

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DANILO LIMA DAS NEVES

Ocorrência e caracterização de espécies de *Cercospora* associadas à mancha
foliar do milho em Goiás e Paraná

MARINGÁ

2012

DANILO LIMA DAS NEVES

Ocorrência e caracterização de espécies de *Cercospora* associadas à mancha
foliar do milho em Goiás e Paraná

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agronomia do
Departamento de Agronomia, Centro de
Ciências Agrárias da Universidade Estadual de
Maringá, como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Agronomia

Área de concentração: Produção
Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Dauri José
Tessmann

Co-Orientador: Prof. Dr. Hercules
Diniz Campos

MARINGÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

N518o Neves, Danilo Lima das
Ocorrência e caracterização de espécies de
Cercospora associadas à mancha foliar do milho em
Goiás e Paraná / Danilo Lima das Neves. -- Maringá,
2012.
i-viii, 52 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Dauri José Tessmann.
Coorientador: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, 2012.

1. Milho (*Zea mays* L.) - *Cercospora* sp. -
Ocorrência. 2. Milho (*Zea mays* L.) - *Cercospora* sp.
- Caracterização. 3. Milho (*Zea mays* L.) -
Cercosporiose - PCR (Reação em cadeia da
polimerase). 4. *Cercospora* sp. - Patogenicidade.
I. Tessmann, Dauri José, orient. II. Campos,
Hercules Diniz, coorient. III. Universidade Estadual
de Maringá. Centro de Ciências Agrárias.
Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia. IV. Título.

CDD 21.ed. 632.4

MN-0001094

A meu pai Manoel Lima da Silva, minha mãe Nilza Aparecida das Neves Silva e ao meu irmão Fernando Lima das Neves pelo amor a mim dedicado e por me proporcionarem paz e felicidade na vida.

DEDICO

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por estar comigo em todos os momentos;

Aos meus familiares, em especial aos meus pais e meu irmão, pelo incentivo, amor e compreensão;

Ao professor Dauri José Tessmann, pela oportunidade, orientação, dedicação, amizade e pelos seus valiosos ensinamentos;

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos durante o curso;

À companheira de laboratório Cleiltan Novais da Silva, pela amizade, ajuda e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Agronomia, em especial à Erica Sato, Mauro Moreira e Reinaldo Bernardo, pela gentileza, amizade e disposição;

Aos colegas e amigos de Pós-graduação, em especial à Lilianne M. Ribeiro, Juliana B. Oliveira, Caroline M. Bordon, Antônio Jussê Solino, Taíse Bijora, Rodrigo C. Oliveira, Patrícia Carnelossi, Carolina Souza, Tatiane Alves e Jéssika Angelotti, pela amizade, convivência, contribuição nos trabalhos e por tornarem tão alegres e descontraídos nosso ambiente de trabalho;

Aos amigos e amigas de todos os momentos, que acreditaram e me apoiaram;

À Universidade Estadual de Maringá e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelos auxílios concedidos;

E a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta dissertação.

O MEU MUITO OBRIGADO!

Ocorrência e caracterização de espécies de *Cercospora* associadas à mancha foliar do milho em Goiás e Paraná

RESUMO

A mancha foliar de cercospora é uma das principais doenças foliares do milho no Brasil. Estudos prévios mostraram que três espécies de *Cercospora* estão associadas à doença, como: *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis*. No entanto, são poucas as informações disponíveis sobre a ocorrência dessas espécies nas principais regiões produtoras de milho do país. Este estudo teve por objetivo: (i) identificar as espécies de *Cercospora* que ocorrem associadas às lesões de cercosporiose em regiões produtoras de milho dos Estados de Goiás e Paraná; (ii) analisar a distribuição espacial das espécies de *Cercospora* em áreas de cultivo de milho dos Estados de Goiás e Paraná, mediante levantamento por quadrantes; e (iii) caracterizar isolados representativos das espécies de *Cercospora* encontradas no estudo, analisando-se sequências da região ITS-gene 5.8S do rDNA, e atributos fenotípicos, como morfologia e coloração de colônias, crescimento micelial, morfologia de conídios e conidióforos e patogenicidade. Para a identificação das espécies *C. zeina* e *C. zea-maydis* foram utilizados oligonucleotídeos (*primers*) espécie-específicos e a identificação de *C. sorghi* var. *maydis* foi feita pela comparação de sequências da região ITS-gene 5.8S do rDNA dos isolados com sequências de *Cercospora* do *GenBank*. A análise de 75 isolados de culturas monospóricas obtidas de folhas de milho com lesões, oriundas de diferentes regiões de Goiás mostrou a predominância da espécie *C. zeina* (90.7 % dos isolados), seguida por *C. zea-maydis* (9.3 % dos isolados). No Paraná, foram obtidos 74 isolados monoconidiais e também houve a predominância de *C. zeina* (97.3 % dos isolados), seguida de *C. sorghi* var. *maydis* (2.7 % dos isolados). A análise espacial feita em 25 quadrantes de 400 m², totalizando 1 hectare, em duas áreas de Goiás, Montividiu e Rio Verde, com 43 e 89 isolados, respectivamente e uma lavoura de milho em Maringá, Paraná, com 120 isolados, mostrou a presença apenas de *C. zeina*. A árvore filogenética inferida com base nas sequências de rDNA mostrou que os 16 isolados de *C. zeina*, seis isolados de *C. zea-maydis* e dois isolados de *C. sorghi* var. *maydis* formaram grupos separados, com suporte estatístico de *bootstrap* de 98, 89 e 84 %, respectivamente. Quanto à caracterização fenotípica, *C. sorghi* var. *maydis* apresentou

maior crescimento micelial em relação às demais espécies, e *C. zeina* apresentou crescimento mais lento. Foi possível diferenciar os isolados de *C. sorghi* var. *maydis* em relação às espécies *C. zeina* e *C. zea-maydis* com base na morfologia de conídios, porém não foi possível diferenciar conclusivamente a espécie *C. zeina* de *C. zea-maydis*. A análise da patogenicidade foi realizada em casa de vegetação, as plantas no estágio V3 foram inoculadas mediante a deposição de 15 sementes de sorgo colonizadas pelos fungos no cartucho das plantas. Apenas *C. zeina* e *C. zea-maydis* foram patogênicas ao milho. A análise da agressividade dos isolados por contrastes múltiplos mostrou diferenças significativas de agressividade entre isolados da mesma espécie e entre isolados das duas espécies, em que a agressividade média de isolados de *C. zea-maydis* foi superior à média de agressividade de isolados de *C. zeina*.

Palavras-chave: *Zea mays*. Cercosporiose. PCR. Agressividade. Patogenicidade.

Occurrence and characterization of *Cercospora* species associated to leaf spot of maize in Goiás and Paraná, Brazil.

ABSTRACT

Grey leaf spot is one of the most important foliar diseases of maize (*Zea mays* L.) in Brazil. Previous studies have shown that three *Cercospora* species can be associated with this disease in the country: *C. zeina*, *C. zea-maydis* and *C. sorghi* var. *maydis*; however, still there are limited information about the occurrence of these species in the major maize producing areas, as well as the spatial distribution of these species in maize fields is unknown. The aims of this work were: (i) to identify the *Cercospora* species occurring in the major maize producing areas of Goiás and Paraná States; (ii) to analyze the spatial distribution of these species in maize fields; (iii) to characterize representative isolates these species based on sequence analyze of ITS-5.8s gene rDNA, and on some phenotypic traits, such as colony morphology and coloration, mycelial growth, morphology of conidia and conidiophores, and pathogenicity. Molecular identification was based on PCR with species-specific primers for *C. zeina* e *C. zea-maydis*. *Cercospora sorghi* var. *maydis* was identified based on comparison of their ITS-5.8S rDNA sequences with sequences of *Cercospora* from *GenBank*. In the first aim, among the 75 single spore isolates from different areas of Goiás and the 74 isolates from Paraná, *C. zeina* was the predominant species (90.7 % of isolates) over *C. zea-maydis* (9.3 % of isolates) in Goiás, and also predominant (97.3 %) over *C. sorghi* var. *maydis* (2.7 % of isolates) in Paraná. The spatial distribution study in one hectare divided in 25 quadrats showed that isolates collected in a field located in Montividiu (n=43) and Rio Verde (n=89) State of Goiás, and isolates from Maringá (n=120), State of Paraná, were *C. zeina*. The phylogenetic tree inferred with ITS-5.8S rDNA sequences showed that the 16 isolates representatives of *C. zeina*, the six isolates of *C. zea-maydis* and the two isolates of *C. sorghi* var. *maydis* formed well-supported groups, with bootstrap support of 84, 89 and 98% to respectively. The comparison of phenotypic traits showed that *C. sorghi* var. *maydis* presented higher mycelial growth rate than the others species, and that *C. zeina* presented lower growth rate than *C. zea-maydis* and *C. sorghi* var. *maydis*. The distinction between *C. zeina* and *C. zea-maydis* was not conclusive based upon conidia and conidiophores

morphology. However, these traits allowed to distinguish *C. sorghi* var. *maydis* from the other two species. The pathogenicity test, carried out in greenhouse with partial control of temperature and humidity, with plants inoculated at the growth stage V3 by placing colonized sorghum seeds into the whorl of the plants, revealed that only *C. zeina* and *C. zea-maydis* were pathogenic to maize. Significant differences in aggressiveness were found among isolates of the same species and also among isolates of *C. zeina* and *C. zea-maydis*. The aggressiveness average of *C. zea-maydis* isolates was significantly higher than the aggressiveness average of *C. zeina* isolates.

Keywords: *Zea mays*. Grey leaf spot. PCR. Aggressiveness. Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Locais de coleta de amostras de folhas de milho com sintomas de cercosporiose no Estado de Goiás: Formosa (1); Montividiu (2); Rio Verde (3) e Santa Helena de Goiás (4), e no Paraná: Terra Boa (5); Goioerê (6); Peabiru (9); Ourizona (10); Engenheiro Beltrão (11); Terra Boa (12); Floresta (13); Maringá (14); Apucarana (15); Bela Vista do Paraíso (16); Sertanópolis (17); Sertaneja (18); Assaí (19); Leopólis (20); Jataizinho (21); Castro (22) e Guarapuava (23)	15
Figura 2	Esquema da amostragem para o estudo da distribuição espacial. Em cada quadro de 20m x 20m foram coletadas de 2 a 5 folhas de milho com sintomas de cercosporiose de plantas diferentes	16
Figura 3	Detalhe da câmara úmida em placa gerbox contendo segmentos de folhas de milho apresentando sintomas de cercosporiose (A) e visualização da indução da produção de conídios de <i>Cercospora</i> sp., sobre o tecido necrosado da folha (B)	17
Figura 4	Plantas de milho utilizadas no experimento de avaliação da agressividade de isolados de <i>Cercospora</i> spp. (A) e detalhe mostrando o cartucho de uma planta com inóculo de <i>Cercospora</i> sp., constituído por sementes de sorgo colonizada pelo fungo (B)	23
Figura 5	Gel de agarose mostrando bandas correspondentes a produtos de PCR com a utilização dos <i>primers</i> CyIH3F, CyIH3R e CzeinaHist, específicos para <i>C. zeina</i> (A); e <i>primers</i> CyIH3F, CyIH3R e CzeaeHist, específicos para <i>C. zea-maydis</i> (B). Em que M, é o marcador de 100pb; 1, 2 e 3, representam os isolados GOA30 de <i>C. zeina</i> , FOR01 de <i>C. zea-maydis</i> e GOI12 de <i>Cercospora</i> sp. O fragmento de 389 pb presente nas Figuras A e B é obtido para <i>Cercospora</i> spp (controle positivo) e os fragmentos de 284 pb presentes nas Figuras A e B correspondem à amplificação positiva para <i>C. zeina</i> e <i>C. zea-maydis</i>	24

Figura 6	Árvore filogenética inferida a partir de sequências de DNA das regiões ITS1-5.8S do rDNA de isolados de <i>Cercospora</i> spp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem da análise de <i>bootstrap</i> nas quais as repetições foram observadas (1.000 repetições). As sequências de rDNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais sequências foram obtidas do <i>GenBank</i> (com o número de acesso)	29
Figura 7	Colônias de <i>C. zeina</i> em meio de batata dextrose ágar. Isolado GOA30(A), Isolado GOB06 (B), Isolado CTR03(C), Isolado GOA65 (D) e Isolado PR035 (D)	30
Figura 8	Colônias de <i>C. zea-maydis</i> em meio de batata dextrose ágar. Isolado FOR01(A), Isolado FOR08 (B), Isolado FOR02 (C) e Isolado SHG12 (D)...	31
Figura 9	Colônias de <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> em meio de batata dextrose ágar. Isolado GOI13(A) e Isolado GOI12 (B)	31
Figura 10	Culturas de <i>C. zeina</i> em meio BDA (A) e meio V8 (B) e <i>C. zea-maydis</i> em meio BDA (C) e meio V8 (D), com destaque para a presença do pigmento púrpura ao redor das colônias. Isolado GOA30 (A), isolado FTA02 (B), isolado FOR01(C) e isolado SHG12 (D)	32
Figura 11	Estruturas de <i>Cercospora</i> spp. no milho. <i>C. zea-maydis</i> : conidióforos (A) e conídios (B), <i>C. zeina</i> : conidióforos (C) e conídios (D) e <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> : conidióforos (E) e conídios (F)	37
Figura 12	Evolução dos sintomas de cercosporiose provocada por <i>C. zeina</i>	43
Figura 13	Evolução dos sintomas de cercosporiose provocada por <i>C. zea-maydis</i>	43

TABELAS

Tabela 1	Descrição dos <i>primers</i> utilizados na identificação e sequenciamento das espécies de <i>Cercospora</i> spp.	20
Tabela 2	Isolados de <i>Cercospora</i> sp. utilizados no estudo da patogenicidade e agressividade em casa de vegetação	22
Tabela 3	Identificação de espécies de <i>Cercospora</i> , a partir de isolados associados à mancha foliar do milho no Brasil empregando oligonucleotídeos (<i>primers</i>) com especificidade para <i>C. zeina</i> , <i>C. zea-maydis</i> e <i>Cercospora</i> sp., e também baseada no maior percentual de identidade com sequências das regiões ITS1 e ITS2 e gene 5.8S do rDNA de isolados de referência de <i>Cercospora</i> do <i>GenBank</i> (506 a 560 pares de bases)	25
Tabela 4	Distribuição das espécies <i>C. zeina</i> e <i>C. zea-maydis</i> em diferentes municípios do Estado de Goiás, a partir da análise de PCR e denominação dos isolados obtidos	26
Tabela 5	Distribuição das espécies <i>C. zeina</i> e <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> em diferentes municípios do Estado do Paraná, a partir da análise de PCR e denominação dos isolados obtidos	27
Tabela 6	Presença de pigmentação púrpura nas colônias de isolados de <i>C. zeina</i> , <i>C. zea-maydis</i> e <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> em meios de cultura BDA e V8 na temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 hora	33
Tabela 7	Taxa de crescimento micelial (mm dia^{-1}) de isolados de <i>C. zeina</i> (CZ), <i>C. zea-maydis</i> (CZM) e <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> (CSM) sob luz branca e luz negra	35
Tabela 8	Média de comprimento (μm), largura (μm) e número de septos de 50 conídios e conidióforos avaliados em 18 isolados de <i>Cercospora</i> spp. no milho	38
Tabela 9	Média de comprimento (μm), largura (μm) de 50 conídios e conidióforos avaliados em 2 isolados de <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> no milho	39
Tabela 10	Análise de variância da severidade média ocasionada pelos isolados de <i>Cercospora</i> spp. no híbrido Formula em casa de vegetação	39
Tabela 11	Severidade de isolados de <i>C. zeina</i> e <i>C. zea-maydis</i> no híbrido Formula em casa de vegetação	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Hospedeira	4
2.2 Cercosporiose	5
2.2.1 Importância	5
2.2.2 Sintomatologia	6
2.2.3 Etiologia	7
2.2.4 O gênero <i>Cercospora</i> , conidiação microcíclica e produção de cercosporina	10
2.2.5 Epidemiologia e manejo de cercosporiose no milho	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Amostragem e obtenção dos isolados	15
3.2 Identificação de espécie por PCR e caracterização filogenética	18
3.3 Caracterização fenotípica	20
3.3.1 Características culturais	20
3.3.2 Características morfológicas	21
3.3.3 Caracterização da patogenicidade das espécies <i>Cercospora</i> e comparação da agressividade de isolados	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1 Identificação e ocorrência de espécies de <i>Cercospora</i> no milho em Goiás e Paraná	24
4.2 Análise da distribuição espacial dessas espécies em lavouras de milho dos estados de Goiás e Paraná	28
4.3 Caracterização filogenética de isolados de <i>C. zeina</i> , <i>C. zea-maydis</i> e <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i>	28
4.4 Caracterização fenotípica de isolados de <i>C. zeina</i> , <i>C. zea-maydis</i> e <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i>	30
4.4.1 Características culturais	30
4.4.2 Morfologia de conídios e conidióforos	36
4.4.3 Análise da patogenicidade das espécies <i>C. zeina</i> , <i>C. zea-maydis</i> e <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> e comparação da agressividade de isolados de <i>C. zeina</i> e <i>C. zea-maydis</i>	39
5. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais produtos da agricultura brasileira. A produção nacional desse cereal aumentou em torno de 60% nos últimos 10 anos, passando de 32 milhões de toneladas na safra 1999/2000 para 51 milhões de toneladas na safra 2009/2010 (FAO, 2012). Esse volume de produção permite ao Brasil ocupar a terceira posição entre os maiores produtores de milho, após os EUA e China (FAO, 2012). Merece destaque a grande importância econômica e social do milho para o país, tanto na agricultura de subsistência como na agricultura comercial, principalmente devido a sua utilização na cadeia de produção de carnes de frango e suína, as quais consomem entre 70 e 80% do milho produzido no país (CRUZ et al., 2008).

