da quantidade de grãos produzidos seja pela qualidade dos grãos (COSTA et al., 2009; PINTO et al., 2007; CASELA et al., 2006). Relatos de perdas na produtividade por causa do ataque de patógenos têm sido frequentes nas principais regiões produtoras do país. Modificações ocorridas no sistema de produção, que resultaram no aumento da produtividade, foram, também, responsáveis pelo aumento da incidência e severidade de doenças. Desse modo, a expansão da fronteira agrícola, a ampliação das épocas de plantio (safra e safrinha), a adoção do sistema de plantio direto, o aumento do uso de sistemas de irrigação, a ausência de rotação de cultura e o uso de materiais suscetíveis têm promovido modificações importantes na dinâmica populacional dos patógenos, resultando no surgimento, a cada safra, de novos problemas para a cultura do milho, relacionados à ocorrência de doenças (COSTA et al., 2009, 2010).

Dentre as doenças que atacam a cultura milho no Brasil, merecem destaque as podridões de espiga e grãos ardidos (MOREMOHOLO et al., 2010; COSTA et al., 2009; PINTO et al., 2007; CASELA et al., 2006). Os fungos *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sacc., *S. macrospora* Earle e *Fusarium moniliforme* Sheld e *F. graminearum* (Schw) são os principais agentes causadores de podridões do colmo e da espiga, originando os grãos ardidos, que reduzem o rendimento e depreciam a qualidade do produto.

As principais medidas recomendadas para o manejo de doenças de espigas e grãos ardidos na cultura do milho são: 1) utilização de cultivares resistentes; 2) realização do plantio em época adequada, para evitar que os períodos críticos para a cultura não coincidam com condições ambientais mais favoráveis ao desenvolvimento da doença; 3) utilização de sementes de boa qualidade e tratadas com fungicidas; 4) utilização da rotação com culturas não suscetíveis; 5) rotação de cultivares; 6) medidas de manejo adequado da lavoura, tais como: utilizar densidade de população de plantas recomendada para o híbrido, controle de pragas e de invasoras e colheita na época correta. Essas medidas, além de trazerem um benefício imediato ao produtor, por reduzirem o potencial de inóculo dos patógenos presentes na lavoura, contribuem para a maior durabilidade

e estabilidade da resistência genética das cultivares comerciais. A estratégia mais atrativa de manejo de doenças é a utilização de cultivares geneticamente resistentes, uma vez que o seu uso não exige nenhum custo adicional ao produtor, não causa nenhum tipo de impacto negativo ao meio ambiente, é perfeitamente compatível com outras alternativas de manejo e é, muitas vezes, suficiente para o controle da doença (COSTA et al., 2009; PINTO et al., 2007; CASELA et al., 2006).

A padronização e seleção dos melhores métodos de inoculação são importantes para a seleção de linhagens e cultivares resistentes, para avaliação de medidas de manejo e epidemiologia da doença. Para os estudos envolvendo patógenos de espiga na cultura do milho, os métodos de inoculação normalmente utilizados são: injeção de suspensão de esporos na espiga, injeção de suspensão esporos na bainha das espigas, pulverização das espigas com suspensão de esporos, inóculo natural (MÁRIO et al., 2011; CLEMENTS et al., 2003; BENSCH et al., 1992; KLAPPROTH; HAWK, 1991). O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da inoculação de espigas de milho utilizando metodologia de inoculação com palito de dente imerso em suspensão de esporo de *Stenocarpella maydis*. A metodologia foi inicialmente desenvolvida para inoculação de colmos com *Colletotrichum graminicola* (COTA et al., 2010; COSTA et al., 2010).

## Material e Métodos

O isolado de *S. maydis* foi obtido em amostra de grãos de milho apresentando sintoma de podridão-branca-da-espiga. Para o isolamento, os grãos foram inicialmente desinfestados por meio da imersão em hipoclorito de sódio a 2% por cinco minutos. Em seguida, os grãos foram lavados duas vezes em água destilada esterilizada. Após esse procedimento, foram colocados 25 grãos em cada caixa tipo gerbox contendo papel

de filtro umedecido com ágar-água (AA) a 5%. As caixas Gerbox foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Após a esporulação (formação de picnídios na superfície dos grãos), os grãos foram acondicionados em tubos de ensaio, e adicionou-se, aproximadamente, 5 mL de água destilada esterilizada (ADE), seguindo-se de uma raspagem superficial e agitação para liberação dos conídios. A partir das suspensões originais, foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-3}$ , para obtenção de suspensões de esporos com a concentração de 50-100 conídios/mL. Um mililitro dessa suspensão foi transferida para placas de Petri contendo meio AA e mantidas em câmaras de crescimento sob luz fluorescente intermitente a 25 °C, durante 12 horas, para induzir a germinação dos conídios. Conídios germinados e isolados foram retirados individualmente do meio AA, sob microscópio óptico, e transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Após o desenvolvimento das colônias foram adicionados 10 mL de óleo mineral estéril para preservação das culturas.

