

DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DE PICNÍDIOS E PSEUDOTÉCIOS PRESENTES NAS LESÕES DA MANCHA FOLIAR DE PHAEOSPHAERIA EM MILHO (ZEA MAYS)

Cervelatti E. P.¹, Paccola Meirelles L. D.¹, Paiva E.², Luna Alves E. A.³, Fernandes F.T.², Casela C.R.²

¹Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina/PR paccola@uel.br ² Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970 Sete Lagoas/MG. casela@cnpmc.embrapa.br ³Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE

Palavras chave: *Phoma*; *Phyllosticta* sp.; pseudotécios; picnídios; caracterização molecular

A doença foliar da cultura do milho conhecida como mancha de *Phaeosphaeria* descrita pela primeira vez por Rane *et al.* (1965) instalou-se no Brasil em meados da década de 80. A crescente incidência e a severidade da doença são fatores que vem contribuindo de forma marcante para a redução da produtividade nesta cultura (Balmer e Pereira, 1987; Casela, 1998). Pouco é conhecido sobre os fatores que favorecem o seu desenvolvimento na cultura do milho. Inicialmente aparecem lesões aquosas do tipo anasarca que posteriormente tornam-se necrosadas e de tamanho variado. O fungo *Phyllosticta* sp, reconhecido como sendo o agente etiológico da doença, forma picnídios submersos no tecido da planta e no centro das lesões. Dependendo das condições climáticas e época do ano, podem ser vistas também estruturas reprodutivas sexuais descritas como peritécios por Rane *et al.* (1965) ou como pseudotécios por Fantim (1994). O fungo produtor desses pseudotécios foi identificado como sendo a forma perfeita de *Phyllosticta* sp, um ascomiceto da família Pleosporaceae, *Phaeosphaeria maydis*. Desde o surgimento da doença em nosso país na década de 80, muito pouco tem sido estudado visando esclarecer a real identidade do agente etiológico. Os estados anamorfo e teleomorfo do agente causal foram descritos com base em observações visuais das estruturas reprodutivas presentes nas lesões, os picnídios e os pseudotécios, existindo ainda controvérsias com relação a verdadeira identidade do agente causal da doença. Neste trabalho foram comparados, por meio de técnicas moleculares, os isolados obtidos a partir de picnídios com aqueles obtidos a partir de pseudotécios, com o objetivo de confirmar se os dois estados são realmente pertencentes ao mesmo agente. Folhas contendo as lesões necróticas foram lavadas com sabão neutro e colocadas em câmara úmida. Após 2 a 3 dias, esporos foram isolados a partir de picnídios e de pseudotécios e inoculados em meio de aveia 22±2° C (12h claro/ 12h escuro). Foram avaliados 21 isolados da forma perfeita e 24 da forma imperfeita.

Análise eletroforética de isoenzimas: Os isolados foram cultivados em caldo de batata pH 6,9 (200g de batata + 15g de sacarose + 1000mL de água destilada) a 22±2°C (12h claro / 12h escuro) durante sete dias. O micélio foi lavado três vezes em água destilada, filtrado em gaze e homogeneizado em N₂ líquido em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8. Após a centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida, segundo a metodologia descrita por Paccola-Meirelles *et al.* (1988) para determinação do padrão de α e β esterases.

Extração de DNA: O DNA total foi obtido a partir do micélio de cada um dos isolados, onde amostras de 400 mg de micélio foram maceradas em N₂ líquido, suspenso em 4 mL de tampão de extração (200mM de Tris-HCl pH 8,0 + 250 mM de NaCl + 25 mM de EDTA pH

8,0 + 1% de SDS + 1 µL/mL de tampão de β-mercaptoetanol) e incubadas a 65°C por 15 minutos. Posteriormente, 2 mL de fenol foram adicionados e as amostras centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos de centrífuga; adicionou-se 1 mL de fenol e 1 mL de clorofórmio. Após centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos, adicionou-se 2 mL de clorofórmio-octanol (24:1) ao sobrenadante. Centrifugou-se por 15 minutos a 4000 rpm. e adicionou-se isopropanol gelado ao sobrenadante até completar o volume do tubo. Após precipitação, o DNA foi transferido para microtubos contendo 100 µL de TE (0,5 mL de Tris + 0,1 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; completou-se o volume para 50 mL com água destilada). A quantidade e a qualidade do DNA obtido foi analisada em gel de agarose 0,8%.