A cercosporiose, também conhecida como mancha foliar de cercospora, é uma das principais doenças fúngicas do milho no Brasil e em outros países. A doença apresenta manchas necróticas em todos os órgãos verdes da planta de milho, como folhas, colmos e brácteas das espigas, muito embora seus danos sejam mais perceptíveis nas folhas. Normalmente a doença ocorre desde o estágio vegetativo V-8 (oito folhas expandidas) até a fase de maturação. Epidemias severas da doença causam grande redução na produtividade das lavouras, aumentando a predisposição das plantas à podridão do colmo e ao tombamento (CARSON, 1999; CASELA; FERREIRA, 2003; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004). Inclusive no Brasil tem-se verificado o aumento dos danos da doença no Centro-Sul do país nas últimas décadas, fato este que tem sido atribuído a fatores como: expansão do cultivo do milho no sistema de plantio direto, com ausência ou baixa utilização de rotação de culturas, a qual tem sido substituída pela sucessão de culturas; expansão do cultivo de milho na segunda safra (safrinha) no outono; e utilização de híbridos de milho mais produtivos, porém mais susceptíveis a doenças. Considera-se que essas mudanças no sistema de produção de milho contribuem para a sobrevivência do patógeno nas áreas de cultivo e que isso tem favorecido a ocorrência de epidemias severas da doença (PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

Embora seja conhecida há bastante tempo no Brasil (VIÉGAS, 1945), a cercosporiose no milho somente adquiriu importância a partir da safra de verão de 1999/2000 e safrinha de 2000, quando foram relatadas epidemias severas da doença na região Sudoeste de Goiás, onde foram registrados perdas de até 40% no rendimento médio das lavouras (REIS; CASA; BRESOLIN, 2004). Nos anos seguintes, a doença passou a ocorrer também

nas demais regiões produtoras de milho do Centro-Sul, havendo relatos de perdas no rendimento de grãos de 13 a 80%, dependendo do híbrido e das condições de produção (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; BRITO et al., 2007; FANTIN et al., 2008).

Até recentemente, considerava-se que a cercosporiose do milho era causada primeiramente pela espécie *Cercospora zea-maydis* Tehon & E. Y. Daniels, havendo ainda outra espécie associada à doença, *C. sorghi* var. *maydis* Ellis & Everth., supostamente de menor importância (CARSON, 1999). Também, por algum tempo, foi aceito que *C. zea-maydis* tratava-se de um complexo formado por duas espécies *siblings*, ou seja, espécies morfológicamente similares, porém reprodutivamente isoladas, as quais foram denominadas de grupos I e II (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998; DUNKLE; LEVY, 2000; GOODWIN, DUNKLE, ZISMANN, 2001). Esses dois grupos foram posteriormente considerados duas espécies distintas, em que *C. zea-maydis* ficou circunscrita pelas características genotípicas e fenotípicas apresentadas pelo Grupo I, e uma nova espécie foi circunscrita com base nas características do Grupo II, à qual foi dado o nome de *C. zeina* Crous & U. Braun (CROUS et al., 2006). Em que a separação de *C. zea-maydis* e *C. zeina* foi consubstanciada por análise filogenética baseada em sequências de DNA da região ITS e 5.8S rDNA e de segmentos dos genes que codificam as proteínas histona-3, fator de alongação 1 α , actina e calmodulina, a qual mostrou que isolados dessas espécies se agruparam em clados distintos. Adicionalmente, Crous et al. (2006) também desenvolveram protocolos com a reação em cadeia da polimerase que empregam oligonucleotídeos (*primers*) com especificidade para *C. zeina*, *C. zea-maydis* e também uma terceira espécie à qual ainda não foi atribuído nome.

A identificação das espécies de *Cercospora* que afetam o milho com base em características fenotípicas é trabalhosa e por vezes não muito conclusiva. Ainda segundo Crous et al. (2006), quando comparada à *C. zea-maydis*, *C. zeina* apresenta conidióforo menor, menor taxa de crescimento micelial, ausência do pigmento púrpura associado à toxina cercosporina em meio de cultura e diferenças na sintomatologia nas lesões no milho quando inoculado em plantas saudáveis. Já *Cercospora sorghi* var. *maydis* pode ser mais facilmente distinguida dessas duas espécies por apresentar conídios mais longos e finos (CHUPP, 1953). No entanto, a patogenicidade de *C. sorghi* var. *maydis* ainda não foi conclusivamente demonstrada (CARSON; GOODMAN, 2006), de modo que a patogenicidade comparativa dessas espécies merece ser investigada melhor, inclusive acerca da existência de diferenças na agressividade de isolados dentro e entre espécies, tal como verificada por Mathioni et al. (2006).

São poucos os estudos publicados sobre a distribuição geográfica de espécies de *Cercospora* nas principais regiões produtoras de milho no Brasil e no mundo. No Brasil, num estudo envolvendo a análise de 69 isolados, verificou-se a ocorrência de *C. zeina* em São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná; de *C. zea-maydis* na Bahia, Minas Gerais e São Paulo; e de *C. sorghi* var. *maydis* em São Paulo (BRUNELLI et al., 2008). Destacando que apenas um isolado do Paraná foi incluído naquele estudo, identificado como *C. zeina* e apenas cinco isolados de Goiás, identificados também como *C. zeina*. Outro estudo recente, analisando 106 isolados de sete municípios de Minas Gerais, resultou que 75% desses isolados foram identificados como *C. sorghi* var. *maydis*, 14% dos isolados foram *C. zea-maydis* e 11% dos isolados foram *C. zeina* (KOSHIKUMO, 2011). Nos EUA, a espécie *C. zea-maydis* (antigo *C. zea-maydis* Grupo I) é considerada dominante e *C. zeina* foi identificada apenas na região leste daquele país (DUNKLE; LEVY, 2000), e na África do Sul, Zâmbia e Zimbábue, apenas foi encontrada *C. zeina* (MEISEL et al., 2009).

As hipóteses exploradas neste estudo foram as seguintes: a) as espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis*, e eventualmente nova(s) espécie(s) filogenética(s) ocorrem com distribuição geográfica desigual nas regiões produtoras de milho de Goiás e Paraná; b) numa mesma lavoura de milho é possível encontrar mais de uma espécie de *Cercospora* associadas à cercosporiose; c) existem diferenças marcantes na patogenicidade entre essas espécies e na agressividade de isolados dentro e entre espécies.

Assim, os objetivos do trabalho foram: (i) identificar as espécies *Cercospora* que ocorrem associadas às lesões de cercosporiose em regiões produtoras de milho dos estados de Goiás e Paraná; (ii) analisar a distribuição espacial das espécies de *Cercospora* em áreas de cultivo de milho dos estados de Goiás e Paraná, mediante levantamento por quadrantes e (iii) caracterizar isolados representativos das espécies de *Cercospora* encontradas no estudo, analisando-se sequências da região ITS-gene 5.8S do DNA ribossomal (rDNA), e atributos fenotípicos, como morfologia e coloração de colônias, crescimento micelial, morfologia de conídios e conidióforos, patogenicidade e agressividade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hospedeira

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta anual, monóica, alógama e pertence à família Poaceae (PONS; BRESOLIN, 1981). Essa gramínea tem como centro de origem o México e América Central (DOEBLEY, 1990). Considerada uma planta de fotossíntese C4, o milho apresenta elevado potencial produtivo, devido a grande eficiência na conversão de energia radiante e, conseqüentemente, na produção de biomassa (ANDRADE et al., 1992). Devido ao potencial produtivo, juntamente com outras características, como composição química e valor nutricional, o milho constitui-se num dos mais importantes cereais do mundo. Isso se deve principalmente à diversidade de suas aplicações na alimentação humana ou animal, além de ter um importante papel social e econômico, sendo matéria-prima importante para complexos agroindustriais diversificados (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

O milho é um dos cereais mais cultivados no Brasil, superado apenas pela soja dentre as culturas de grãos, e seu cultivo abrange praticamente todas as regiões do país. A produção brasileira de milho tem apresentado aumentos expressivos, decorrentes da evolução do sistema de cultivo, da disponibilidade de genótipos mais produtivos e melhor adaptados às diferentes regiões, da mecanização, da expansão da área de plantio e principalmente pela produção em duas épocas de plantio, sendo a primeira safra, ou plantio de verão, realizada entre agosto, na região Sul, e os meses de outubro e novembro, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Nas regiões Norte e Nordeste o plantio é realizado a partir de janeiro. O cultivo da segunda safra, ou safrinha, plantada após a safra de verão, ocorre predominantemente na região Centro-Sul (CRUZ et al., 2008).

Na safra 2011/2012 a cultura do milho ocupou a área de 15,1 milhões de hectares, com a produção de cerca de 72,7 milhões de toneladas de grãos. Sendo a região Centro-Oeste responsável por aproximadamente 42% da produção nacional total de milho, com uma produtividade de 30,4 milhões de toneladas. Os maiores Estados produtores do grão no país são Mato Grosso, Paraná e Goiás, com aproximadamente 24, 21 e 12%, respectivamente, da produção de milho nacional (CONAB, 2012).

As doenças são fatores limitantes da produção de milho no Brasil e em diversos outros países. Mais de vinte doenças parasitárias, causadas por fungos, vírus, bactérias e nematoides, já foram identificadas no Brasil. Contudo, pela frequência e intensidade com que

ocorrem, as doenças com maior importância econômica são: ferrugem comum (*Puccinia sorghi*), ferrugem polissora (*P. polysora*), helmintosporioses (*Exserohilum turcicum*, *Bipolares maydis*), complexo da mancha foliar de phaeosphaeria (*Phaeosphaeria maydis* e *Leptosphaeria zaeae* Stout) e cercosporiose (*Cercospora zaeae-maydis*, *C. zeina* e *C. sorghi* var. *maydis*) (PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005; CROUS et al., 2006).

2.2 Mancha foliar de cercospora

2.2.1 Importância

A cercosporiose, também chamada de mancha foliar de cercospora ou mancha cinzenta, é uma das principais doenças foliares na cultura do milho e foi relatada originalmente em Illinois, EUA em 1925 (TEHON; DANIELS, 1925). É interessante notar que embora tenha sido descrita na década de 1920, sua importância econômica foi reconhecida somente a partir da primeira metade da década 70, quando houve um aumento na incidência e severidade da doença nos Estados do Sudoeste e Centro-Atlântico dos EUA (LATTERELL; ROSSI, 1983). Desde então, a doença passou a ser encontrada em outras regiões dos EUA e também em outras partes do mundo. Na África, os primeiros relatórios da cercosporiose foram feitos em 1990 por Nutter e Jenco (1992), em KwaZulu-Natal, África do Sul. A partir de então, o patógeno disseminou-se rapidamente por todo o continente africano. Surto da doença têm sido relatados no Brasil, Peru, Venezuela, Costa Rica, México, Colômbia e Trinidad e Tobago (VIÉGAS, 1945; CHUPP, 1953; LATTERELL; ROSSI, 1983). Atualmente a doença encontra-se mundialmente difundida, sendo relatada no Sudeste da Ásia, Índia, China, Austrália e Filipinas (BAIR; AYRES, 1986; LIPPS et al., 1998; WARD et al., 1999; WHITE, 1999; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004; COATES; WHITE, 1995).

A cercosporiose ganhou importância no Brasil a partir de 2000, quando severas epidemias da doença ocorreram na Região Sudoeste de Goiás (Rio Verde, Montividiu, Jataí). A doença provocou grandes perdas na produtividade de milho naquela região, tendo sido relatada posteriormente em Paracatu, Minas Gerais e em Dourados, Mato Grosso do Sul (FANTIN, et al., 2001; CASELA; FERREIRA, 2003). O aumento da doença está associado à monocultura, à expansão da área cultivada em sistema de plantio direto, à irrigação por pivô central e ao plantio da safrinha, os quais contribuíram para aumentar o potencial de inóculo, através da preservação do patógeno em restos culturais infectados.

O impacto da cercosporiose na cultura se deve ao fato do patógeno colonizar grande parte do tecido foliar, levando à senescência e morte prematura das folhas. Tal efeito reduz a interceptação da radiação, o que diminui, por conseguinte, a produção e a translocação de fotoassimilados para os grãos (WARD et al., 1999). Folhas de genótipos suscetíveis podem tornar-se severamente secas ou mortas antes da maturação fisiológica. Os danos também ocorrem pelo enfraquecimento da planta, que, por sua vez, favorece podridões de colmo levando ao tombamento da planta (WARD, 1996).

Os danos provocados pela cercosporiose podem ser significativos e diferentes perdas têm sido relatadas. As perdas estimadas com a doença podem chegar a 50% do potencial de rendimento em áreas produtoras de milho nos EUA (AYERS; JOHNSON; HILL, 1984; GEVERS; LAKE; HOHLS, 1994). Na África, a perda provocada pela doença pode chegar a 60%, principalmente com o cultivo de híbridos susceptíveis (WARD et al., 1999). No Brasil, informações acerca das perdas provocadas pelo patógeno podem chegar a 80%, dependendo do híbrido e das condições de produção (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006; BRITO et al., 2007; FANTIN et al., 2008). Este problema tem levado muitos pesquisadores a ingressar em diferentes programas de pesquisa à procura de soluções para o problema.

2.2.2 Sintomatologia

Os sintomas iniciais da doença são geralmente observados nas folhas do baixeiro, durante a fase de floração (LIPPS, 1987; WARD et al., 1999), onde o fungo coloniza a limbo foliar, provocando áreas necróticas. As lesões da doença apresentam coloração marrom a verde-oliva, com o formato linear-retangular que geralmente são delimitadas, na largura, pelas nervuras (LATTERELL; ROSSI, 1983; WARD et al., 1999). Em condições de alta umidade relativa, há a formação de densa esporulação do patógeno, que dá às lesões uma coloração acinzentada, característica da doença (CHUPP, 1953). Infecções precoces são indistinguíveis daquelas causadas por outros fungos patogênicos, exceto por um halo amarelado visível quando observado através da luz (STROMBERG, 1986). Em estádios mais avançados da doença ocorre a coalescência das lesões, destruindo grande proporção do tecido foliar (CHUPP; SHEREF, 1960). O tamanho da lesão, número e tipo pode variar entre os genótipos de milho. Em híbridos suscetíveis geralmente observam-se inúmeras lesões necróticas (HUFF; AYERS; HILL, 1988; LIPPS; THOMISON; PRATT, 1996), enquanto que, em

híbridos moderadamente resistentes, as lesões são cloróticas (AYLOR, 1990; RUPE; SIEGEL; HARTMAN, 1982).

As lesões causadas por *C. sorghi* var. *maydis* são geralmente pequenas, sempre circundadas por halos cloróticos e com presença de pequena quantidade de esporos, uma vez que o patógeno apresenta pouca eficiência na colonização dos tecidos foliares (CHUPP, 1953; LATTERELL; ROSSI, 1983; WARD et al., 1999) .

2.2.3 Etiologia

Até recentemente, considerava-se que a cercosporiose do milho era causada primariamente pela espécie *C. zea-maydis* Tehon & E. Y. Daniels (teleomorfo: *Mycosphaerella* sp.), havendo ainda outra espécie associada à doença, *C. sorghi* var. *maydis* Ellis & Everth., supostamente de menor importância (CARSON, 1999). Também, por algum tempo, foi aceito que *C. zea-maydis* tratava-se de um complexo constituído de espécies *siblings*, ou seja, espécies morfologicamente similares, porém reprodutivamente isoladas, as quais foram denominadas de grupos I e II (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998; DUNKLE; LEVY, 2000; GOODWIN; DUNKLE; ZISMANN, 2001). Esses grupos foram posteriormente considerados espécies distintas, em que *C. zea-maydis* foi circunscrita pelas características genotípicas e fenotípicas apresentadas pelo Grupo I, e uma nova espécie foi circunscrita com base nas características do Grupo II, à qual foi dado o nome de *C. zeina* Crous & U. Braun (CROUS et al., 2006). A distinção das espécies *C. zea-maydis* e *C. zeina* foi consubstanciada por análise filogenética de sequências de DNA da região ITS-5.8S rDNA e de segmentos dos genes que codificam as proteínas histona-3 (H3), fator de alongação 1 α (TEF), actina (ACT) e calmodulina (CAL), a qual mostrou que isolados dessas espécies se agruparam em clados distintos.

Ainda segundo Crous et al. (2006), *C. zeina* apresenta conidióforo curto e conídio fusiforme, enquanto que *C. zea-maydis* apresenta conidióforo longo e conídio obclavado-subcilíndrico. Além disso, *C. zeina* cresce mais lentamente em meio de cultura e não produz o pigmento púrpura associado à toxina cercosporina, o qual é típico para *C. zea-maydis*. Adicionalmente, as manchas foliares causadas por *C. zea-maydis* são oblongas, formando faixas ou manchas irregulares, de coloração cinza a marrom, com forma e tamanho variável e com bordas estreitas marrons. Já as lesões causadas por *C. zeina* são confinadas entre as nervuras, apresentando 2-3 mm de largura e 5-40 mm de comprimento, coloração cinza claro

a marrom palha, com bordas indistintas e cloróticas nas lesões jovens. O estudo de Crous et al. (2006) também mostrou a ocorrência do que pode tratar-se de uma nova espécie filogenética de *Cercospora* na África do Sul, cuja relevância deve ser melhor entendida.

Assim, à luz das informações disponíveis, em lesões de cercosporiose no milho podem ser encontradas as três espécies de *Cercospora* já descritas, *C. zea-maydis*, *C. zeina* e *C. sorghi* var. *maydis*, e uma espécie filogenética ainda não descrita formalmente (CROUS et al., 2006). No entanto, o impacto de *C. sorghi* var. *maydis* sobre a cercosporiose é desconhecido (CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2002). As informações sobre patogenicidade são mais consistentes apenas para *C. zea-maydis* e *C. zeina*, enquanto que as informações sobre a patogenicidade para *C. sorghi* var. *maydis* no milho são contraditórias, havendo dúvidas se essa espécie é mesmo patogênica ao milho ou trata-se apenas de uma espécie que coloniza o tecido lesionado pelas outras espécies (CARSON, 1999; CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2002; CROUS et al., 2006).