## Produção e Preparo do Inóculo

Para produção do inóculo, culturas monospóricas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio FAA (Farinha-Aveia-Ágar). Os tubos foram mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, para indução da esporulação. Após 15 a 20 dias, foi adicionado ADE sobre as colônias e em seguida foi feita uma raspagem superficial para desalojar os conídios. A suspensão de esporos foi filtrada em dupla camada de gaze e a concentração, ajustada para  $10^5$  conídios/mL, com auxílio de um hemacitômetro.

## Inoculação

O método de inoculação testado foi o de palito de dente imerso em solução de esporos (COSTA et al., 2010; COTA et al., 2010). Os palitos de dente foram fervidos por duas vezes em água deionizada para a eliminação de resíduos que pudessem estar presentes neles,

sendo feita a troca de água nas duas fervuras. Os palitos foram secos em estufa a 60 °C, sendo posteriormente acondicionados em béckers para autoclavagem. O híbrido plantado foi o DKB390. As inoculações foram realizadas em condições de campo quando as plantas estavam no estágio fenológico R2 (**grão bolha d'água**). As espigas foram perfuradas com auxílio de um furador e o orifício foi preenchido com um palito embebido na suspensão de esporos de *S. maydis* com concentração de  $10^5$  esporos/mL (Figura 1a). Foram utilizadas 10 plantas para cada parcela e a testemunha constou de plantas com a perfuração e inserção de palito sem inóculo.

Para avaliar o efeito da época de inoculação foi conduzido um segundo experimento onde as inoculações foram realizadas nas fases R2, R3 (grão leitoso) e R4 (grão pastoso). O híbrido plantado foi o DKB390.

Na colheita dos grãos avaliaram-se a incidência de podridão-branca-da-espiga e a incidência de grãos ardidos causados por *S. maydis*.

## Resultados e Discussão

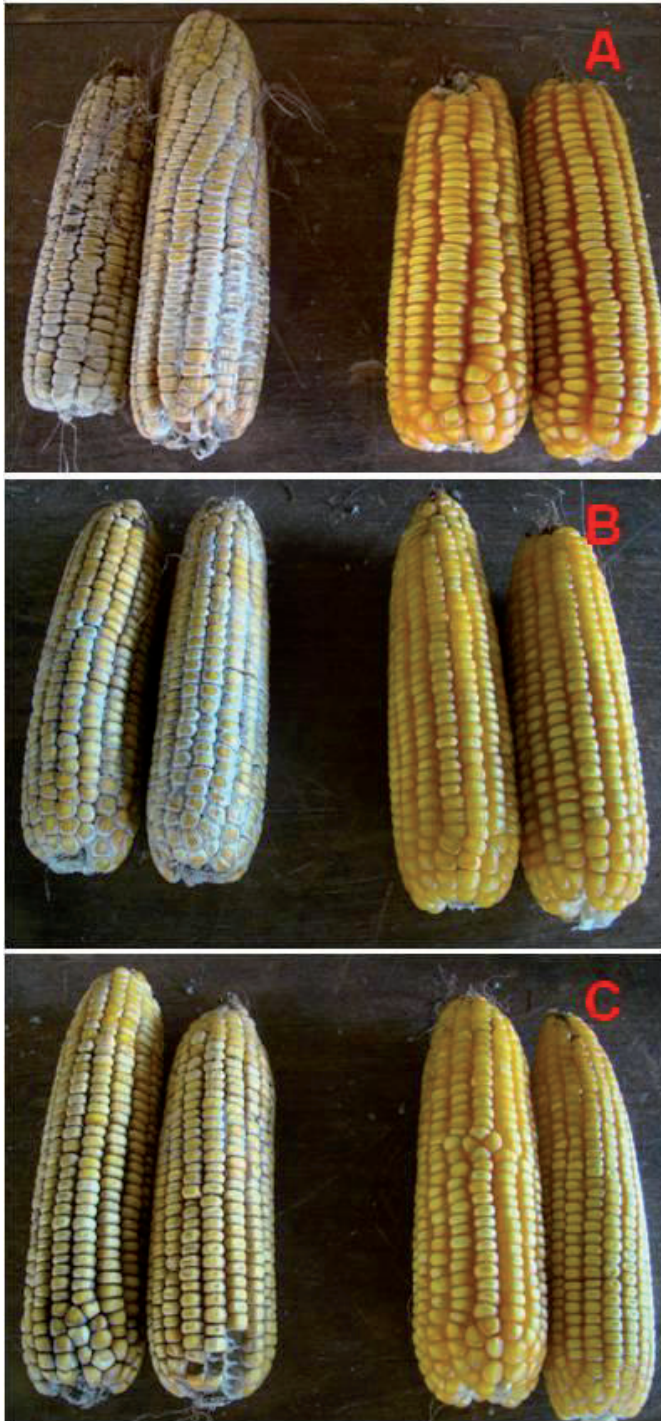
Os resultados obtidos em condições de campo corroboraram o potencial do método de palito de dente imerso em solução de esporos para inoculação de *S. maydis* em espigas de milho (Figura 1). Os sintomas da doença iniciaram-se 12 dias após a inoculação (Figura 1b). Aos 30 dias após a inoculação as espigas estavam completamente colonizadas pelo patógeno e pode-se observar a presença de micélio branco e de picnídios na palha e grãos (Figura 1c e 1d). A inoculação resultou em incidência de 100% de grãos ardidos em todas as espigas inoculadas.