RAPD: Foram utilizados 19 primers previamente selecionados, na concentração de 4 µM: OPA3 (5'AGTCAGCCAC3'), OPA4 (5'AATCGGGCTG3'), OPA8 (5'GTGACGTAGG3'), OPA9 (5'GGGTAACGCC3'), OPA10(5'GTGATCGCAG 3'), OPA13 (5'CAGCACCCAC3'), OPA14 (5'TCTGTGCTGG3'), OPW3 (5'GTCCGGAGTG3') OPW4 (5'CAGAAGCGGA3'), OPW5 (5'GGCGGATAAG3'), OPW6 (5'AGGCCCGATG3'), OPW8 (5'GACTGCCTCT3'), OPW9 (5'GTGACCGAGT3'), OPW10 (5'TCGCATCCCT3'), OPW11 (5'CTGATGCGTG3'), OPW12 (5'TGGGCAGAAG3'), OPW13 (5'CACAGCGACA3'), OPW16 (5'CAGCCTACCA3'), OPW20 (5'TGTGGCAGCA 3'). Para cada reação de PCR utilizou-se: 9,5µL de água ultra pura estéril + 2,5 µL de tampão de PCR 10X (50 mM KCl + 100 mM Tris-HCl pH 8,6 + 0,1% Gelatina + 2 mM MgCl₂) + 1 µL de solução de dNTPs (100 µM de dATP + 100 µM de dCTP + 100 µM de dGTP + 100 µM de dTTP) + 1 µL de primer 4 µM + 1 µL de DNA-Taq polimerase 1un/mL + 10 µL de solução de DNA 5 ng/µL. O programa utilizado para as amplificações foi 95° C por 1' para desnaturação inicial; 35 ciclos de amplificação (94°C por 10" para desnaturação, 36°C por 1' para amplificação e 72° C por 2' para extensão pela Taq-polimerase e incorporação dos nucleotídeos); 72°C por 7' que caracteriza a etapa final da reação e 4°C contínuo. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e fotografado sob luz U.V. com filme Polaróide.

A figura 1 mostra o padrão isoenzimático para esterases dos isolados obtidos a partir de picnídios (1a) e pseudotécios (1b). O padrão eletroforético para α e β esterases permitiu a separação dos isolados em grupos bem distintos. O padrão dos isolados obtidos a partir de pseudotécios (Figura 1b) demonstrou grande homogeneidade dentro deste grupo. Foi observada uma grande variabilidade intraespecífica nos isolados obtidos de picnídios.

O padrão de RAPD também demonstrou diferenças entre os dois grupos (Figura 2). Foram observadas 163 Bandas polimórficas. Os resultados foram submetidos a análise de matriz de distância, a qual revelou que a variabilidade entre os isolados variou de 4 a 46%. A análise de clusters (figura 2) separou os isolados em 3 grupos: no primeiro encontram-se os isolados da forma imperfeita (com exceção do isolado 62), no segundo grupo os isolados da forma perfeita e no terceiro grupo o isolado 90. As análises de DNA confirmaram as de isoenzimas, separando os isolados oriundos de picnídios daqueles oriundos de pseudotécios. Esses resultados sugerem que os picnídios e os pseudotécios presentes na lesão são pertencentes a fungos diferentes e não a estados anamórficos e teleomórficos de um mesmo agente.

Entre os isolados obtidos de um mesmo grupo foi detectada diversidade genética, principalmente entre aqueles obtidos de picnídios. O isolado 06 (obtido de picnídios) e o isolado 89 (obtido de pseudotécio) foram enviados ao Instituto de Micologia da

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para classificação de acordo com suas características morfológicas. O isolado 6 considerado como *Phyllosticta* sp foi classificado como *Phoma tropica* e o isolado 89 foi classificado como pertencente ao gênero *Phaeosphaeria* porém não foi conclusiva a classificação de sua espécie tampouco do seu estágio imperfeito.