Em relação às características morfológicas, *C. zea-maydis* apresenta conidióforo pequeno a moderadamente grande, fasciculados (3-14), divergentes, ereto, subcilíndrico a flexuoso, distintamente geniculado-sinuoso, não ramificado, dimensões de 40-180 x 4-8 µm, (0) 1-8 septos, coloração oliváceo-palha a castanho médio, paredes finas e lisas. Conídios solitários, obclavado-subcilíndrico, dimensões 30-100 x 4-9 µm, 1-10 septos, coloração hialina, paredes finas e lisas, ápice obtuso, base obcônica truncada, hilo pouco espesso e escuro. Enquanto que, *C. zeina* apresenta conidióforos agregados (3-20), semidensos, divergentes, ereto, subcilíndrico a flexuoso, distintamente geniculado-sinuoso, não ramificado, dimensões de 40-100 µm, 1-5 septos, de coloração oliváceo-palha a castanho médio, paredes finas e lisas. Conídios solitários, fusiformes 40-100 x 6-9 µm, 1-10 septos, coloração hialina, paredes finas e lisas, ápice subobtusos e base subtruncada, hilo espesso, escuro e refrativo (Crous et al., 2006). Já *C. sorghi* var. *maydis* é bem distinta das demais espécies, apresenta conidióforos com coloração marrom escuro a oliváceo-palha, estreito na ponta, irregular na largura, não ramificado, dimensões 20-150 x 3-5,5 µm, multiseptados. Conídios quase cilíndricos, reto a moderadamente curvado, dimensões 300 x 2-5,5 µm, base truncada (CHUPP, 1953). No entanto, critérios morfológicos não são suficientes para diferenciação taxonômica de *C. zea-maydis* e *C. zeina* (WANG et al., 1998). Essas características podem ser utilizadas para distinguir de *C. sorghi* var. *maydis* (LATTERELL; ROSSI, 1983; KOSHIKUMO, 2011).

A distribuição geográfica das espécies de *Cercospora* spp. em regiões produtoras de milho ocorre de forma diferente. *Cercospora zea-maydis* tem sido a espécie predominante nos EUA e ocorrendo em outras partes do mundo como México, enquanto que *C. zeina* é predominante nos países da África e está presente também no leste dos EUA (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998; DUNKLE; LEVY, 2000; GOODWIN; DUNKLE; ZISMANN, 2001; OKORI et al., 2003; SHIM; DUNKLE, 2005; MEISEL et al., 2009; KINYUA et al., 2010). Já no Brasil, num estudo envolvendo a análise de 69 isolados, verificou-se a ocorrência de *C. zeina* em São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná; de *C. zea-maydis* na Bahia, Minas Gerais e São Paulo; e de *C. sorghi* var. *maydis* em São Paulo (BRUNELLI et al., 2008). Outro estudo mais recente, envolvendo 106 isolados coletados em sete municípios de Minas Gerais, mostrou que 75% dos isolados eram da espécie *C. sorghi* var. *maydis*, 14% de *C. zea-maydis* e 11% de *C. zeina* (KOSHIKUMO, 2011).

Informações sobre variabilidade patogênica são mais consistentes apenas para *C. zea-maydis* e *C. zeina*, sendo verificadas variações na agressividade entre as espécies. Dunkle; Carson (1998), Carson; Goodman; Williamson et al. (2002), verificaram uma variação significativa em agressividade dentro de cada grupo genético, mas não entre os grupos e verificaram também uma pequena, mas significativa interação entre isolado e híbrido. No entanto, Mathioni et al. (2006), verificaram que isolados de *C. zea-maydis* Grupo II (atualmente *C. zeina*) são mais agressivos do que isolados de *C. zea-maydis* Grupo I (atualmente *C. zea-maydis*) e ainda observaram diferença dentro de cada grupo. Já as informações sobre a patogenicidade *C. sorghi* var. *maydis* no milho são contraditórias, havendo dúvidas se essa espécie é mesmo patogênica ao milho ou trata-se apenas de uma espécie que coloniza o tecido lesionado pelas outras espécies (CARSON, 1999; CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2002; CROUS et al., 2006).

Nos últimos anos, a realização de estudos sobre a diversidade de espécies de *Cercospora* associadas à cercosporiose do milho foi facilitado pela existência de protocolos da reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos (*primers*) espécie-específicos para *C. zea-maydis*, *C. zeina* e *Cercospora* sp. (CROUS et al., 2006). Também, aumentou a disponibilidade de informações moleculares sobre espécies de *Cercospora* no *GenBank*, permitindo a identificação indireta de isolados, mediante comparações de seqüências de DNA de porções de genes ou regiões do genoma que são informativas sobre a filogenia do gênero *Cercospora*, (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998; TESSMANN et al., 2001; GOODWIN; DUNKLE; ZISMANN, 2001; CROUS et al., 2006). Da mesma forma,

diversos estudos têm gerado informações muito válidas em relação à caracterização fenotípica de isolados de *Cercospora* associados à cercosporiose, à produção de conídios em cultura para serem utilizados como inóculo e a métodos de inoculação e avaliação da agressividade de isolados em casa de vegetação e no campo (BAIR; AYRES, 1986; CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2002; ASEA et al., 2005; BRUNELLI et al., 2008; CROUS et al., 2006; MATHIONI et al., 2006; KOSHIKUMO, 2011).

O significado biológico do envolvimento de mais de uma espécie de *Cercospora* na cercosporiose do milho ainda não está muito claro. Segundo Crous; Groenewald (2005) e Crous et al. (2006), algumas espécies desse gênero têm a habilidade de colonizar plantas hospedeiras diferentes daquelas que são consideradas suas hospedeiras primárias. Assim, essas espécies passam a colonizar (*jump*) outros hospedeiros como um colonizador secundário, o qual esporula em lesões causadas pelo colonizador primário.

A importância de se obterem informações sobre a diversidade de espécies de *Cercospora* e sua variabilidade patogênica nas regiões produtoras de milho consiste na possibilidade de investigação da biologia do patógeno e na busca de genes resistentes à doença em programas de melhoramento.

2.2.4 O gênero *Cercospora*, conidiação microcíclica e produção de cercosporina

O gênero *Cercospora* Fresen. (1863) é um nome anamórfico (mitospórico) de *Mycosphaerella* (Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Dothidiomycetes, Ordem Capnodiales, Família Mycosphaerellaceae) (KIRK et al., 2008). Esse gênero representa um grande e diversificado grupo de patógenos de plantas, que estão distribuídos em todo o mundo e infecta uma vasta gama de hospedeiras, sendo mais de 3.000 espécies identificadas (POLLACK, 1987).

Muitas espécies de *Cercospora* e outros fungos podem usar conidiação microcíclica como um mecanismo de sobrevivência quando as condições são desfavoráveis para o crescimento vegetativo. Fatores como seca, reduzida nutrição, mudança de pH, pouca umidade e temperatura podem influenciar neste processo (ROSSIER; TON-THAT; HARTMAN, 1977; FERNANDEZ; GLAWE; SINCLAIR, 1991; HANLIN, 1994). E neste processo, a produção de conídios (conídios secundários) ocorre após a germinação de esporos, na ausência da fase intermediária do crescimento vegetativo (HANLIN, 1994; ULLOA; HANLIN, 2000), para esporos sexuais tal processo não é observado (HANLIN, 1994).

O fenômeno tem sido descrito para uma variedade de fungos, incluindo patógeno de plantas dos gêneros *Aspergillus*, *Claviceps*, *Colletotrichum*, *Cercospora* (ANDERSON; SMITH, 1971; RATHAIAH, 1977; BANDYOPADHYAY et al., 1990; FERNADEZ; GLAWE; SINCLAIR, 1991; LEANDRO et al., 2001; LAPAIRE; DUNKLE, 2003). Em *Cercospora zea-maydis* o processo de conidiação microcíclica foi relatado pela primeira vez por Lapaire; Dunkle (2003), que verificaram a produção de esporos secundários por terem submetidos conídios a estresse nutricional. Brunelli (2004), relatou a presença deste fenômeno para *C. zea-maydis* grupo I (atualmente *C. zea-maydis*) e ausência para grupo II (atualmente *C. zeina*). Intensa produção de microconídios foi observada por Lapaire; Dunkle (2003), quando inocularam esporos de *C. zea-maydis* em tricomas de soja, o que pode ser uma alternativa de permanência do inóculo na área, mesmo sem a presença do hospedeiro.

A produção de conídios secundários por fungos patogênicos de plantas é significativa apenas se existir um mecanismo eficiente de libertação e de dispersão desses conídios. Como *Cercospora* spp. produz conídios em conidióforos eretos na superfície foliar e são facilmente disperso pelo vento (LATTERELL; ROSSI, 1983), os conídios secundários podem destacar dos conidióforos através de pequenas turbulências de ar, resultando na dispersão de mais conídios (MEREDITH, 1973).

Muitos fungos fitopatogênicos produzem metabólitos secundários de baixo peso molecular, que tem papel significante na interação planta-patógeno (YODER, 1980). É o caso da cercosporina, produzida por muitas espécies de *Cercospora* (ASSANTE et al., 1977; FAJOLA, 1978; LYNCH; GEOGHEGAN, 1979), como *C. zea-maydis*, o agente causal da cercosporiose em milho (CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2001; BRUNELLI, 2004; CROUS et al., 2006; KOSHIKUMO, 2011). A cercosporina, um metabólico secundário fotoativo que é tóxico a um amplo espectro de organismos, portanto não específica e não seletiva (DAUB, 1982; BATCHVAROVA; REDDY; BENNETT, 1992; DAUB; EHRENSHAFTM, 2000).

A cercosporina está incluída no grupo químico das perilenequinonas e sua produção ocorre via rota dos policetídeos, (condensação das moléculas de malonato e acetato) (DAUB; EHRENSHAFTM, 2000; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005; CHOQUER et al., 2005). A principal característica do grupo é a capacidade de absorver energia luminosa. Na presença de luz, a cercosporina torna-se excitada sendo capaz de reagir com outras moléculas. O principal alvo da reação é o oxigênio. Esse, ao reagir com a cercosporina, é convertido em espécies de oxigênio reativo, incluindo oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e radicais superóxidos (O_2^-), altamente

tóxicas por danificarem componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DAUB; BRIGGS, 1983), danificando a integridade da membrana celular, desordenando a estrutura citoplasmática e ocasionando a morte celular (FAJOLA, 1978; DAUB, 1982).

Pode-se detectar a cercosporina em cultivo *in vitro* de *Cercospora* spp. (DAUB; EHRENSHAFT, 2000) ou partir-se de tecidos lesionados de plantas infectadas (ROBESON; JALAL, 1993). A produção de cercosporina *in vitro* é fortemente influenciada pela composição do meio de cultura, temperatura, luz, e taxa de C:N e as condições ótimas são específicas para cada isolado. O cultivo desses fungos em meio de cultura e sob regime de alta luminosidade provoca a liberação da toxina no meio, sendo observada pela formação da coloração púrpura (JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989).

Vários trabalhos apontam que a cercosporina desempenha um papel crítico na patogenicidade de *Cercospora* spp. (BALIS; PAYNE, 1971; MELOUK; SCHUH, 1987; DAUB; EHRENSHAFT, 2000; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005; DAUB; CHUNG, 2007) e funciona como fator de virulência do patógeno (STEINKAMP et al., 1981). A evidência mais convincente para o envolvimento de cercosporina na patogenicidade foi mostrada por Upchurch et al. (1991). Os autores verificaram que três isolados mutantes de *C. kikuchii* produziram menos que 2% da cercosporina e foram capazes de infectar plantas, porém foram menos agressivos em relação aos isolados com produção normal de cercosporina.

Alguns estudos demonstraram que *C. zeina* não consegue produzir cercosporina *in vitro*, quando comparados a *C. zea-maydis* ou *C. sorghi* var. *maydis* (CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2002; CROUS et al., 2006; BRUNELLI et al., 2008; KOSHIKUMO, 2011). A falta de produção *in vitro* não pode ser tomada como evidência definitiva de que um isolado não pode produzir cercosporina, esta diferença pode estar relacionada à necessidade de diferentes condições ambientais para a expressão dos seus genes (STEINKAMP et al., 1981; JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989).

2.2.5 Epidemiologia e manejo da cercosporiose no milho

As lesões resultantes da infecção inicial produzem conídios que são disseminados pelo vento ou por respingos de chuva, indo infectar novas folhas de milho (SHURTLEFF, 1980; BECKMAN; PAYNE, 1982; CASELA; FERREIRA, 2003) e não há evidências de que essa doença seja transmitida por sementes (NAZARENO; LIPPS; MADDEN, 1992; 1993; CARSON, 1999). A germinação de conídios de *C. zea-maydis* quando inoculadas em plantas

de milho e mantidas a temperatura ambiente ocorrem dentro de 24 horas. O crescimento do tubo germinativo é favorecido por longos períodos de umidade relativa do ar próxima a 100 %, sendo reduzido na presença de água livre na superfície da folha. Condições de alta umidade, temperaturas entre 22 a 30 °C, presença do hospedeiro susceptível e do inóculo associadas com chuvas frequentes na fase de florescimento e enchimento de grãos são fatores considerados determinantes para a infecção e desenvolvimento da lesão (CASELA; FERREIRA, 2003; PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005). Não há necessidade de períodos contínuos de alta umidade relativa do ar para a ocorrência de infecção, uma vez que o patógeno pode permanecer latente por um período de 14 a 28 dias (WARD et al., 1999).

Cercospora zae-maydis apresenta alta capacidade de produção de esporo, fazendo com que haja um aumento no número de lesões. Fatores como quantidade inicial do inóculo ou de doença, taxa de reprodução do patógeno em um mesmo ciclo da cultura e quantidade de tecido sadio na planta são fundamentais para determinar a taxa de progresso da doença. O uso crescente da prática da semeadura direta, plantio de segunda época e cultivo irrigado permitindo que o patógeno sobreviva nos restos culturais sobre a superfície do solo, contribui para o surgimento de epidemias severas (FANTIN et al., 2001; CASELA; FERREIRA, 2003).

O manejo integrado da cercosporiose no milho inclui as práticas que podem ser úteis no controle da doença, através da prevenção e da redução de sua taxa de desenvolvimento. Tais práticas podem incluir alternativas que contribuam para a redução da quantidade de inóculo inicial, como a rotação de culturas ou para a redução da taxa de desenvolvimento da doença, como o uso de híbridos resistentes e aplicação de fungicidas (WARD et al., 1999; REIS; CASA; BRESOLIN, 2004; CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

Não obstante a resistência genética ser o método mais importante e desejável para o controle de cercosporiose, a obtenção de genótipos geneticamente resistentes à doença tem sido dificultado devido ao fato de que a resistência oligogênica dominante não tem apresentado grande estabilidade. Por outro lado, a resistência que se mostra mais estável é regulada por um pequeno número de *loci* quantitativos, o que torna mais difícil sua transferência (CASELA; FERREIRA, 2003). Diversos programas de melhoramento genético de milho buscam o desenvolvimento de genótipos de milho com níveis mais elevados de resistência genética à cercosporiose, enfatizando a incorporação de resistência genética quantitativa (ASEA et al., 2005; JULIATTI et al., 2009; POZAR et al., 2009; VIEIRA et al., 2011).

A utilização de fungicidas químicos no controle da doença tem sido crescente no Brasil e em outros países (PINTO; ANGELIS; HABE, 2004; BRADLEY; PEDERSEN, 2011). Apesar de alguns fungicidas químicos pertencentes aos grupos benzimidazóis, triazóis, estrobilurinas fornecerem eficácia no controle da cercosporiose (WARD; NOWELL, 1998; MUNKVOLD et al., 2001; JARDINE; LACA-BUENDÍA, 2009, BRADLEY; PEDERSEN, 2011), a adoção dessa prática tem se mostrado economicamente viável principalmente em lavouras bem conduzidas e com bom potencial produtivo, sobretudo quando instaladas em área de risco de epidemias (FANTIN, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e obtenção dos isolados

Para o estudo de ocorrência de espécies de *Cercospora* em diferentes regiões produtoras de milho dos estados de Goiás e Paraná, amostras de 4 a 5 folhas de milho com sintomas de cercosporiose foram coletadas aleatoriamente em lavouras de 4 municípios do Estado de Goiás e de 17 municípios do Estado do Paraná (Figura 1), durante a safra agrícola de 2011/2012.

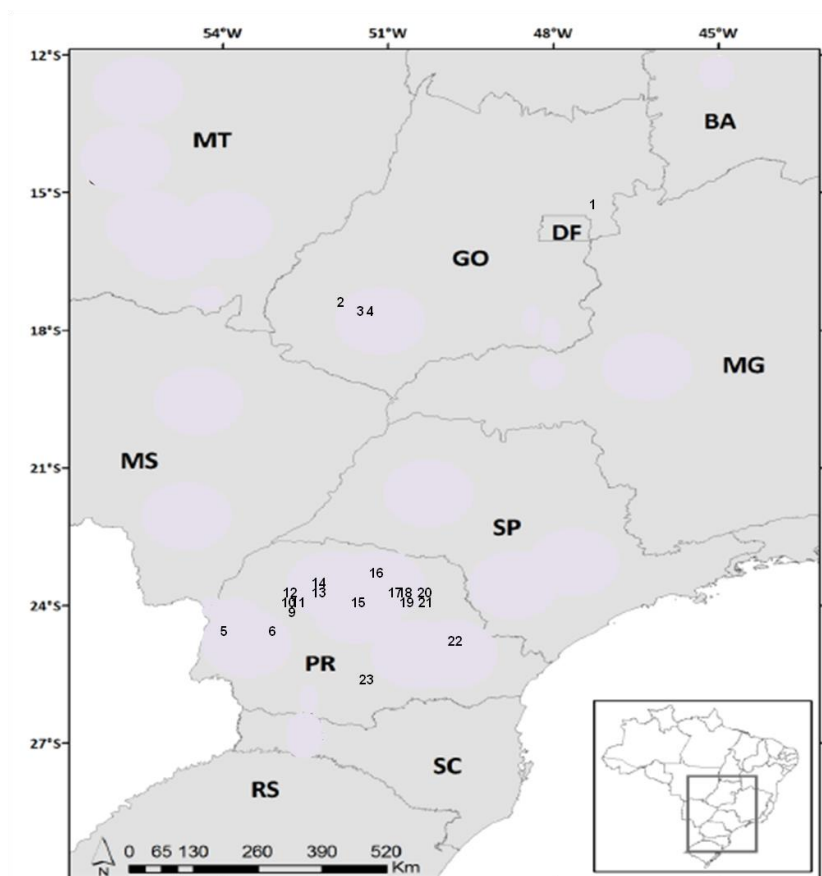


Figura1. Locais de coleta de amostras de folhas de milho com sintomas de cercosporiose no Estado de Goiás: Formosa (1); Montividiu (2); Rio Verde (3) e Santa Helena de Goiás (4), e no Estado do Paraná: Terra Boa (5); Goioerê (6); Peabiru (9); Ourizona (10); Engenheiro Beltrão (11); Terra Boa (12); Floresta (13); Maringá (14); Apucarana (15); Bela Vista do Paraíso (16); Sertanópolis (17); Sertaneja (18); Assaí (19); Leopólis (20); Jataizinho (21); Castro (22) e Guarapuava (23).

