



ÉRIKA SAYURI MANETI KOSHIKUMO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E
MORFOLÓGICA, MÉTODOS DE
ESPORULAÇÃO, INDUÇÃO E DETECÇÃO DE
CERCOSPORINA DAS ESPÉCIES DE
CERCOSPORA DO MILHO**

LAVRAS – MG

2011

ÉRIKA SAYURI MANETI KOSHIKUMO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA, MÉTODOS DE
ESPORULAÇÃO, INDUÇÃO E DETECÇÃO DE CERCOSPORINA DAS
ESPÉCIES DE CERCOSPORA DO MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Koshikumo, Érika Sayuri Maneti.

Identificação molecular e morfológica, métodos de esporulação, indução e detecção de cercosporina das espécies de cercospora do milho / Érika Sayuri Maneti Koshikumo. – Lavras: UFLA, 2011.
109 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Cercosporiose. 2. *Cercospora zeina*. 3. *Cercospora zeaemaydis*. 4. *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*. 5. Microscopia eletrônica de varredura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

ÉRIKA SAYURI MANETI KOSHIKUMO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E MORFOLÓGICA, MÉTODOS DE
ESPORULAÇÃO, INDUÇÃO E DETECÇÃO DE CERCOSPORINA DAS
ESPÉCIES DE CERCOSPORA DO MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 05 de agosto de 2011.

Dr. Antonio Chalfun Junior	UFLA
Dr. Hilário Antônio de Castro	UFLA
Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA
Dr. Rodrigo Vêras da Costa	EMBRAPA-CNPMS

Dr. Eduardo Alves
Orientador

**LAVRAS – MG
2011**

DEDICO

*Ao meu amado pai, Paulo, e ao meu avô
Yokishi Koshikumo (in memoriam) por
todo amor e carinho.*

OFEREÇO

*Aos meus pais, Regina M. Maneti Koshikumo e Paulo Satoshi Koshikumo, pela
força, desprendimento e o amor que me serve de alicerce para a vida.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes), pela concessão da bolsa de estudo e a FAPEMIG (Projetos CAG-APQ 01719-08 e APQ 02715-09) pelo financiamento do projeto e apoio ao LME/UFLA..

Aos professores Eduardo Alves e Hilário de Castro pelo apoio e orientação.

Ao professor Renzo Garcia Von Pinho pelas sugestões para a execução deste trabalho.

Ao professor Larry D. Dunkle e a Dra Corie Shaner por me acolher em seu laboratório, para realizar trabalho e pelo incentivo, confiança, paciência e valiosas sugestões na execução deste trabalho.

Aos amigos e funcionários da Universidade de Purdue.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica pelo companheirismo e boa convivência.

MUITO OBRIGADA!

“Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias a baixam para a terra, sua mãe”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

Em Minas Gerais são encontradas as três espécies de *Cercospora* do milho: *Cercospora zeina*, *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis*, e esta última é de fácil separação das demais, por apresentar um índice de velocidade de crescimento micelial maior e pode produzir toxina em meio Suco de Tomate Temperado (STT). As outras duas espécies são patogênicas, morfológicamente semelhantes, diferindo-se, principalmente, pelo tamanho do conidióforo, formato do conídio, crescimento micelial e produção de toxina. A dificuldade de diferenciá-las morfológicamente conduz a uma análise molecular, a qual é mais confiável. Desta forma, foi possível identificar as espécies patogênicas de *Cercospora* do milho utilizando-se de *primers* específicos. Para obtenção de esporos deste gênero de fungos é necessário usar métodos que induzem algum tipo de estresse, como o de secagem de massa micelial ou de transferência de conídios. Ambos foram eficientes, principalmente, em meio STT ou V8. Com os conídios produzidos por estes métodos foi possível observar em microscópio eletrônico de varredura a colonização das sementes de sorgo com diferentes culturas fúngicas, as quais servem de veículo para inocular plantas de milho. As sementes de sorgo inoculadas apenas com esporos, seja por suspensão ou por meio de cultura, apresentaram maior número de conídios/sementes do que aquelas inoculadas com conídios e micélio. Por espectrofotometria foi detectada a Cercosporina em *C. sorghi* f.sp. *maydis* em todos os meios de cultura estudados, exceto em M1D, em condições de luz contínua a 27 °C, enquanto a indução da toxina em *C. zeina* não foi possível, o que reforça a hipótese de que esta espécie apenas produz a toxina em planta. Geralmente, *C. zea-maydis* é caracterizada pela produção de toxina, no entanto, para os isolados utilizados nas condições estudadas, não foi possível observar tal fato, provavelmente, em razão de algum fator que alterou e/ou bloqueou os produtos dos genes envolvidos no processo da biossíntese da mesma. O meio com água de coco e extrato de leveduras foi o melhor para induzir a toxina em *C. sorghi* f.sp. *maydis*. Diante dos resultados, é possível afirmar que há as 3 espécies de *Cercospora* do milho em Minas Gerais, os isolados podem ter alta produção de esporos *in vitro* pela transferência de conídios, possibilitando desenvolvimentos de outros trabalhos científicos. Além disso, há maior probabilidade de sucesso na inoculação quando se utilizam conídios. Contudo, há necessidade de mais estudos, principalmente com a *C. zeina*, a qual é mais agressiva e mais difícil de manter em condições laboratoriais.