Segundo Sivanesam (1984), a confusão na classificação ao redor dos gêneros *Phoma* e *Phyllosticta* é bastante comum. Um exemplo que pode ser citado é o fungo *Phoma glomerata*. Simay (1994), realizou estudos visando sua classificação, pois, segundo o autor, este fungo era depositado em bancos de cultura como *Phyllosticta maculiformis*, *Phyllosticta sojoccola* ou como *Phoma pomorum*. A ocorrência de *Phoma glomerata* em plantas em decomposição, no filoplano de diferentes plantas e em doenças foliares causadas por outros organismos, sugerem que a causa de sua classificação errônea como *Phyllosticta* é a sua colonização em lesões causadas por outras condições adversas. O autor relata ainda a necessidade de uma revisão em outras espécies de *Phyllosticta* e *Phoma* descritas, visto que em muitos casos a classificação é baseada no tipo de hospedeiro, e não em características observadas na cultura dos fungos.

Apesar da doença ter sido descrita como uma doença fúngica, há autores que relatam a possibilidade de uma associação com bactérias (Ferreira e Casela, dados não publicados). As bactérias iniciariam o processo infeccioso e os fungos se instalariam posteriormente (Paccola-Meirelles *et al.*, em publicação). Os resultados aqui apresentados indicam em parte essa possibilidade, uma vez que os picnídios isolados nas lesões foram oriundos de uma espécie fúngica saprofítica, o *Phoma tropica*, um oportunista de lesões preestabelecidas (Schneider e Boerema, 1975). Na Holanda e na Alemanha, esse fungo foi encontrado associado a lesões de folhas e de colmo em mais de 20 diferentes espécies de plantas ornamentais em casa de vegetação.

O trabalho de Paccola-Meirelles *et al.* (1998) contribui em parte para essa hipótese, uma vez que esses autores estudando a incidência de picnídios e pseudotécios em lesões da mancha por *Phaeosphaeria* em 30 híbridos de milho precoces observaram picnídios em apenas 8,8% das lesões avaliadas, pseudotécios em 7,3% e cerca de 79,3% das lesões em estágio avançado não mostraram estruturas reprodutivas fúngicas.

Os resultados aqui descritos sugerem que os picnídios e pseudotécios presentes nas lesões da mancha por *Phaeosphaeria* são pertencentes a espécies fúngicas distintas e não a estados anamórficos e teleomórficos de um mesmo agente.

LITERATURA CITADA

BALMER, E.; PEREIRA, A.O.P. Doenças de Milho In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G.P. eds. **Melhoramento de Produção de Milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p 595-634, 1987.

CASELA, C.R. The *Phaeosphaeria* leaf spot. In: CASELA, R.C.; REFRO, R.; KRATTIGER, A. eds **Diagnosing mayze diseases in Latin American**. Ithaca: ISAAA/ Brasília: EMBRAPA, 1998. p 15-17

FANTIM, G.M. Mancha por *Phaeosphaeria* doença de milho que vem aumentando sua importância. **Biológico**, São Paulo, v 56, p.39, 1994.

PACOLLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. **Manual de Técnicas Eletroforéticas em Microrganismos**. Piracicaba/SP: ,1988. 47p

PACOLLA-MEIRELLS, L.D.; MEIRELLES, W.F.; CERVELATTI, E.P.; MAKI, C.S.; CASELA, C.R.; FERNANDES, F.T.; FERREIRA, A.S. Caracterização morfológica das lesões por *Phaeosphaeria* e avaliação da incidência do estágio assexuado e sexuado do patógeno em híbridos de milho In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22., 1998, Recife, PE. **Globalizacao e segurança alimentar** – reumos. Recife: IPA, 1998. p 173

RANE, M.S.; PAYAK, M.M.; RENFRO, B.L. *Phaeosphaeria* leaf spot of maize **Indian Phytopathologic Societ Bulletin** v.3, p.7-10, 1965.

SCHNEIDER, R.; BOEREMA, G.H. *Phoma tropica* n sp ein an Gewachshauspflanzen häufig vorkommender nicht pathogener Pilz. **Phytopathology**, St Paul, v.83, p.360-366, 1975.

SIMAY, E.I. Comparative study of *Phoma glomerata* (Corda) Wollenber *et al.* Hochapfel isolates. **Acta Phytopathologica et Entomologyca Hungarica**, Budapest, v.29, p.6-72, 1994.