No estudo de distribuição espacial de espécies de *Cercospora* em lavouras de milho, na safra agrícola de 2011/2012, foram selecionadas duas lavouras de milho no Estado de Goiás, nos municípios de Montividiu e Rio Verde, e uma lavoura no Estado do Paraná, no município de Maringá. Em cada uma dessas lavouras foi demarcado aleatoriamente uma área de aproximadamente 1 hectare, o qual foi dividido visualmente em 25 quadros de 20 m x 20 m (400 m²) (Figura 2). Em cada quadro foram coletadas, aleatoriamente, folhas com sintomas de cercosporiose de plantas diferentes. Na área de Montividiu foram coletadas 2 folhas por quadro, originando 43 isolados monoconidiais, na área de Rio Verde foram coletadas 4 folhas por quadro, originando 89 isolados e na área de Maringá foram coletadas 5 folhas por quadro, originando 120 isolados.

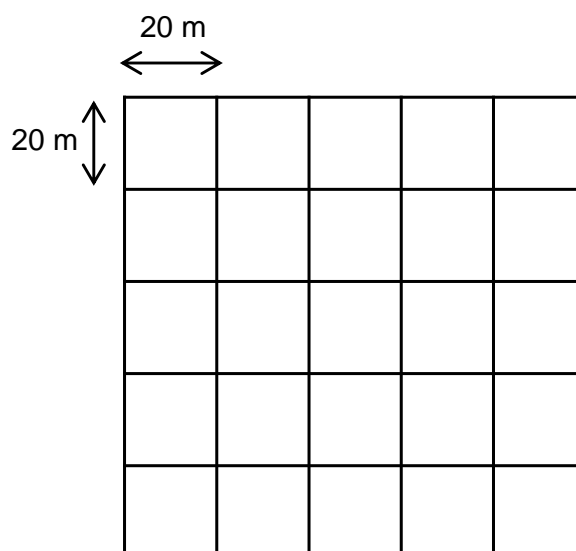


Figura 2. Esquema da amostragem para o estudo da distribuição espacial. Em cada quadro de 20 m x 20 m foram coletadas de 2 a 5 folhas de milho com sintomas de cercosporiose de plantas diferentes.

Para o isolamento do fungo, segmentos de folhas de milho contendo sintomas de cercosporiose foram desinfetadas superficialmente mediante lavagem em água corrente, seguida pela imersão em álcool 70 % por 20 segundos e em hipoclorito de sódio a 1 % por 40 segundos. Posteriormente, os segmentos de folha foram enxaguados em água destilada e esterilizada e secados em papel absorvente esterilizado. Os segmentos de folhas foram então transferidos para caixa Gerbox contendo três camadas de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas com água destilada e esterilizada (Figura 3). Após o período de 24

horas, no qual a caixa gerbox contendo os segmentos de folha foi mantida fechada, formando uma câmara úmida e com isso favorecendo a esporulação. Em seguida, foram coletados conídios com auxílio de uma agulha fina, os quais foram transferidos para tubo de ensaio contendo 3 mL de água destilada estéril. Após leve agitação do tubo contendo a suspensão de esporos, uma fração de 1 mL, da mesma suspensão foi espalhada em placas de petri contendo meio de cultura ágar-água 2 % e incubadas em câmara de crescimento no escuro de forma inclinada, sob temperatura de 23-25 °C, por 18 a 24 horas. Após incubação, com o auxílio de microscópio-esterioscópio e agulha histológica, fragmentos do meio de cultura ágar-água, contendo apenas um conídio germinado foram transferidos para tubo de ensaio com meio de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose e 16 g de ágar) e incubados em câmara de crescimento a 23-25 °C sob luz negra e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro por 7 dias.

Os isolados foram preservados a 4 °C, utilizando-se o método de crescimento em tubo de ensaio com o meio BDA, com adição de óleo mineral. A coleção dos isolados encontra-se no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá.

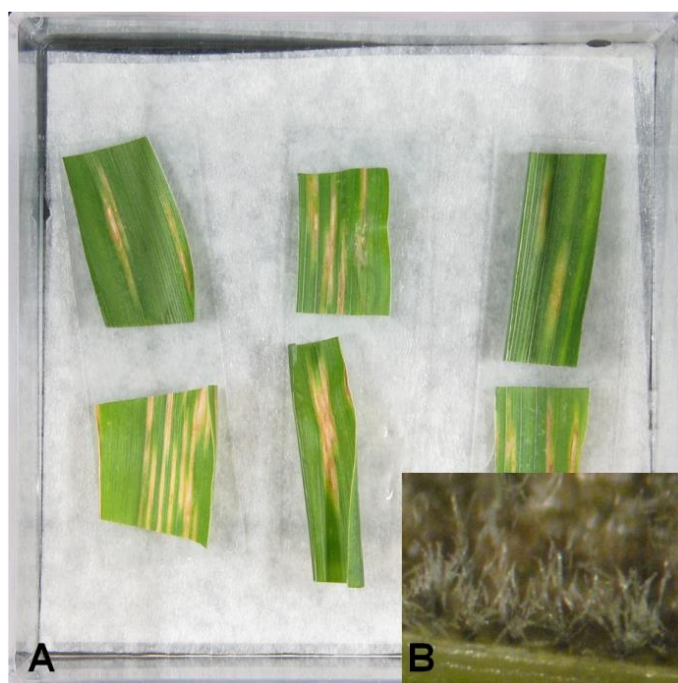


Figura 3. Detalhe da câmara úmida em placa gerbox contendo segmentos de folhas de milho apresentando sintomas de cercosporiose (A) e visualização da indução da produção de conídios de *Cercospora* sp., sobre o tecido necrosado da folha (B).

3.2 Identificação de espécie por PCR e caracterização filogenética

Para extração de DNA genômico dos isolados deste estudo utilizou-se o protocolo descrito por Doyle; Doyle (1987), com modificações. Primeiramente, obteve-se massa micelial dos isolados e, para isso, os mesmos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura V8-ágar (160 mL de V8[®] Campbell Soup Company, 3 g CaCO₃, 16 g Ágar e 840 mL água destilada) durante 7 dias, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob luz negra contínua. Após o período de incubação, a massa micelial foi raspada da superfície do meio e transferida para microtubos de 1,5 mL, os quais foram armazenados a -20 °C. Para extração de DNA, o micélio foi triturado em nitrogênio líquido, em um gral com pistilo e, aproximadamente o equivalente a 200 µL de micélio triturado foi transferido para microtubos de 1,5 mL, no qual foi adicionado 700 µL de tampão CTAB (2 % CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA (pH 8,0)) e 15 µL de β-mercaptoetanol. Os tubos foram mantidos a 65 °C por 15 minutos em banho-maria a seco, seguido de extração com solvente orgânico mediante a adição de 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos, 600 µL do sobrenadante foi transferido para novo microtubo no qual adicionou-se 5 µL de RNase na concentração de 20 mg/mL, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Para a precipitação do DNA adicionou-se 500 µL de isopropanol e 250 µL de acetato de amônio 7,5 M. Após centrifugação a 11.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 100 µL de etanol 70 %. O pellet foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,1 mM EDTA). As amostras de DNA foram mantidas a -20 °C. A qualidade do DNA das amostras foi avaliada mediante a corrida das amostras em gel de agarose 1 %.

Para a identificação da espécie com *primers* com especificidade para *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *Cercospora* sp., utilizaram-se os protocolos de PCR desenvolvidos por Crous et al. (2006). Neste protocolo, os *primers* CylH3F e CyIH3R são utilizados como *primers* externos e seus produtos de amplificação também atuam como controle positivo, e os *primers* CzeinaHist, CzeaeHist e CmaizeHist atuam como *primers* internos e específicos para as espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *Cercospora* sp., respectivamente (Tabela 1). O volume das reações de amplificação foi de 25 µL, contendo: 1 µL de DNA genômico (150-300 ng), 10 X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 1 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 mM do *primer* CylH3F, 1 mM do *primer* CyIH3R, 1mM do *primer* espécie-específico e 1 U de *Taq* polymerase. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Tpersonal

Whatman Biometra. O protocolo de amplificação foi de 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido de 15 ciclos de 20 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a 58 °C (anelamento), 40 segundos a 72 °C (extensão), bem como 25 ciclos de 20 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a 55 °C (anelamento), 40 segundos a 72 °C (extensão) e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C (extensão final).

A identificação molecular dos dois isolados de *C. sorghi* var. *maydis* obtidos no estudo foi realizada mediante amplificação por PCR de um segmento da região ITS-gene 5.8S do rDNA, com os *primers* ITS1 e ITS4 (Tabela 1), seguido de sequenciamento e comparação das sequências obtidas com sequências de *Cercospora* disponíveis no *GenBank* (*BLAST search*). Este procedimento foi repetido também para isolados representativos das espécies *C. zeina* e *C. zea-maydis* (16 e 6 isolados, respectivamente), visando confirmar a identificação molecular dessas espécies realizada com *primers* espécie-específicos. O volume final e as concentrações dos reagentes utilizados nas reações de amplificação por PCR foram as mesmas descritas por White et al. (1990). As condições de PCR para a amplificação do segmento da região ITS-gene 5.8S rDNA foram as seguintes: 1 ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto a 52 °C (anelamento), 2 minutos a 72 °C (extensão) e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C (extensão final). Os fragmentos amplificados foram purificados com kit ExoStar (GE Healthcare UK Limited), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. O sequenciamento de DNA das amostras foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Essas sequências foram editadas com o programa BioEdit 7.0.9.

Isolados representativos das espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis* obtidos neste estudo foram caracterizados filogeneticamente, incluindo-se na análise das sequências de DNA da região ITS-gene 5.8S do rDNA de isolados, dessas espécies que estão depositadas no *GenBank*. Para isso, as sequências de DNA dos isolados deste estudo foram alinhadas entre si e com sequências de DNA de isolados representativos das espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis* do *GenBank* com o programa BioEdit 7.0.9, e o conjunto de dados foi submetido à análise filogenética com o programa PAUP *4.0, utilizando-se o método de máxima parcimônia. Os ramos das árvores foram estatisticamente testados pelo método *bootstrap*, com 1000 repetições.

Tabela 1. Descrição dos *primers* utilizados na identificação e sequenciamento das espécies de *Cercospora* spp.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'	Espécie alvo	(pb) ¹	Referências
CylH3F	agg tcc act ggt ggc aag	-	389	Crous et al. 2006
CylH3R	tgg atg tcc ttg gac tg	-		
CzeinaHist	tcg agt ggc cct cac cgt	<i>C. zeina</i>	284	Crous et al. 2006
CzeaeHist	tcg act cgt ctt tca ctt g	<i>C. zea-maydis</i>	284	Crous et al. 2006
CmaizeHist	tcg agt cac ttc gac ttc c	<i>Cercospora</i> sp.	284	Crous et al. 2006
ITS1	tcc gta ggt gaa cct gcg g	-	500	White et al. 1990
ITS4	tcc tcc gct tat tga tat gc	-		

¹ Pares de bases

3.3 Caracterização fenotípica

3.3.1 Características culturais

Para determinação da cor das colônias e a produção de pigmentação púrpura pelos isolados, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas com meio BDA, as quais foram incubadas a 25 ± 2 °C, sob dois tipos de luz (branca e negra), com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro, por 21 dias.

A taxa de crescimento micelial foi determinada sob dois tipos de luz (branca e negra). Para isso, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de 6 cm de diâmetro contendo BDA e incubadas em temperatura de 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 24X2, sendo 24 isolados e 2 tipos de luz (branca e negra) com repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de 6 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA.

Para a avaliação da taxa de crescimento micelial foram realizadas três medições do diâmetro das colônias com sete, quatorze e vinte e um dias de crescimento. As medições ocorreram em dois eixos perpendiculares da placa. Com auxílio de um paquímetro eletrônico digital, obteve-se a média de cada repetição. Em seguida determinou, para cada isolado, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) segundo a fórmula de Maguire (1962)

adaptada por Oliveira (1991): $IVCM = \sum(D - D_a) / N$, em que IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial, D = diâmetro médio atual, D_a = diâmetro médio do dia anterior, e N = número de dias após a incubação. O experimento foi repetido duas vezes.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas empregando-se o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.3.2 Características morfológicas

Lâminas contendo estruturas reprodutivas dos isolados de *Cercospora* spp foram preparadas para observação ao microscópio ótico, sob aumento de 400 X. As imagens observadas ao microscópio foram capturadas por uma câmera de vídeo (Moticam 2000) e as dimensões de conidióforos e conídios foram determinadas com a análise da imagem digital. Com auxílio do Programa Motic Images Plus 2.0, avaliou-se o comprimento e a largura de 50 conídios e conidióforos e o número de septos dos conídios de isolados de *Cercospora* sp. cuja espécie foi identificada previamente por métodos moleculares.

3.3.3 Caracterização da patogenicidade das espécies de *Cercospora* e comparação da agressividade de isolados

Nesse experimento foram avaliados isolados, representativos das espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis*, que foram previamente identificados neste estudo por PCR ou sequenciamento (Tabela 2). O método de inoculação utilizado no ensaio foi de acordo com o procedimento empregado por Mathioni et al. (2006), com modificações. O inóculo foi preparado transferindo-se cinco discos de meio de cultura V8 colonizados pelo fungo para frascos erlenmeyer de 125 ml, contendo 10 g de sementes de sorgo previamente umedecidas com 8 mL de água destilada e esterilizadas por meio de autoclavagem durante 1 hora a 1atm. Os frascos foram mantidos a 25 °C com luz negra contínua durante 10 dias.

A inoculação nas plantas foi realizada por meio do depósito de 15 sementes de sorgo colonizadas pelo patógeno no cartucho de cada planta de milho no estágio vegetativo (V3), com três a quatro folhas desenvolvidas (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993). Após a inoculação, os vasos foram mantidos em câmara úmida sob alta umidade através de irrigações diárias durante 30 dias (Figura 4).

Tabela 2: Isolados de *Cercospora* sp. utilizados no estudo da patogenicidade e agressividade em casa de vegetação.

Identificação do isolado	Espécie ¹	Origem (Município/Estado)
FOR01	<i>C. zeaе-maydis</i>	Formosa/GO
FOR02	<i>C. zeaе-maydis</i>	Formosa/GO
FOR04	<i>C. zeaе-maydis</i>	Formosa/GO
FOR08	<i>C. zeaе-maydis</i>	Formosa/GO
SHG12	<i>C. zeaе-maydis</i>	Santa Helena de Goiás/GO
CTR03	<i>C. zeina</i>	Castro/PR
FOR07	<i>C. zeina</i>	Formosa/GO
FTA02	<i>C. zeina</i>	Floresta/PR
GOA65	<i>C. zeina</i>	Rio Verde/GO
GOB21	<i>C. zeina</i>	Montividiu/GO
RVD16	<i>C. zeina</i>	Rio Verde/GO
PR035	<i>C. zeina</i>	Maringá/PR
PR113	<i>C. zeina</i>	Maringá/PR
GOI12	<i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> ²	Goioêre/PR

¹ Espécies previamente identificadas neste estudo por PCR ou sequenciamento

² Isolado utilizado somente no teste de patogenicidade



Figura 4. Plantas de milho utilizadas no experimento de avaliação da agressividade de isolados de *Cercospora* spp. (A) e detalhe mostrando o cartucho de uma planta com inóculo de *Cercospora* sp., constituído por sementes de sorgo colonizada pelo fungo (B).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no período de maio a junho de 2012. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com nove repetições, sendo cada parcela formada por um vaso (30 cm de diâmetro por 20 cm de altura) contendo três plantas do híbrido moderadamente suscetível Formula (Syngenta Seeds Ltda).

A avaliação foi realizada aos 30 dias após a inoculação, na quinta e na sexta folha de cada planta. Para tanto, foi tirada uma fotografia das folhas sintomáticas e com a ajuda do software Assess 2.0 (*American Phytopathological Society*) foi quantificada a porcentagem da área foliar lesionada. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação múltipla de médias (Scott Knott a 5%) com o programa SAS (versão 8.1 – SAS Institute, 1991) e SISVAR (FERREIRA, 2000).

Ao término do experimento, lesões dos sintomas induzidos pelos isolados de *Cercospora* sp. foram coletadas e colocadas em câmara úmida para esporulação do fungo, em seguida reisolados. Foram obtidas duas culturas monospóricas para cada isolado. De cada cultura monoconidial foi feita extração de DNA e identificação por PCR, conforme descrito anteriormente, para comprovar a patogenicidade e a espécie.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Identificação e ocorrência de espécies de *Cercospora* no milho em Goiás e Paraná

O protocolo da reação em cadeia da polimerase desenvolvido por Crous et al. (2006), o qual emprega *primers* espécie-específicos, possibilitou a identificação das espécies *C. zeina* e *C. zea-maydis* de isolados obtidos em folhas de milho com lesões coletadas em Goiás e Paraná. A Figura 5 ilustra os resultados obtidos para três isolados diferentes, representativos das espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *Cercospora* sp. Na Figura 5A é mostrado os produtos da reação de amplificação com os *primers* CyIH3F, CyIH3R e CzeinaHist, observando-se a presença de duas bandas na coluna 1, com tamanho de 284 e 389 pb, o que permite identificar este isolado como *C. zeina*. Já na Figura 5B é mostrado os produtos da reação de amplificação com os *primers* CyIH3F, CyIH3R e CzeaeHist, observando-se também a presença de duas bandas na coluna 2, com tamanho de 284 e 389 pb, o que permite identificar este isolado como *C. zea-maydis*. A coluna 3, nas duas figuras, corresponde à identificação parcial do isolado GOI12 de *Cercospora* sp. É interessante notar que a identificação dos isolados GOI12 e GOI13 foi negativa quando foram utilizados *primers* com especificidade para *C. zeina* e *C. zea-maydis*, como também, quando foram utilizados *primers* com especificidade para uma espécie de *Cercospora* não identificada, a qual foi caracterizada como *Cercospora* sp. CPC12062 por Crous et al., 2006.