Palavras-chave: Cercosporiose do milho. Cercosporina. *Cercospora zeina*. *Cercospora zea-maydis*. *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis*. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

In the Minas Gerais State, Brazil, there are three species of *Cercospora* from maize: *Cercospora zeina*, *Cercospora zea-maydis* and *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis*. This last one has morphologic characteristics totally different from the others: the Mycelial Index Growth Speed (MIGS) is higher, and it produces toxin in tomato juice medium (TJM). On the other hand, the pathogenic species are morphologically similar, but they differ mainly by size and shape of conidia, mycelia growth and production of toxin. The difficulty of distinguishing them morphologically leads us to develop a molecular analysis that is more reliable and easier. Specific primers were developed from ITS regions and regions of ribosomal DNA that identified the pathogenic species of *Cercospora* from maize. To obtain spores from *Cercospora* genus, it is necessary to use methods to induce stress, such as drying mycelium or by the transfer of spores, used in this study. Both methods were efficient, mainly in TJM or V8 (V8). The conidia were observed in scanning electron microscope, and it was possible to observe the colonization on sorghum seeds with different *Cercospora* fungal cultures that were used like transporters for these fungi for inoculating maize plants. The sorghum seeds inoculated with only spores had a higher number of conidia/seeds than those inoculated with conidia and mycelium. Besides, there is more probability to have success in the inoculation when using conidia to inoculate the corn plants. By Spectrometry, it was possible to detect the cercosporin in *C. sorghi* f.sp. *maydis* in every culture media studied, except in MID medium, under light condition, at 27 °C. The induction of toxin in *C. zeina* was not possible, which reinforces the hypothesis that this species just produces toxin in plants. Generally, the *C. zea-maydis* produce toxin, however, under the condition mentioned, it was not possible to observe the toxin production. Most likely, there is a factor that blocked the genes products involved in the biosynthesis process. With the results, it is possible to affirm that the three species of *Cercospora* from maize in Minas Gerais state, Brazil that can have high production of spores *in vitro* by using the Patted system, which enables the development of new scientific studies. The coconut water medium with yeast induced the most toxin production in *C. sorghi* f.sp. *maydis*. However, more studies are required, especially with *C. zeina*, which is more aggressive and more difficult to grow in laboratorial condition.

Keywords: Gray Leaf Spot. Cercosporin. *Cercospora zeina*. *Cercospora zea-maydis*. *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis*. Scanning electron microscopy.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Agente etiológico, sintomatologia e controle da cercosporiose	13
2.2	Esporulação do fungo	17
2.3	Conidiação microcíclica em <i>Cercospora</i> do milho	18
2.4	Produção de Cercosporina	19
2.5	Importância da caracterização molecular em fitopatógenos	22
2.6	Mecanismos de defesa da planta	24
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	26
	REFERÊNCIAS	27
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	34
	ARTIGO 1 Caracterização morfológica e identificação molecular das espécies de <i>Cercospora</i> do milho de Minas Gerais	34
	ARTIGO 2 Esporulação das espécies de <i>Cercospora</i> do milho <i>in vitro</i> e em sementes de sorgo	63
	ARTIGO 3 Indução e detecção de toxina em <i>Cercospora zeina</i> e <i>Cercospora sorghi</i> f.sp.<i>maydis</i>	87

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, totalizando 56 milhões de toneladas na safra 2010 (IBGE, 2011), superado apenas pelos Estados Unidos e China (USDA, 2011). A Safra de milho 2010/2011 aumentou 2% em relação à 2009/2010. A expectativa para o próximo ano é de uma produção de 57,8 milhões de toneladas, com a soma de 35,4 milhões de toneladas da primeira safra e 21,7 milhões da segunda. A cultura do milho está presente em todas as regiões do país e Minas Gerais é o terceiro maior produtor brasileiro de milho, contribuindo com 11,9% da produção nacional, atrás do Paraná e Mato Grosso (CONAB, 2011). O Sul de Minas Gerais produziu 1,3 milhões de toneladas, o que equivale a 21,5% da safra estadual e Alto Paranaíba com 1,2 milhões de toneladas, que representa 21,1% do total colhido em Minas Gerais (IBGE, 2011).