A época de inoculação influenciou na eficiência do método de inoculação (Figura 2). As inoculações realizadas mais cedo, nas fases em R2 e R3, resultaram em sintomas mais severos da podridão-branca-da-espiga (Figura 2a e 2b). As inoculações realizadas nessas duas fases resultaram em incidência de 100% de grãos ardidos. As inoculações realizadas na fase R4 também resultaram em alta incidência de grãos ardidos, no entanto, não se observou presença do micélio branco do patógeno nas espigas (Figura 2c).



**Figura 1.** Evolução dos sintomas da podridão-branca-da-espiga inoculada com palito de dente imerso em solução de esporos. A- espiga logo após a inserção do palito com inóculo. B- início do desenvolvimento dos sintomas. C- espigas completamente colonizadas pelo patógeno, D- detalhe dos sintomas nos grãos com presença de picnídios e micélio branco do patógeno. Fotos: Luciano Viana Cota





**Figura 2.** Podridão-branca em espigas de milho inoculadas com palito de dente imerso em solução de esporos nas fases de desenvolvimento das plantas A- R2 (**grão bolha d'água**), B- R3 (**grão leitoso**) e C- R4 (**grão pastoso**). As espigas da direita representam a testemunha sem inoculação. Fotos: Luciano Viana Cota

Baseando-se nos resultados obtidos, constatou-se que o método de inoculação avaliado, além de ser prático, foi eficiente para reproduzir os sintomas da podridão-branca causada por *S. maydis* em espigas de milho em condições de campo. O método tem grande potencial para ser usado em programas de melhoramento visando a fenotipagem de linhagens e híbridos e para a identificação de fontes de resistência à podridão-branca-da-espiga. Além da eficiência e praticidade do método, ele apresenta como vantagens a rapidez, o baixo custo e a facilidade de padronização para inoculação de grande número de genótipos e isolados.

## Referências

- BENSCH, M. J.; VAN STADEN, J.; RIJKENBERG, J. H. F. Time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, p. 265-269, 1992.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F.J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 83).
- CLEMENTS, M. J.; KLEINSCHMIDT, C. E.; MARAGOS, C. M.; PATAKY, J. K.; WHITE, D. G. Evaluation of inoculation techniques for Fusarium ear rot and fumonisin contamination of corn. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 147-153, 2003.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos: safra 2012/2013: nono levantamento: junho/2013**. Brasília, 2013. 31 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_06\\_06\\_09\\_09\\_27\\_boletim\\_graos\\_-\\_junho\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_06_06_09_09_27_boletim_graos_-_junho_2013.pdf)>. Acesso em: 25 jun. 2013.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; SILVA, D. D.; GUIMARÃES, P. E.; GUIMARÃES, L. J. M.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P. **Desenvolvimento de metodologia para inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 6p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 139).

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; CASELA, C. R. Doenças. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho.** 5. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, 1). Disponível em: <[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_5\\_ed/doencas.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.htm)>. Acesso em: 26 jun. 2013.

COTA, L. V.; COSTA, R. V.; GUIMARÃES, P. E.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P.; SILVA, D. D.; PARREIRA, D. F. **Métodos de inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 7 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 137).

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

MÁRIO, J. L.; REIS, E. M.; JULIATTI, F. C. Three inoculation methods for screening corn germplasm to white ear rot resistance. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, p. 362-366, 2011.

MOREMOHOLO, L.; SHIMELIS, H.; MASHELA, P. W. Yield response and *Stenocarpella* ear rot reaction among selected maize inbred lines and top cross hybrids. **Euphytica**, Wageningen, v. 174, p. 231-238, 2010.

PINTO, N. F. J. A.; SABATO, E. de O.; FERNANDES, F. T. **Manejo das principais doenças do milho.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. 16 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 92).

#### Circular Técnica, 194

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
**Fone:** (31) 3027 1100  
**Fax:** (31) 3027 1188  
**E-mail:** [cnpms.sac@embrapa.br](mailto:cnpms.sac@embrapa.br)  
**1ª edição**  
**1ª impressão (2013):** on line

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



#### Comitê de publicações

**Presidente:** Presidente: Sidney Netto Parentoni.  
**Secretário-Executivo:** Elena Charlotte Landau.  
**Membros:** Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

#### Expediente

**Revisão de texto:** Antonio Claudio da Silva Barros.  
**Normalização bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro.  
**Tratamento das ilustrações:** Tânia Mara A. Barbosa.  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara A. Barbosa.