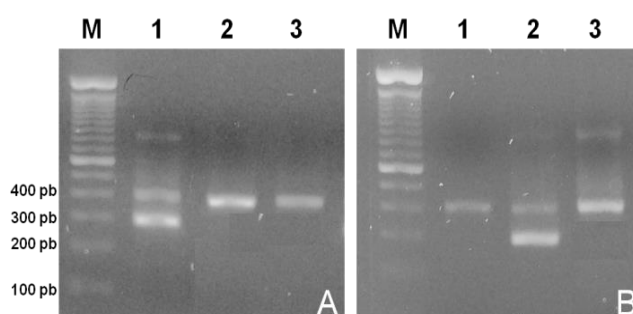


Figura 5. Gel de agarose mostrando bandas correspondentes a produtos de PCR com a utilização dos *primers* CyIH3F, CyIH3R e CzeinaHist, específicos para *C. zeina* (A); e *primers* CyIH3F, CyIH3R e CzeaeHist, específicos para *C. zea-maydis* (B). Em que M, é o marcador de 100pb; 1, 2 e 3, representam os isolados GOA30 de *C. zeina*, FOR01 de *C. zea-maydis* e GOI12 de *Cercospora* sp. O fragmento de 389 pb presente nas Figuras A e B é obtido para *Cercospora* spp (controle positivo) e os fragmentos de 284 pb presentes nas Figuras A e B correspondem à amplificação positiva para *C. zeina* e *C. zea-maydis*, respectivamente.

Como não foi possível a identificação dos isolados GOI12 e GOI13 com o protocolo desenvolvido por Crous et al. (2006), esses isolados foram identificados apenas pela comparação das sequências de DNA de um fragmento das regiões ITS1 e ITS2 e do gene 5.8S do rDNA desses isolados com sequências de espécies de *Cercospora* disponíveis no *GenBank*. Assim, verificou-se que os fragmentos com 506 pares de bases das regiões ITS1 e ITS 2 e gene 5.8S do rDNA desses isolados apresentaram a maior similaridade (99 %) com a espécie *C. sorghi* var. *maydis*, dentre as espécies com informações disponíveis no *GenBank* (Tabela 3).

A identificação molecular de 16 isolados representativos das espécies *C. zeina* e 6 isolados *C. zea-maydis*, os quais foram previamente identificados por PCR com *primers* espécie-específicos, foi também confirmada pela análise de sequenciamento de DNA das regiões ITS1 e ITS 2 e gene 5.8S do rDNA (Tabela 3), que confirmou a especificidade dos *primers* interno-específicos desenvolvidos por Crous et al. (2006).

Tabela 3. Identificação de espécies de *Cercospora* sp., a partir de isolados associados à mancha foliar do milho no Brasil empregando oligonucleotídeos (*primers*) com especificidade para *C. zeina* e *C. zea-maydis* e também baseada no maior percentual de identidade com sequências das regiões ITS1 e ITS2 e gene 5.8S do rDNA de isolados de referência de *Cercospora* do *GenBank* (506 a 560 pares de bases).

Isolado	Identificação com <i>primer</i> espécie-específico ¹	Identificação por sequenciamento	
		Espécie de referência e número de acesso no <i>GenBank</i>	Identidade (%)
GOI12, GOI13	-	<i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> / AF297232	99
FOR07, GOB06, GOB20, MOT01, GOA30, GOA32, GOA65, RVD06, RVD16, CTR03, FTA02, PR035, PR057, PR113, ORZ03, SER01	<i>C. zeina</i>	<i>C. zeina</i> / AF291710	99
FOR01, FOR02, FOR04, FOR06, FOR08, SHG12	<i>C. zea-maydis</i>	<i>C. zea-maydis</i> / AF291709	99

¹ Protocolo de Crous et al. (2006)

Este estudo identificou três espécies de *Cercospora* associadas à cercosporiose do milho: *C. zeina* e *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis*. Oriundos de Estado de Goiás foram analisados 75 isolados e a espécie predominante foi *C. zeina* (90.7 % dos isolados), seguido de *C. zea-maydis* (9.4 % dos isolados) (Tabela 4). No Estado do Paraná, foram analisados 74 isolados e a espécie predominante também foi *C. zeina* (97.3 % dos isolados) em relação a *C. sorghi* var. *maydis* (2.7 % dos isolados) (Tabela 5).

No Brasil, um estudo envolvendo a análise de 69 isolados, verificou-se a ocorrência de *C. zeina* em São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná; de *C. zea-maydis* em Bahia, Minas Gerais e São Paulo; e de *C. sorghi* var. *maydis* em São Paulo (BRUNELLI et al., 2008). Outro estudo mais recente, envolvendo 106 isolados coletados em sete municípios de Minas Gerais, mostrou que 75 % dos isolados eram da espécie *C. sorghi* var. *maydis*, 14 % de *C. zea-maydis* e 11 % de *C. zeina* (KOSHIKUMO, 2011).

Assim, os resultados deste estudo confirmam a ocorrência de *C. zeina* em Goiás e no Paraná. Porém, como este trabalho envolveu a análise de 156 isolados monospóricos, foi possível identificar outras espécies associadas à doença nestes Estados.

Tabela 4. Distribuição das espécies *C. zeina* e *C. zea-maydis* em diferentes municípios do Estado de Goiás, a partir da análise de PCR e denominação dos isolados obtidos.

Município	Nº de isolados	Espécies	Denominação do isolado
Rio Verde	42	<i>C. zeina</i>	RVD01 a RVD42
Montividiu	3	<i>C. zeina</i>	MOT01, MOT02, MOT03
Santa Helena de Goiás	17	<i>C. zeina</i>	SHG01 a SHG11, SHG13 a SGH18
	1	<i>C. zea-maydis</i>	SHG12
Formosa	6	<i>C. zeina</i>	FOR03, FOR05, FOR07, FOR09, FOR11, FOR12
	6	<i>C. zea-maydis</i>	FOR01, FOR02, FOR04, FOR06, FOR08, FOR10
Total	75		

Tabela 5. Distribuição das espécies *C. zeina* e *C. sorghi* var. *maydis* em diferentes municípios do Estado do Paraná, a partir da análise de PCR e denominação dos isolados obtidos.

Município	Nº de isolados	Espécies	Denominação do isolado
Apucarana	1	<i>C. zeina</i>	APU01
Assai	1	<i>C. zeina</i>	ASS01
Bela Vista do Paraiso	3	<i>C. zeina</i>	BVP01a BVP03
Castro	6	<i>C. zeina</i>	CTR01 a CTR06
Engenheiro Beltrão	1	<i>C. zeina</i>	ENB01
Floresta	5	<i>C. zeina</i>	FTA01 a FTA05
Goioerê	2	<i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i>	GOI12, GOI13
Guarapuava	21	<i>C. zeina</i>	GUA01 a GUA21
Jataizinho	1	<i>C. zeina</i>	JAT01
Leopólis	2	<i>C. zeina</i>	LEO01, LEO02
Maringá	13	<i>C. zeina</i>	MGA01 a MGA13
Ourizona	3	<i>C. zeina</i>	ORZ01a ORZ03
Peabiru	4	<i>C. zeina</i>	PEA01 a PEA04
Sertaneja	5	<i>C. zeina</i>	STJ01 a STJ02
Sertanópolis	2	<i>C. zeina</i>	SER01, SER02
Terra Boa	2	<i>C. zeina</i>	TBO01, TBO02
Terra Roxa	2	<i>C. zeina</i>	TRO01, TRO02
Total	74		

São poucos os estudos publicados sobre a distribuição geográfica de espécies de *Cercospora* nas principais regiões produtoras de milho no mundo. Nos EUA, a espécie *C. zeae-maydis* (antigo *C. zeae-maydis* Grupo I) é considerada dominante e *C. zeina* (antigo *C. zeae-maydis* Grupo II) foi identificada apenas na região leste daquele país (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998; DUNKLE; LEVY, 2000; CROUS et al., 2006). *Cercospora zeae-maydis* (antigo *C. zeae-maydis* Grupo I) também tem sido relatada em áreas do México, China e Canadá (DUNKLE; LEVY, 2000; ZHU et al., 2002; GROENEWALD et al., 2012). Na África do Sul, Zâmbia e Zimbábwe, Malawi, Uganda, Ruanda, apenas *C. zeina* tem sido encontrada

associada a lesões de cercosporiose (DUNKLE; LEVY, 2000; OKORI et al., 2003; CROUS et al., 2006; MEISEL et al., 2009). No Quênia, *C. zeina* e *C. sorghi* var. *maydis* foram identificadas a partir de lesões da doença (KINYUA et al., 2010).

4.2 Análise da distribuição espacial dessas espécies em lavouras de milho dos Estados de Goiás e Paraná

Nas três áreas do estudo de destruição espacial das espécies verificou-se a ocorrência apenas de *C. zeina*. Em Goiás, embora tenha sido encontrada a espécie *C. zea-maydis* em algumas lavouras, essa espécie não foi encontrada nas áreas de estudo de distribuição espacial de Montividiu e Rio Verde, as quais incluíram 43 e 89 isolados, respectivamente. Da mesma forma no Paraná, embora tenha sido encontrada a espécie *C. sorghi* var. *maydis* no município de Goioerê, a mesma não foi encontrada na área que foi alvo do estudo de distribuição espacial em Maringá, a qual incluiu 120 isolados.

4.3 Caracterização filogenética de isolados de *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis*

A árvore filogenética inferida com base nas sequências de DNA da região ITS-5.8S gene do rDNA mostra que os isolados de *Cercospora* sp. do milho deste estudo se agruparam em três grupos ou clados distintos (Figura 6). O primeiro clado contém 16 isolados de *C. zeina* (suporte de *bootstrap* de 98 %), o segundo clado contém 6 isolados de *C. zea-maydis* (suporte de *bootstrap* de 89 %) e o terceiro clado reuniu 2 isolados de *C. sorghi* var. *maydis* (suporte de *bootstrap* de 84 %). Nota-se que na árvore filogenética os dezesseis isolados de *C. zeina*, os seis isolados de *C. zea-maydis*, e os dois isolados de *C. sorghi* var. *maydis* agruparam-se com sequências de *strains* que são referências dessas espécies.

Um estudo recentemente feito por Groenewald et al. (2012), analisou 360 isolados de *Cercospora*, obtidos a partir de 161 espécies de plantas hospedeiras de 49 famílias e coletados em 39 países, esses isolados foram usados para compilar uma filogenia molecular baseada em seguimentos da região ITS do rDNA e dos genes calmodulina (CAL), fator de alongação (TEF), Actina (ACT) e histona (HIST), e identificaram 73 espécies diferentes de *Cercospora*. A região ITS apresenta resolução limitada para quase todas as espécies de *Cercospora* e, por conseguinte, os resultados de outras regiões de genes são particularmente úteis para

comparação da estabilidade de clados na análise filogenética. No entanto, os autores concluíram que apenas a região ITS foi capaz de distinguir *C. zeina* e *C. zea-maydis* do resto das espécies incluídas. Resultado semelhante foi observado por Crous et al. (2006).

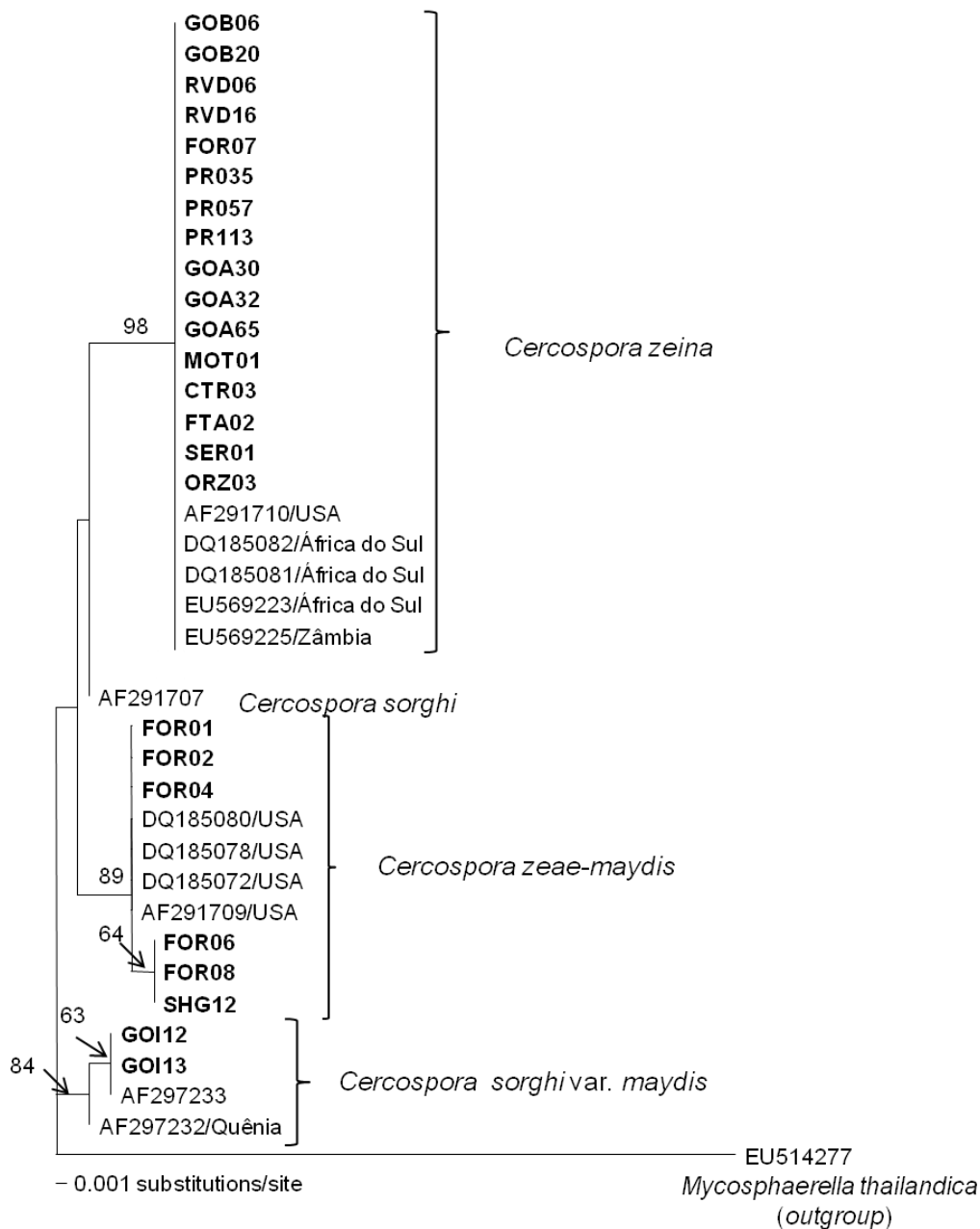


Figura 6. Árvore filogenética inferida a partir de seqüências de DNA das regiões ITS1-5.8S do rDNA de isolados de *Cercospora* spp. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem da análise de *bootstrap* nas quais as repetições foram observadas (1.000 repetições). As seqüências de DNA dos isolados em negrito foram obtidas neste trabalho, enquanto as demais seqüências foram obtidas do *GenBank* (com o número de acesso).

4.4 Caracterização fenotípica de isolados de *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis*

4.4.1 Características culturais

Os resultados da caracterização morfológica, juntamente com os resultados das características culturais dos isolados, foram concordantes com a identificação das espécies utilizando *primers* interno-específicos. Portanto, os *primers* desenvolvidos por Crous et al. (2006), são específicos e viáveis para identificação de espécies de cercospora no milho.

Tanto em luz branca como sob luz negra as colônias de *C. zeina* apresentam coloração branca, branca-acinzentada, branca-rosácea, acinzentada ou cinza-avermelhada, aspecto cotonoso, com bordas irregulares (Figura 7). As colônias de *C. zea-maydis* apresentam coloração branca, branca-acinzentada, branca-rosácea ou cinza-avermelhada, aspecto também cotonoso, com bordas também irregulares (Figura 8). *Cercospora sorghi* var. *maydis* apresenta colônias de coloração branca-acinzentada ou acinzentada, aspecto cotonoso e com bordas regulares (Figura 9).

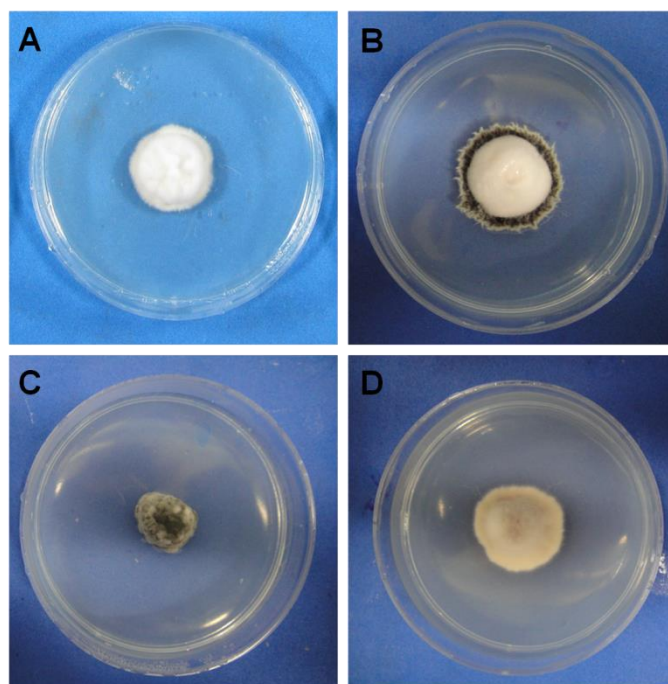


Figura 7. Colônias de *C. zeina* em meio de cultura BDA. Isolado GOA30(A), Isolado GOB06 (B), Isolado CTR03(C) e Isolado GOA65 (D).