SIVANESAM, A., *The bitunicate ascomycetes and their anamorphous*. **J Cramer Germany**

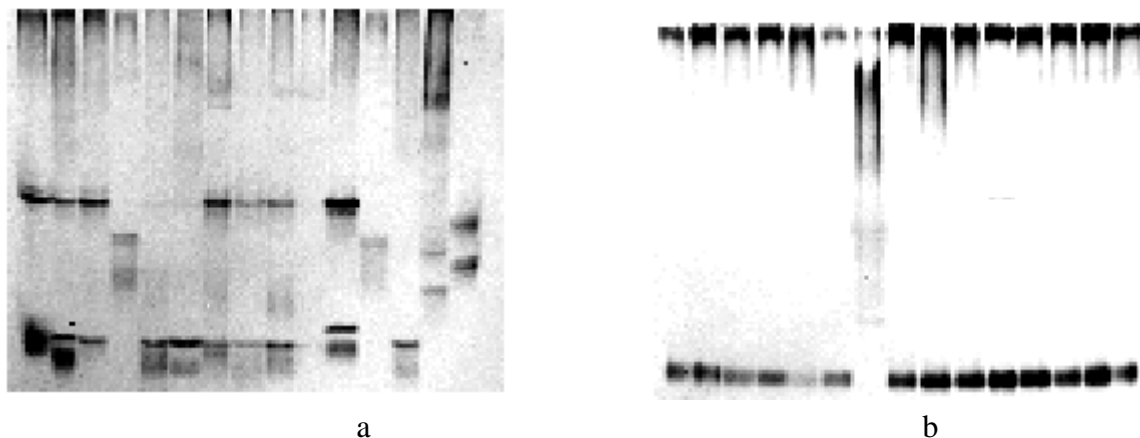


Figura 1 - Padrão eletroforético para α e β esterases em 15 isolados obtidos a partir de picnídios(1a) e 15 de pseudotécios (1b) presentes nas lesões de *Phaeosphaeria* em milho

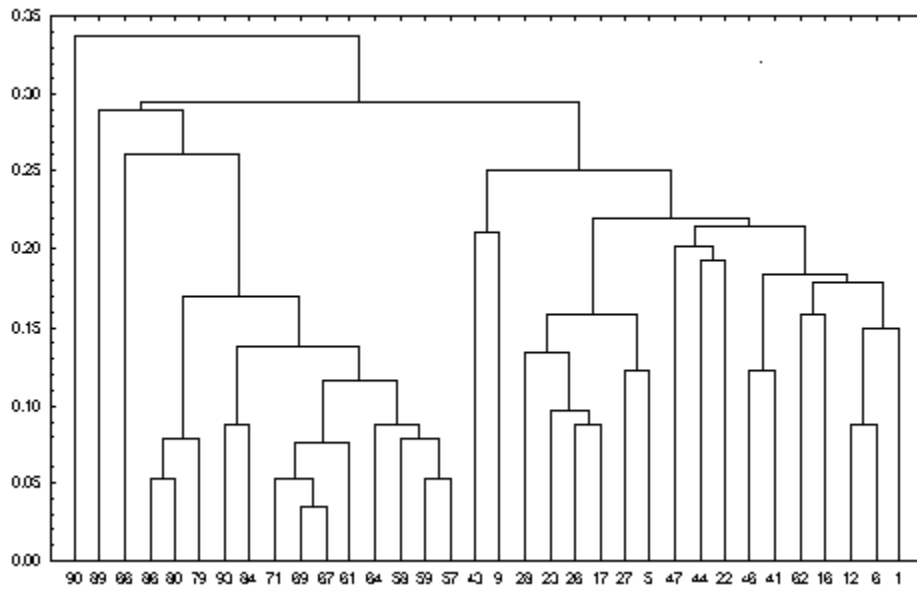


Figura 2 - Dendograma obtido através da análise de cluster para o polimorfismo gerado na utilização de marcadores moleculares tipo RAPD em isolados obtidos a partir de picnídios e pseudotécios presentes nas lesões da mancha de *Phaeosphaeria* em milho. (de 01 a 51 isolados do estado anamorfo, de 52 a 93 isolados do estado teleomorfo).