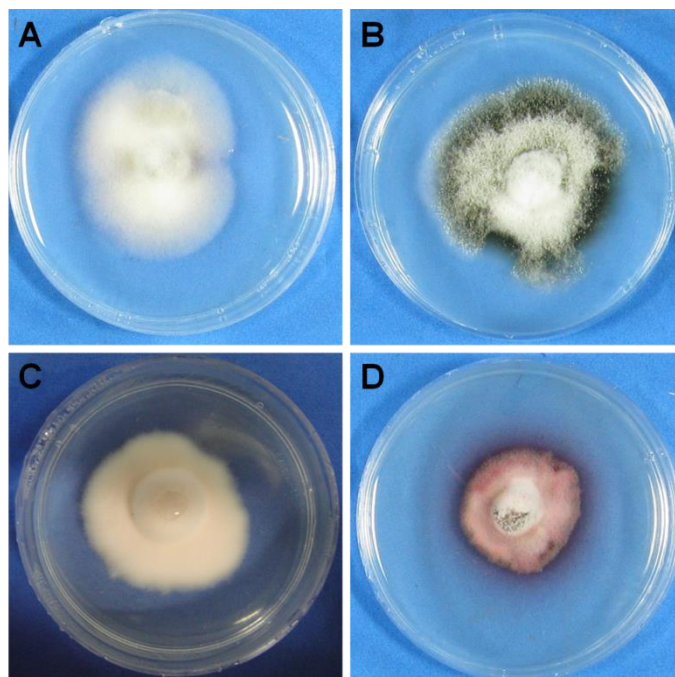


Figura 8. Colônias de *C. zeae-maydis* em meio de cultura BDA. Isolado FOR01(A), Isolado FOR08 (B), Isolado FOR02 (C) e Isolado SHG12 (D).

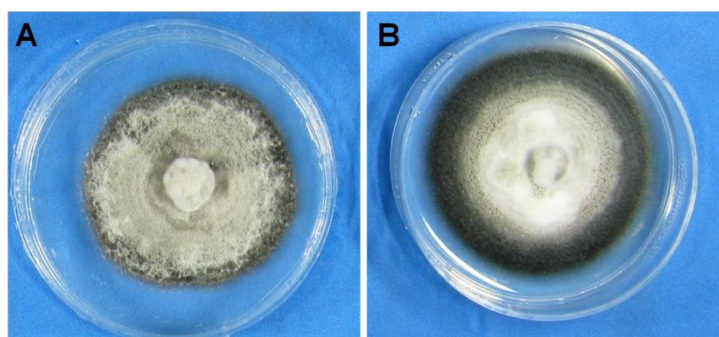


Figura 9. Colônias de *C. sorghi* var. *maydis* em meio de cultura BDA. Isolado GOI13(A) e Isolado GOI12 (B).

A coloração das colônias observadas neste trabalho assemelha-se às observadas por Mpeketula; Saka; Msuku (2003), Crous et al. (2006), Meisel et al. (2009) e Koshikumo (2011), embora as condições em que os fungos foram mantidos fossem diferentes.

Para alguns isolados de *C. zeina* e *C. zeae-maydis* foi verificada a formação de pigmento púrpura (Tabela 6). A presença do pigmento foi observada ao redor da colônia do fungo quando este foi cultivado em placa contendo meio BDA e V8 (Figura 10).

Um aspecto que deve ser melhor estudado é a diferenciação entre *C. zeina* e *C. zeaemaydis* com base na produção de pigmentação púrpura em meio de cultura, a qual presume-se tratar-se de cercosporina. Pois de acordo com Crous et al. (2006), *C. zeina* não produz tal pigmentação e essa é uma característica utilizada por aqueles autores para a diferenciação entre *C. zeina* e *C. zeaemaydis*. Este estudo verificou que ambas espécies podem apresentar isolados que produzem pigmentação púrpura em meio de cultura. Nesse sentido, Dunkle; Levy (2000) observaram que alguns isolados africanos de *C. zeaemaydis* Grupo II (atualmente de *C. zeina*) acumularam pigmento rosa claro, que não foi segregado para o meio e análise em espectro de absorção do pigmento, extraída com acetona ou KOH, não foram característicos da cercosporina. Assim, estudos mais detalhados devem ser feitos.

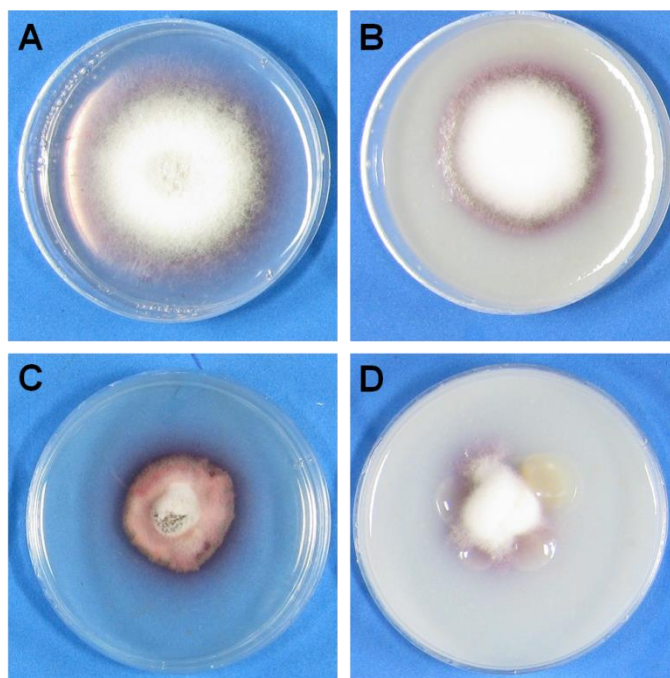


Figura 10. Culturas de *C. zeina* em meio BDA (A) e meio V8 (B) e *C. zeaemaydis* em meio BDA (C) e meio V8 (D), com destaque para a presença do pigmento púrpura ao redor das colônias. Isolado GOA30 (A), isolado FTA02 (B), isolado FOR01(C) e isolado SHG12 (D).

Tabela 6. Presença de pigmentação púrpura nas colônias de isolados de *C. zeina*, *C. zeae-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis* em meios de cultura BDA e V8 na temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Isolados	Espécie	Método de identificação ¹	Presença de pigmento em meio de cultura	
			BDA	V8
CTR03	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	SI ²
FOR07	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
FTA02	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	+
GOA30	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	+	-
GOA32	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
GOA65	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	+	-
GOB06	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
GOB20	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
MOT01	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	SI
ORZ03	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	+	+
PR035	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	+	SI
PR057	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	+	SI
PR096	<i>C. zeina</i>	PCR	-	SI
PR113	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
RVD06	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
RVD16	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
RVD36	<i>C. zeina</i>	PCR	-	SI
SER01	<i>C. zeina</i>	PCR/Seq	-	-
FOR01	<i>C. zeae-maydis</i>	PCR/Seq	+	+
FOR02	<i>C. zeae-maydis</i>	PCR/Seq	-	-
FOR04	<i>C. zeae-maydis</i>	PCR/Seq	-	-
FOR06	<i>C. zeae-maydis</i>	PCR/Seq	-	SI
FOR08	<i>C. zeae-maydis</i>	PCR/Seq	-	-
SHG12	<i>C. zeae-maydis</i>	PCR/Seq	+	SI
GOI12	<i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i>	Seq	-	-
GOI13	<i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i>	Seq	-	-

¹ Reação de cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos e/ou sequenciamento da região ITS-5.8S genes do rDNA

² Sem informação

Verificou-se que as três espécies de *Cercospora* no milho apresentaram diferenças significativas em relação à taxa de crescimento micelial sob luz branca e luz negra. *Cercospora sorghi* var. *maydis* apresenta um crescimento micelial mais rápido em relação às outras duas espécies. *Cercospora zeina* tem crescimento mais lento, sob os dois tipos de luz. Em geral, sob luz negra proporcionou maior crescimento micelial do que em luz branca (Tabela 7).

A diferença no crescimento micelial entre as espécies de *Cercospora*, também foi observado por Koshikumo (2011). Segundo o autor, o crescimento mais lento é observado para *C. zeina* e que *C. sorghi* var. *maydis* e *C. zea-maydis* cresce em média três e duas vezes mais que *C. zeina*, respectivamente, quando se transfere conídios ou quando se utiliza micélio. Kinyua et al. (2010), obtiveram o mesmo resultado, em que *C. zeina* cresce lentamente, chegando a até 2 cm de diâmetro, *C. zea-maydis* cresce cerca de 3,5 cm e *C. sorghi* var. *maydis* apresenta crescimento mais rápido, chegando de 5 a 6 cm, quando cultivados a 25 °C, em meio de cultura V8 durante três semanas.

O fato das espécies apresentarem maior crescimento sob luz negra ocorre porque a luz regula alguns aspectos da morfogênese dessas espécies, uma vez que luz constante inibe a germinação de esporo, crescimento do tubo germinativo e esporulação (Beckman; Payne, 1983). A luz constante estimula o desenvolvimento de conidióforos, porém inibe a formação de conídios (BLUHM et al., 2008).

Tabela 7. Taxa de crescimento micelial (mm dia⁻¹) de isolados de *C. zeina* (CZ), *C. zeae-maydis* (CZM) e *C. sorghi* var. *maydis* (CSM) sob luz branca e luz negra.

Isolados	Origem	Espécie	Tipo de Luz	
			Branca ¹	Negra
GOI13	Goioêre/PR	CSM	4.04 Ab	4.74 Aa
GOI12	Goioêre/PR	CSM	3.76 Ab	4.35 Ba
FOR06	Formosa/GO	CZM	2.65 Ba	2.52 Ca
FOR01	Formosa/GO	CZM	2.36 Ca	2.47 Ca
FOR08	Formosa/GO	CZM	2.17 Db	2.73 Ca
FOR02	Formosa/GO	CZM	2.11 Da	2.35 Ca
FOR04	Formosa/GO	CZM	2.07 Da	2.15 Ca
ORZ03	Ourizona/PR	CZ	1.87 Eb	2.17 Da
SER01	Sertaneja/PR	CZ	1.75 Eb	2.46 Ca
GOB20	Montividiu/GO	CZ	1.65 Eb	1.07 Ha
GOA30	Rio Verde/GO	CZ	1.58 Eb	2.38 Ca
RVD16	Rio Verde/GO	CZ	1.51 Fb	1.83 Ea
GOA32	Rio Verde/GO	CZ	1.49 Fb	0.91 Ha
SHG12	Santa Helena de Goiás/GO	CZM	1.30 Fb	2.12 Da
FTA02	Floresta/PR	CZ	1.22 Fb	1.51 Fa
PR035	Maringá/PR	CZ	1.12 Ga	1.28 Ga
FOR07	Formosa/GO	CZ	1.03 Ga	1.30 Ga
GOA65	Rio Verde/GO	CZ	0.96 Gb	1.66 Fa
PR057	Maringá/PR	CZ	0.86 Gb	1.35 Ga
GOB06	Montividiu/GO	CZ	0.84 Gb	1.65 Fa
MOT01	Montividiu/GO	CZ	0.76 Ha	0.83 Ha
RVD06	Rio Verde/GO	CZ	0.74 Hb	1.85 Ea
PR113	Maringá/PR	CZ	0.57 Hb	0.92 Ha
CTR03	Castro/PR	CZ	0.52 Ha	0.66 Ha
CV(%)			15,94	

¹ Mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não difere entre si pelo teste de agrupamento Scott-Knott a 5% de significância

4.4.2 Morfologia de conídios e conidióforos

As espécies *C. zeina* e *C. zea-maydis* apresentam morfologia de conídios e conidióforos muito semelhantes. *Cercospora zeina* apresenta conidióforos 51,6-173,0 (média 104,7 μm) x 3,3-8,0 μm (média 5,7 μm), subcilíndrico, coloração marrom e conídios de 33,5-113,4 (média 66,6 μm) x 4,2-10,3 μm (média 7,3 μm), fusiforme, hialinos, número de septos 3-12 (média 5,8) (Figura 11C e D, Tabela 8). Para *C. zea-maydis*, conidióforos variando de 51,7-176,3 (média 115,2 μm) x 3,4-7,7 μm (média 5,8 μm), subcilíndrico, coloração marrom branca e conídios variando de 33,5-108,2 (média 74,0 μm) x 4,2-11,1 μm (média 7,9 μm), obclavados-subcilíndrico, hialinos, número de septos 3-11 (média 6,6) (Figura 11A e B, Tabela 8). Essas características estão de acordo com as características descritas para essas duas espécies por Crous et al. (2006).

No entanto, *C. sorghi* var. *maydis* apresenta características morfológicas bem distinta das outras duas espécies. As dimensões de conidióforos são de 65,8-124,7 (média 98,0 μm) x 3,2-6,6 μm (média 4,7 μm), marrom escuro, cilíndrico e conídios 130,2-403,0 (média 281,9 μm) x 2,3-4,6 μm (média 3,3 μm), hialino, cilíndrico, base mais larga e estreita na ponta (Figura 11E e F, Tabela 9). Essas características estão de acordo com as características descritas para a espécie *C. sorghi* var. *maydis* (CHUPP, 1953).

Esses resultados também estão de acordo com os observados por Dunkle; Levy (2000). Já *Cercospora sorghi* var. *maydis* apresentou características conidiais bem distintas das outras duas espécies. Segundo Chupp (1953), as características dos conidióforos geralmente são menos confiáveis do que as características de conídios para a diferenciação das espécies de *Cercospora*, uma vez que o comprimento do conidióforo é influenciado pela temperatura e umidade. No entanto, as características de conídios, são em geral, mais confiáveis. *Cercospora zeina* e *C. zea-maydis* podem ser facilmente diferenciadas de *C. sorghi* var. *maydis* com base na morfologia e dimensões de conídios. Neste estudo constatou-se que a distinção entre *C. zeina* e *C. zea-maydis* é difícil de ser feita do ponto de vista prático.

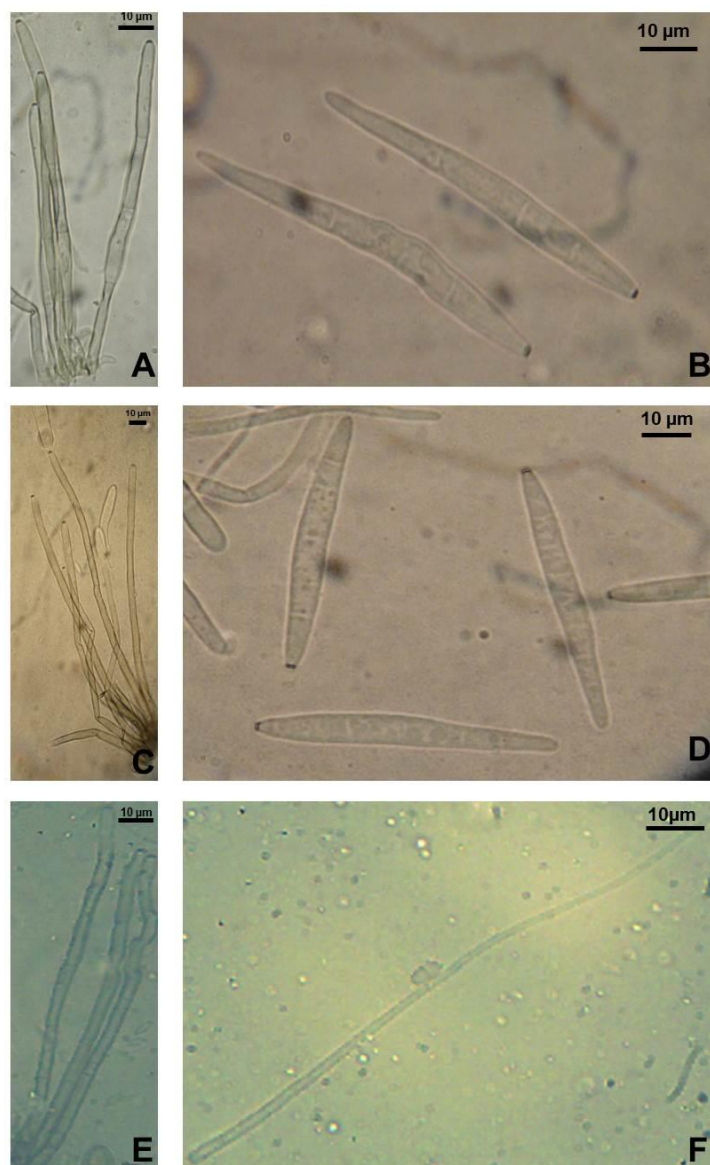


Figura 11. Estruturas de *Cercospora* spp. no milho. *C. zea-maydis*: conidióforos (A) e conídios (B), *C. zeina*: conidióforos (C) e conídios (D) e *C. sorghi* var. *maydis*: conidióforos (E) e conídios (F).

Tabela 8: Média de comprimento (μm), largura (μm) e número de septos de 50 conídios e conidióforos avaliados em 18 isolados de *C. zeina* e *C. zea-maydis* no milho.

Isolado	Espécie ¹	Conídio			Conidióforo	
		C ²	L	NS	C	L
FOR07	CZ	63,1 (46,4-82,4)	7,7 (5,8-9,2)	6,3 (4-9)	105,6 (75,4-134,9)	6,1 (4,4-7,6)
GOA30	CZ	69,1 (42,6-92,3)	7,5 (4,6-9,6)	5,1 (3-8)	107,2 (61,7-142)	5,8 (3,4-7,4)
GOA65	CZ	72,3 (48,4-97,9)	7,8 (6,2-9,7)	6,8 (4-12)	104,9 (63,9-156,4)	5,9 (4,4-7,5)
GOB20	CZ	58,9 (33,5-79,9)	7,4 (4,6-9,6)	6 (4-8)	103,1 (75,5-143,6)	5,8 (4,5-7,7)
MOT01	CZ	64,4 (39,3-95,9)	8,1 (5,9-10,3)	5,7 (4-9)	97,2 (51,6-160,8)	5,5 (4,1-7,1)
RVD06	CZ	55,7 (38,9-80,2)	5,4 (4,2-7,4)	5,2 (3-9)	98,7 (58,2-149,3)	5,4 (3,3-7,6)
RVD16	CZ	73,46 (49,9-98,5)	7,3 (5,2-9,4)	6,1 (5-8)	112,0 (66,7-150,5)	5,9 (4,3-7,7)
CTR03	CZ	70,0 (43,9-95,2)	7,6 (4,5-8,7)	5,7 (3-8)	114,1 (54,1-173)	5,8 (4,4-7,0)
FTA02	CZ	72,4 (46,0-108,9)	7,7 (5,3-9,9)	6,0 (4-9)	120,8 (82,4-166,4)	5,4 (3,7-6,5)
MGA00	CZ	72,8 (33,5-113,4)	7,0 (5,1-8,8)	6,3 (4-10)	104,8 (61,5-161,5)	5,6 (4,1-8,0)
PR035	CZ	65,9 (43,3-84,8)	7,0 (5,7-9,3)	6,0 (5-7)	99,47 (61,3-161,6)	5,8 (4,6-7,2)
PR096	CZ	58,5 (39,5-79)	6,8 (5,4-8,0)	5,0 (3-8)	85,92 (59,9-134,0)	5,6 (4,4-6,8)
PR113	CZ	69,1 (42,6-92,3)	7,5 (4,6-9,6)	5,7 (3-8)	107,2 (61,7-142,0)	5,8 (3,4-7,4)
Média		66,6	7,3	5,8	104,7	5,7
FOR01	CZM	63,2 (33,5-99,1)	7,0 (4,2-11,1)	6,3 (3-11)	103,7 (51,7-175,5)	5,6 (3,4-7,2)
FOR02	CZM	78,5 (48,6-104,1)	7,1 (4,7-10,5)	6,8 (5-10)	117,2 (104,6-146,7)	5,6 (4,3-7,5)
FOR04	CZM	74,6 (47,7-96,4)	7,7 (6,1-9,0)	6,4 (5-8)	118,1 (85,9-162,0)	5,9 (4,6-7,7)
FOR08	CZM	78,5 (47,6-105,9)	7,9 (5,3-10,9)	7 (5-10)	118,8 (64,8-175,7)	5,7 (4,0-7,0)
SHG12	CZM	75,0 (50,6-108,2)	9,7 (5,0-12,8)	6,5 (4-9)	118,3 (68,7-176,3)	6,0 (4,5-7,7)
Média		74,0	7,9	6,6	115,2	5,8

¹ CZ = *C. zeina* e CZM = *C. zea-maydis*

² C = comprimento, L = largura e NS = número de septos

Tabela 9. Média de comprimento (μm), largura (μm) de 50 conídios e conidióforos avaliados em 2 isolados de *C. sorghi* var. *maydis* no milho.

Isolado	Espécie ¹	Conídio		Conidióforo	
		C ²	L	C	L
GOI12	CSM	296,1	3,4	98,9	4,8
		(130,2-403,0)	(2,4-4,6)	(73,2-124,7)	(3,5-6,5)
GOI13	CSM	267,7	3,2	97,1	4,6
		(158,1-375,1)	(2,3-4,4)	(65,8-119,7)	(3,2-6,6)
Média		281,9	3,3	98,0	4,7

¹ CSM = *C. sorghi* var. *maydis*

² C = comprimento e L = largura

4.4.3 Análise da patogenicidade das espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis* e comparação da agressividade de isolados de *C. zeina* e *C. zea-maydis*

Todos os isolados de *C. zea-maydis* e *C. zeina* foram patogênicos ao milho, porém o isolado GOI12 da espécie *C. sorghi* var. *maydis* não foi patogênico. A análise de variância dos dados mostrou efeito significativo na agressividade do conjunto de isolados, entre as duas espécies e dentro de cada espécie (Tabela 10)

Tabela 10. Análise de variância da severidade média ocasionada pelos isolados de *Cercospora* spp. no híbrido Formula em casa de vegetação.

Fontes de variação	GL	QM
Isolados das duas espécies	12	10,70 ¹
Isolados de <i>C. zeina</i> vs isolados de <i>C. zea-maydis</i>	1	23,65 ¹
Isolados de <i>C. zeina</i>	7	11,35 ¹
Isolados de <i>C. zea-maydis</i>	4	6,33 ¹
Erro	104	0,66
Total	128	
Média		2,64
CV (%)		30,86

¹ Significativo pelo teste F a 5% de significância

A média de agressividade dos isolados de *C. zeaе-maydis* (11,48 %) foi significativamente maior do que a agressividade dos isolados de *C. zeina* (6,89 %) (Tabela 11). Com base na agressividade, os cinco isolados de *C. zeaе-maydis* foram agrupados em três grupos estatísticos. Enquanto que os 8 isolados de *C. zeina* formaram também três grupos estatísticos.

Tabela 11. Severidade de isolados de *C. zeina* e *C. zeaе-maydis* no híbrido Formula em casa de vegetação.

Isolado	Espécie	Severidade
PR133	<i>C. zeina</i>	17,61 a
GOB21	<i>C. zeina</i>	10,23 b
FTA02	<i>C. zeina</i>	9,38 b
PR035	<i>C. zeina</i>	8,67 b
GOA65	<i>C. zeina</i>	3,19 c
CTR03	<i>C. zeina</i>	2,56 c
FOR07	<i>C. zeina</i>	1,80 c
RVD16	<i>C. zeina</i>	1,67 c
FOR04	<i>C. zeaе-maydis</i>	16,80 a
FOR08	<i>C. zeaе-maydis</i>	16,54 a
FOR02	<i>C. zeaе-maydis</i>	11,77 b
FOR01	<i>C. zeaе-maydis</i>	6,15 c
SHG12	<i>C. zeaе-maydis</i>	6,14 c
Medida dos isolados de <i>C. zeina</i>		6,89 b
Media dos isolados de <i>C. zeaе-maydis</i>		11,48 a

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores. Bair, Ayers (1986) verificaram diferença significativa na severidade da doença e no comprimento das lesões entre quinze isolados de *C. zeaе-maydis*, quando inoculados em quatro híbridos diferentes, em casa de vegetação e em campo, apontando uma possível existência de agressividade entre isolados de *C. zeaе-maydis*. No entanto, Dunkle; Carson (1998) verificaram variação de agressividade dentro de cada grupo genético de *C. zeaе-maydis* ao analisarem sete isolados de *C. zeaе-maydis*, sendo quatro isolados pertencentes ao grupo genético I (atualmente *C. zeaе-*

maydis) e três isolados do grupo II (atualmente *C. zeina*) em quatro híbridos de milho na condição de campo. Resultado semelhante também foi observado por Carson; Goodman e Williamson (2002), ao analisarem agressividade em campo de seis isolados de *C. zeaemaydis*, sendo apenas um isolado de *C. zeaemaydis* grupo II, em dez híbridos de milho. Okori et al. (2004) relataram a presença de diferença significativa em agressividade entre vinte e sete isolados de *C. zeaemaydis* grupo II. Mathioni et al. (2006) analisaram nove isolados de *C. zeaemaydis* grupo I e onze isolados de *C. zeaemaydis* grupo II em casa de vegetação e observaram variação na agressividade dentro de cada grupo. Carson; Goodman (2006), também verificaram considerável variação na agressividade em dois anos consecutivos entre isolados de cada grupo genético de *C. zeaemaydis* em campo. Okori et al. (2004) sugerem que essa variabilidade em agressividade seja um dos fatores que influenciam na alta severidade das epidemias.

Em relação à agressividade entre as duas espécies, foi verificado que *C. zeaemaydis* apresentou maior média de severidade da doença quando comparada a *C. zeina*. Esse resultado contradiz um estudo anterior realizado por Mathioni et al. (2006), onde foi observado que a espécie *C. zeaemaydis* grupo II (atualmente *C. zeina*) foi mais agressiva em relação a *C. zeaemaydis* grupo I (atualmente *C. zeaemaydis*). Outros trabalhos não detectaram diferenças em agressividade entre os dois grupos genéticos de *C. zeaemaydis* (DUNKLE; CARSON, 1998; CARSON; GOODMAN; WILLIAMSON, 2002; CARSON; GOODMAN, 2006). Assim, isso merece mais investigação, com a inclusão de um número maior de isolados e também de diferentes genótipos de milho.

Diferença significativa em agressividade foi observada entre isolados de uma mesma população de *C. zeina*, onde o isolado PR113 foi mais agressivo do que PR035, sendo que ambos também foram coletados na mesma área. O mesmo foi observado para *C. zeaemaydis*, em que, os isolados FOR04 e FOR08 também apresentaram maior severidade em relação a FOR02 e FOR01, tendo sido estes isolados coletados na mesma área. Resultado semelhante foi observado por Mathioni (2006), que sugere que a agressividade seja uma característica intrínseca do indivíduo.

Segundo Carson; Goodman; Williamson, (2002) os isolados menos agressivos foram menos eficientes em distinguir níveis de resistência de híbridos de milho, indicando a importância de se conhecer o seu nível de agressividade, a fim de maximizar o ganho de seleção quando depender de inoculação artificial para avaliar a resistência de plantas de milho à cercosporiose.

Os sintomas iniciais da doença foram observados aos dez dias após a inoculação do patógeno. Verificaram-se diferenças entre os sintomas provocados por *C. zeina* e *C. zeaemaydis*. As lesões ocasionadas por *C. zeina* são confinadas entre as nervuras, apresentando 2-3 mm de largura e 5-40 mm de comprimento, coloração cinza claro a marrom palha, com bordas indistintas e cloróticas nas lesões jovens (Figura 12). Já as lesões causadas por *C. zeaemaydis* são oblongas, formando faixas ou manchas irregulares, de coloração cinza a marrom, com forma e tamanho variável e com bordas estreitas marrons (Figura 12).

Os sintomas da doença observados no estudo foram concordantes com os sintomas observados por Crous et al. (2006), quando os isolados de *C. zeaemaydis* e *C. zeina* são inoculados no milho em casa de vegetação. No entanto, quando a inoculação é feita em nível de campo, os sintomas das duas espécies não são distinguíveis (CARSON; GOODMAN, 2006).

Carson; Goodman (2006) analisaram a patogenicidade de três espécies de *Cercospora* associadas à cercosporiose no milho e observaram que isolados de *C. zeaemaydis* grupo I (atualmente *C. zeaemaydis*) e grupo II (atualmente *C. zeina*) foram patogênicos no milho, entretanto, dois isolados *C. sorghi* var. *maydis* não foram patogênicos. No presente estudo, tal fato também foi verificado. Os autores sugerem que *C. sorghi* var. *maydis* é um saprófita eficiente no tecido foliar de milho e que pode estar associado às lesões de cercosporiose provocadas por *C. zeina* e *C. zeaemaydis*, lesões de ferrugens, ou áreas de tecido necrótico resultante de lesões físicas da folha. *Cercospora sorghi* var. *maydis* pode ser facilmente isolado dessas lesões, uma vez que o fungo cresce rapidamente e por vezes é a primeira espécie a esporular.

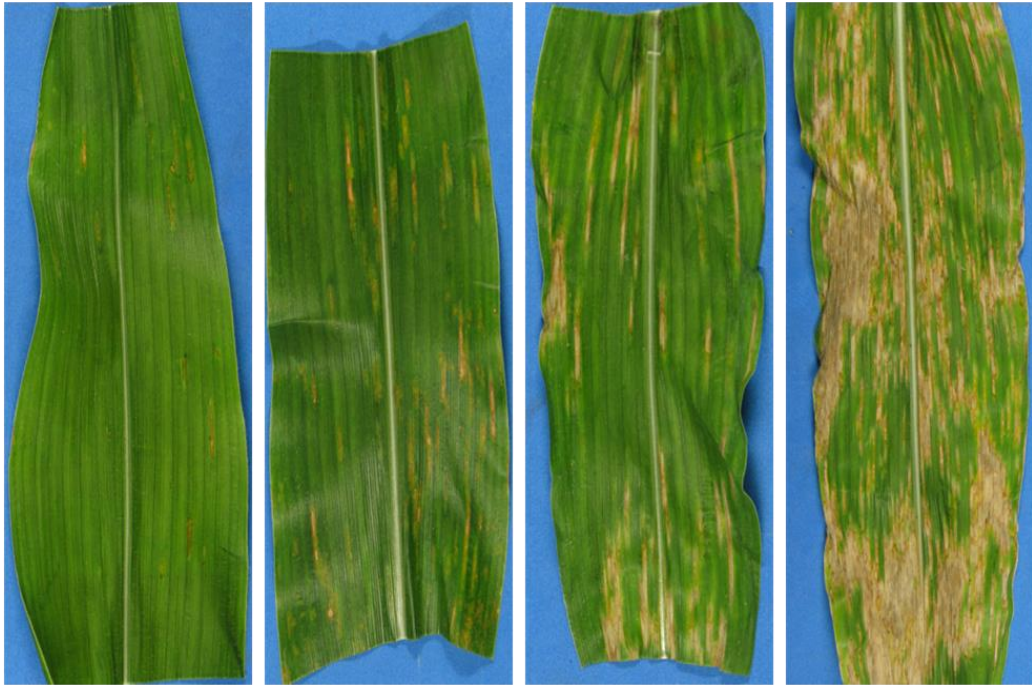


Figura 13. Evolução dos sintomas de cercosporiose provocada por *C. zeina*.

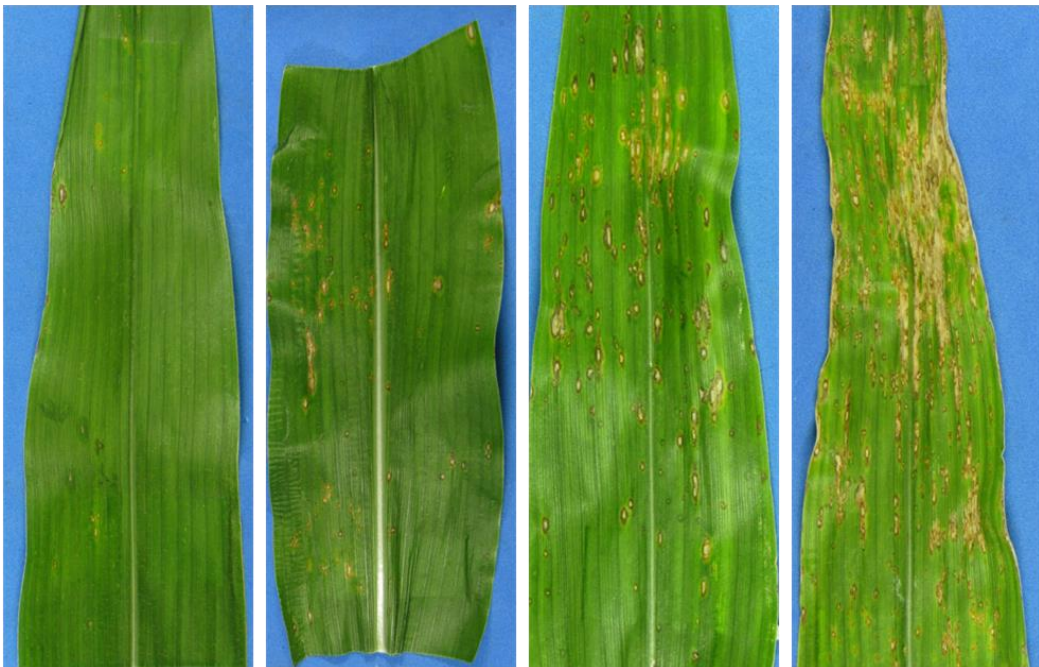


Figura 12. Evolução dos sintomas de cercosporiose provocada por *C. zea-maydis*.

5. CONCLUSÕES

- a) A espécie de *C. zeina* foi predominante tanto em Goiás como no Paraná. Em Goiás também foi identificada a espécie *C. zea-maydis* e no Paraná foi identificada a espécie *C. sorghi* var. *maydis*.
- b) Apenas a espécie *C. zeina* foi encontrada no estudo de distribuição espacial em lavouras de milho de Montividiu e Rio Verde, em Goiás, e de Maringá, no Paraná.
- c) Isolados representativos das espécies *C. zeina*, *C. zea-maydis* e *C. sorghi* var. *maydis* do Brasil, os quais foram caracterizados filogeneticamente com base na análise de sequências de DNA das regiões ITS1 e ITS2 e do gene 5.8S do rDNA, se agruparam com isolados de referência dessas espécies do *GenBank*.
- d) Foi possível diferenciar os isolados de *C. sorghi* var. *maydis* em relação às espécies *C. zeina* e *C. zea-maydis* com base na morfologia de conídios, porém não foi possível diferenciar conclusivamente a espécie *C. zeina* de *C. zea-maydis*.
- e) Os isolados de *C. zea-maydis* analisados apresentaram agressividade superior aos isolados de *C. zeina*, e *C. sorghi* var. *maydis* não foi patogênica no milho.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. G., SMITH, J. E. The production of conidiophores and conidia by newly germinated conidia of *Aspergillus niger* (microcycle conidiation). **Journal of general microbiology**, v. 69, p. 185-197, 1971.
- ANDRADE, F. H. **Radiación y temperatura determinan los rendimientos máximos de maíz**. (Boletín Técnico, 106). Instituto Nacional de tecnología agropecuária. Balcarce, Argentina, 1992. 34p.
- ASEA, G., LIPP, P. E., PRATT, R. C., GORDON, S. G., ADIPALA, E. Development of greenhouse inoculation procedures for evaluation of partial resistance to *Cercospora zeaemaydis* in maize inbred. **Journal of Phytopathology**, v. 153, p. 647–653, 2005.
- ASSANTE, G., LOCCI, R., CAMARDA, L., MERLINI, L., NASINI, G. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 16, p. 243-247, 1977.
- AYERS, J. E., JOHNSON, M. W., HILL, R. R. Identifying resistance to gray leaf spot. In: MAIZE SORGHUM RESISTANCE CONFERENCE, 39, Washington, D. C, **Proceedings...** p. 157-175, 1984.
- AYLOR, D. E. The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 73-92, 1990.
- BAIR, W., AYERS, J. E. Variability in isolates of *Cercospora zeaemaydis*. **Phytopathology**, v. 76, p. 129–132, 1986.
- BALIS, C., PAYNE, M. G. Triglycerides and cercosporin from *Cercospora beticola*: Fungal growth and cercosporin production. **Phytopathology**, v. 61, p. 1477-1484, 1971.
- BANDYOPADHYAY, R., MUGHOGHO, L. K., MANOHAR, S. K., SATYANARAYANA, M. V. Stroma development, honeydew formation, and conidial production in *Claviceps sorghi*. **Phytopathology**, v. 80, p. 812- 818, 1990.
- BATCHVAROVA, R. B., REDDY, V. S., BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. **Phytopathology**, v. 82, p. 642–646, 1992.
- BECKMAN, P. M., PAYNE, G. A. External growth, penetration, and development of *Cercospora zeaemaydis* in corn leaves. **Phytopathology**, v. 72, p. 810–815, 1982.
- BECKMAN, P. M., PAYNE, G. A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeaemaydis* and lesion development in corn. **Phytopathology**, v. 73, p. 286–289, 1983.
- BLUHM, B. H., DHILLON, B., LINDQUIST, E. A., KEMA, G. H. J., GOODWIN, S. B., DUNKLE, L. D. Expressed sequence tags derived from the maize foliar pathogen *Cercospora zeaemaydis* identify novel genes differentially expressed during vegetative, infectious, and reproductive growth. **BMC Genomics**, v. 9, p. 523, 2008.

- BRADLEY, C. A., PEDERSEN, D. K. Baseline sensitivity of *Cercospora zeaе-maydis* to quinone outside inhibitor fungicides. **Plant Disease**, v. 95, p. 189-194, 2011.
- BRITO, A. H., VON PINHO, R. G., POZZA, E. A., PEREIRA, J. L. A. R., FARIA FILHO, E. M. Efeito da cercosporiose no rendimento de híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 472-479, 2007.
- BRUNELLI, K. R. *Cercospora zeaе-maydis*: esporulação, diversidade morfo-genética e reação de linhagens de milho. 2004. 105 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BRUNELLI, K. R., DUNKLE, L. D., SOBRINHO, C. A., FAZZA, A. C., CAMARGO, L. E. A. Molecular variability in the maize grey leaf spot pathogens in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 938–942, 2008.
- CARSON, M. L. Gray leaf spot. In: WHITE, D. G. (ed.) **Compendium of Corn Diseases**. 3^a ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, p. 22-23. 1999.
- CARSON, M. L., GOODMAN, M. M. Pathogenicity, aggressiveness, and virulence of three species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. **Maydica**, v. 51, p. 89-92, 2006.
- CARSON, M. L., GOODMAN, M. M., WILLIAMSON, S. M. Variation in aggressiveness among isolates of *Cercospora* from maize as a potential cause of genotype–environment interaction in gray leaf spot trials. **Plant Disease**, v. 86, p. 1089-1093, 2002.
- CASELA, C. R., FERREIRA A. S. A. **A Cercosporiose na Cultura do Milho**. (Circular Técnica, 24). Embrapa, Brasília. 2003. 5 p.
- CASELA, C. R., FERREIRA A. S. A., PINTO, N. F. J. **Doenças da Cultura do Milho**. (Circular Técnica, 83). Embrapa, Brasília. 2006. 5 p.
- CHOQUER, M., DEKKERS, K. L., CHEN, H. Q., CAO, L., UENG, P., DAUB, M. E., CHUNG, K-R. The *CTBI* gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporina biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Microbe Interact**. Saint Paul, v. 8, n. 5, p. 468-476, 2005.
- CHUPP, C. **A monograph of the Fungus Genus *Cercospora***. New York: The Ronald. 1953. 667p.
- CHUPP, C., SHEREF, A.F. **Vegetable Disease and Their Control**. New York: The Ronald, Press. 1960. 232p.
- COATES, S. T., WHITE, D. G. Inheritance of gray leaf spot resistance in selected inbreds. In: **Proc. Illinois Maize Breeders School**, 31st. University of Illinois, Urbana, p. 195-202, 1995.
- CONAB. Companhia Nacional do Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Grãos. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 18 de jun. 2012.

CROUS, P. W., GROENEWALD J. Z. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, p. 463–470, 2005.

CROUS, P. W., GROENEWALD, J. Z., GROENEWALD, M., CALDWELL, P., BRAUN, U., HARRINGTON, T. C. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 189–197, 2006.

CRUZ, J. C., KARAM, D., MONTEIRO, M. A. R., MAGALHÃES, P. C. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa milho e sorgo, 2008. 517p.

DAUB, M. E. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, v. 72, p. 370-374, 1982.

DAUB, M. E., BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by the fungal toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, v. 71, p. 763–766, 1983.

DAUB, M. E., CHUNG, K-R. Cercosporin: A Phytoactivated Toxin in Plant Disease. Online. **APSnet Features**. doi: 10.1094, 2007.

DAUB, M.E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Plant Pathology**, v. 38, p. 461-490, 2000.

DAUB, M. E., HERRERO, S., CHUNG, K. -R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiol Letters**, v. 252, p. 197–206, 2005.

DOEBLEY, J. Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. **BioScience**, v. 40, n. 6, p. 443-448, 1990.

DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

DUNKLE, L., CARSON, M. L. Genetic variation in *Cercospora* and the potential impact on selecting for resistance to gray leaf spot of corn. In: ANNUAL CORN & SORGHUM RESEARCH CONFERENCE, 53., 1998, Chicago. **Proceedings...** Chicago: American Seed Trade Association, p. 334-347, 1998.

DUNKLE, L. D., LEVY, M. Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**, v. 90, p. 486–490, 2000.

FAJOLA, A. O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**, v. 13, p. 157-164, 1978.

FANCELLI, A. L., DOURADO-NETO, D. **Produção de Milho**. Ed. Agropecuária, Guaíba. 2000. 360p.

FANTINI, G. M., BRUNELLI, K. R., RESENDE, I. C., DUARTE, A. **A Cercosporiose do Milho**. (Boletim técnico IAC, 192). Campinas: IAC. 2001. 20p.

FANTIN, G. M., DUARTE, A. P., DUDIENAS, C., GALLO, P. B., RAMOS JÚNIOR, E. U., CRUZ, F. A., RAMOS, V. J., FREITAS, R. S., DENUCCI, S., TICELLI, M. Efeito da cercosporiose na produtividade do milho safrinha no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 7, p. 231-250, 2008.

FANTIN, G. M. Milho: tratar ou não das doenças? **Revista Cultivar Grandes Culturas**, ano 8, n. 88, p. 28-31, ago. 2006.

FAO. **Food and Agriculture organization of the United States**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em 10 de julho de 2012.

FERNANDEZ, F. A., GLAWE, D. A., SINCLAIR, J. B. Microcycle conidiation and nuclear behavior during conidiogenesis in *Cercospora kikuchii*. **Mycologia**, v. 83, p. 752-757, 1991.

FERREIRA, D.F. **Sistema de Análises de Variância para Dados Balanceados**. Lavras: UFLA, 2000.

GEVERS, H. O., LAKE, J. K., HOHLS, T. Diallel cross analysis of resistance to gray leaf spot in maize. **Plant Disease**, v. 78, p. 379-383, 1994.

GOODWIN, S. B., DUNKLE, L. D., ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, v. 91, p. 648-658, 2001.

GROENEWALD, J. Z., NAKASHIMA, C., NISHIKAWA, J., SHIN, H.-D., PARK, J.-H., JAMA, A. N., GROENEWALD, M., BRAUN, U., CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 115-170, 2012.

HANLIN, R. T. Microcycle conidiation: a review. **Mycoscience**, v. 35, p. 113-123, 1994.

HUFF, C. A., AYERS, J. E., HILL, R. R. Inheritance of resistance in corn (*Zea mays*) to gray leaf spot. **Phytopathology**, v. 78, p. 790-794, 1988.

JARDINE, D. F., LACA-BUENÍA, J. P. Eficiência de fungicidas no controle de doenças foliares na cultura do milho. **FAZU em Revista**, n. 6, p. 11-52, 2009.

JENNS, A. E., DAUB, M. E., UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, v. 79, p. 213-219, 1989.

JULIATTI, F. C., PEDROSA, M. G., SILVA, H. D., CORRÊA DA SILVA, J. V. Genetic mapping for resistance to gray leaf spot in maize. **Euphytica**, v. 169, p. 227-238, 2009.

KINYUA, Z. M., SMITH, J. J., KIBATA, G. N., SIMONS, S. A., LANGAT, B. C. Status of grey leaf spot disease in Kenyan maize production ecosystems. **African Crop Science Journal**, v. 18, p. 183 - 194, 2010.

KIRK, P., CANNON, P. F., MINTER, D. W., STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**. 10th edn. CAB International, Wallingford, UK. 2008.

KOSHIKUMO, E. S. M. **Identificação molecular e morfológica, métodos de esporulação, indução e detecção de cercosporina nas espécies de *Cercospora* do milho.** 2011. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

LAPAIRE, C. L., DUNKLE, L. D. Microcycle conidiation in *Cercospora zae-maydis*. **Phytopathology**, v. 93, p. 193–199, 2003.

LATTERELL, F. M., ROSSI, A. E. Gray leaf spot of corn: a disease on the move. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 8, p. 842–847, 1983.

LEANDRO, L. F. S., GLEASON, M. L., NUTTER JR., F. W., WEGULO, S. N., DIXON, P. M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, v. 91, p. 659-664, 2001.

LIPPS, P. E. Gray leaf spot epiphytotic in Ohio corn. **Plant Disease**, v. 71, p. 281, 1987.

LIPPS, P. E., THOMISON, P. R., PRATT, R. C. Reactions of corn hybrids to gray leaf spot. *In: ANNUAL CORN & SORGHUM RESEARCH CONFERENCE*, 51., 1996, Chicago. **Proceedings...** Chicago: American Seed Trade Association, p. 163-180, 1996.

LIPPS, P. E., WHITE, D. G., AYERS, J. E., DUNKLE, L. D. Gray leaf spot of corn: update. *In: A report from NCR-25 Technical Committee on Corn and Sorghum Diseases*. St. Paul, 1998.

LYNCH, F. J., GEOGHEGAN, M. J.. Regulation of growth and cercosporin photoinduction in *Cercospora beticola*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 73, p. 311-327, 1979.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, v. 2, p. 176-177, 1962.

MATHIONI, S. M. **Agressividade de isolados de *Cercospora zae-maydis* em genótipos de milho.** 2006. 56f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MATHIONI, S. M., CARVALHO, R. V., BRUNELLI, K. R., BELÓ, A., CAMARGO, L. E. A. Aggressiveness between genetic groups I and II of isolates of *Cercospora zae-maydis*. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 547-551, 2006.

MEISEL, B., KORSMAN, J., KLOPPERS, F. J., BERGER, D. K. *Cercospora zeina* is the causal agent of grey leaf spot disease of maize in Southern Africa. **European Journal of Plant Pathology**, v. 124, p. 577–583, 2009.

MELOUK, H. A., SCHUH, W. Cercosporin production and pathogenicity of *Cercospora arachidicola* isolates. (abstr.) **Phytopathology**, v. 77, p. 642, 1987.

MEREDITH, D. S. Significance of spore release and dispersal mechanisms in plant disease epidemiology. **Annual Review Phytopathology**, v. 11, p. 313- 343, 1973.

MPEKETULA, P. M. G., SAKA, V. W., MSUKU, W. A. B. An investigation on the biological variability of *Cercospora zeaе maydis*, the incitant of gray leaf spot in maize in Malawi. **African Crop science Conference Proceedings**, v. 6, p. 286-289, 2003.

MUNKVOLD, G. P., MARTINSON, S. A., SHRIVER, J. M., DIXON, P. M. Probabilities for profitable fungicide use against gray leaf spot in hybrid maize. **Phytopathology**, v. 91, p. 477-484, 2001.

NAZARENO, N. R. X., LIPPS, P. E., MADDEN, L. V. Survival of *Cercospora zeaе maydis* in corn residue in Ohio. **Plant Disease**, v. 76, p. 560-563, 1992.

NAZARENO, N. R. X., LIPPS, P. E., MADDEN, L. V. Effect of levels of corn residue on the epidemiology of gray leaf spot of corn in Ohio. **Plant Disease**, v. 77, p. 67-70, 1993.

NUTTER JR, F. W., JENCO, J. H. Development of critical-point yield loss models to estimate yield losses in corn caused by *Cercospora zeaе-maydis*. **Phytopathology**, v. 82, p. 994, 1992.

OKORI, P., RUBAIHAYO, P. R., ADIPALA, E., DIXELIUS, C. Interactive effects of host, pathogen and mineral nutrition on gray leaf spot epidemics in Uganda. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 119-128, 2004.

OKORI, P., FAHLESON, J., RUBAIHAYO, P. R., ADIPALA, E., DIXELIUS, C. Assessment of genetic variation among East African *Cercospora zeaе-maydis*. **African Crop Science Journal**, v. 11, p. 75-85, 2003.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tratamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**.1991. 111f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras. Lavras.

PEREIRA, O. A. P., CARVALHO, R. V., CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho (*Zea Mays*). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L. E. A. (Ed) **Manual de fitopatologia – Doenças das Plantas Cultivadas**. Piracicaba: Ceres, cap. 55, v. 2, p. 477-488, 2005.

PINTO, N. F. J. A., ANGELIS, B., HABE, M. H. Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da cercosporiose (*Cercospora zeaе-maydis*) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 1, p. 139-145, 2004.

PINTO, N. F. J. A., SANTOS, M. A., WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário: Cultivo do milho no sistema de plantio direto**, Belo Horizonte, v. 27, n. 233, p. 7-12, 2006.

POLLACK, F. G. An annotated compilation of *Cercospora* names. **Mycological Memoir**, v. 12, p. 1-212, 1987.

PONS, A., BRESOLIN, M. **A Cultura do Milho. Trigo e Soja**. Porto Alegre, n. 57, p. 6-31, 1981.

- POZAR, G., BUTRUILLE, D. V., SILVA, H. D., MCCUDDIN, Z. P., PENNA, J. C. V. Mapping and validation of quantitative trait loci for resistance to *Cercospora zea maydis* infection on tropical maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, p. 553-564, 2009.
- RATHAIAH, Y. Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugarbeet. **Phytopathology**, v. 67, p. 358-362, 1977.
- REIS, E. M., CASA, T. T., BRESOLIN, A. R. **Manual de Diagnose e Controle de Doenças do Milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte. 2004. 144p.
- RITCHIE, S. W., HANWAY, J. J., BENSON, G. O. **How a corn plant develops**. (Special Report, 48). Iowa: Iowa State University of Science and Technology. 1993. 20p.
- ROBESON, D. J., JALAL, M. A. F. A *Cercospora* isolate from soybean roots produces cebetin B and cercosporin. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1546-1548, 1993.
- ROSSIER, C., TON-THAT, T. C., TURIAN, G. Microcyclic microconidiation in *Neurospora crassa*. **Experimental Mycology**, v. 1, p. 52-62, 1977.
- RUPE, J. C., SIEGEL, M. R., HARTMAN, J. R. Influence of environment and plant maturity on gray leaf spot of corn caused by *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**, v. 72, p. 1587-1591, 1982.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT procedure guide for personal computers**. 5.ed. Cary: SAS Institute. 1991. 1104p.
- SHIM, W. B., DUNKLE, D. L. Malazy, a degenerate, species-specific transposable element in *Cercospora zea-maydis*. **Mycologia**, v. 97, p. 349-355, 2005.
- SHURTLEFF, M. C. **Compendium of Corn Disease**. 2.ed. Urbana: American Phytopathological Society. 1980. 105p.
- STEINKAMP, M. P., MARTIN, S. S., HOEFERT, L. L., RUPPEL, E. G. Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by cercosporin, a toxin from *Cercospora beticola*. **Phytopathology**, v. 71, p. 1272-1281, 1981.
- STROMBERG, E.L. **Gray Leaf Spot Disease**. Virginia Co-op, Extends Service. (Publication 450-072). Virginia Polytechnic and State University, Blacksburg. 1986. 3p.
- TEHON, L. R., DANIELS, E. Notes on parasitic fungi of Illinois. **Mycologia**, v. 17, p. 240-249, 1925.
- TESSMANN, D. J., CHARUDATTAN, R., KISTLER, H. C., ROSSKOPF, E. N. A molecular characterization of *Cercospora* species pathogenic to water hyacinth and emendation of *C. piaropi*. **Mycologia**, v. 93, p. 322-333, 2001.
- ULLOA, M., HANLIN, R. T. **Illustrated Dictionary of Mycology**. St Paul, Minnesota: APS Press. 2000. 448 p.

UPCHURCH, R. G., WALKER, D. C., ROLLINS, J. A., EHRENSHAFT, M., DAUB, M. E. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2940-2945, 1991.

VIÉGAS A.P. **Alguns Fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Agronomia. 1945. 160p.

VIEIRA, R. A., SCAPIM, C. A., MOTERLE, L. M., TESSMANN, D. J., AMARAL JUNIOR, A. T., GONÇALVES, L. S. A. The breeding possibilities and genetic parameters of maize resistance to foliar diseases. **Euphytica**, v. 185, p. 325-336, 2011.

WANG, J., LEVY, M., DUNKLE, L. D. Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. **Phytopathology**, v. 88, p. 1269–1275, 1998.

WARD, J. M. J. **Epidemiology and management of gray leaf spot: A new disease of maize in South Africa**. Ph.D. thesis. University of Natal, Pietermaritzburg 3200, South Africa, 1996.

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**, v. 83, p. 884-895, 1999.

WARD, J. M. J., NOWELL, D. C. Integrated management practices for the control of maize grey leaf spot. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 3, p. 177–188, 1998.

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. 3rd Edition Saint Paul: The American Phytopathological Society. 1999. 78p.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **In: PCR Protocols: a guide to methods and applications**. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, San Diego, California, p. 315–322, 1990.

YODER, O. C. Toxins in pathogenesis. **Annual Review Phytopathology**, v. 18, p. 103-129, 1980.

ZHU, X., REID, L. M., WOLDEMARIAM, T., TENUTA, A., SCHAAFSMA, A. W. First report of gray leaf spot caused by *Cercospora zea-maydis* on corn in Ontario, Canada. **Plant Disease**, v. 86, p. 327-327, 2002.