No entanto, as doenças podem prejudicar a produção, dentre elas, a mais preocupante é a Cercosporiose do milho, que é uma doença mundialmente importante na cultura por causar grande redução em sua produtividade (FANTIN et al., 2008). Esta doença foi relatada pela primeira vez no Brasil, em 1934 por Viégas e Krug no estado de São Paulo em Campinas (VIÉGAS, 1945). Entretanto, somente a partir de 1998 severas epidemias começaram a ocorrer nas principais regiões produtoras do país, preocupando fitopatologistas, melhoristas e agricultores. A doença causou perdas significativas nas principais regiões produtoras na safra de 2000 e 2001, deixando de ser considerada secundária e passando a fazer parte das enfermidades mais importantes da cultura (CASELA e FERREIRA, 2003; PEREIRA et al., 2005). Nos últimos anos, sua incidência aumentou em várias partes do mundo, incluindo os maiores produtores mundiais

como os Estados Unidos da América, o Brasil e o México. Isto se deve ao incremento de áreas irrigadas, bem como pela utilização da sucessão de cultura com o plantio de milho em safrinha e o plantio direto sem rotação de culturas, procedimentos que favorecem a sobrevivência de patógenos na área agrícola.

No Brasil, existem poucas informações sobre esta doença, contudo, pressupõe-se que os danos causados sejam semelhantes àqueles já relatados em outros países. Em Minas Gerais a cercosporiose proporciona perdas de até 27% no período da safra (BRITO et al., 2007). Tais estudos demonstraram a importância econômica do patógeno para a cultura do milho neste estado.

Os primeiros sintomas são observados geralmente na fase de floração e nas folhas baixas (WARD et al., 1998), onde o patógeno coloniza o limbo foliar, podendo provocar extensas áreas necróticas. Os sintomas da doença caracterizam-se pelo aspecto linear-retangular das lesões que são geralmente delimitadas pelas nervuras (LATTERELL e ROSSI, 1983).

Nas lesões de cercosporiose é possível encontrar 3 espécies de *Cercospora*: *Cercospora zeina*, *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis*, as quais se diferenciam quanto à produção de toxinas, morfologia, velocidade de crescimento *in vitro*, agressividade sob condições controladas e patogenicidade.

Para se desenvolver novas estratégias de controle, é importante conhecer a estrutura genética de populações dos patógenos e sua interação com a planta. Tais conhecimentos são relevantes para a seleção de genes de resistência mais estáveis e duráveis em programas de melhoramento, para o diagnóstico rápido e preciso, que pode levar a uma tomada de decisão mais efetiva amenizando perdas, bem como para estudos de monitoramento de epidemias e dinâmica de populações. Para isto, técnicas moleculares, como o uso de marcadores moleculares podem ser usados.

Até o presente momento, a maioria dos trabalhos com cercosporiose do milho é realizada em condições de campo, com infecção natural, envolvendo estudos epidemiológicos e testes de fungicidas. As pesquisas com o fungo são escassas em decorrência da dificuldade de isolar, esporular e manter o fungo viável em condições artificiais. Das 3 espécies de *Cercospora* do milho, *C. zeina* é a mais difícil de trabalhar, em função de sua natureza, ou seja, apresenta crescimento mais lento e esporula mais tardiamente do que as outras. Além dessas razões, é um fungo que foi recém re-classificado (antigo *C. zea-maydis* – Grupo II) em 2006 por Crous e colaboradores, e é encontrado apenas em certas regiões. Desta forma, estudos *in vitro* com esses patógenos são necessários e importantes, principalmente, com *C. zeina*, o qual apresenta comportamento *in vitro*, distinto do observado *in planta*.

Para tanto, este trabalho visa identificar as espécies de *Cercospora* existentes em Minas Gerais por meio de *primers* específicos, caracterizá-las quanto à morfologia, induzir e detectar a produção de toxina, averiguar a patogenicidade do *C. sorghi* f.sp. *maydis* e identificar o melhor tipo de cultura fúngica para utilizar na inoculação de plantas de milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agente etiológico, sintomatologia e controle da cercosporiose

Nas lesões de cercosporiose é possível encontrar 3 espécies de *Cercospora*: *Cercospora zeina*, *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis* e esta última é filogeneticamente distinto da *C. sorghi* e *C. zea-maydis* (GOODWIN et al., 2001) e é considerada saprofítica (CARSON e GOODMAN, 2006). Estudos recentes constataram que as características das lesões e agressividade variam de acordo com o patógeno (CROUS et al., 2006; MATHIONI et al., 2006), no entanto, essas características apenas podem ser notadas sob condições controladas. Em relação à agressividade há diferenças entre as espécies de *Cercospora* e entre isolados (DUNKLE e CARSON, 1998; CARSON et al., 2002).

Segundo Crous et al. (2006) as lesões causadas por *C. zea-maydis* são oblongas, formando extensas faixas irregulares, de coloração cinza amarronzada, com bordos marrons e o formato e o tamanho podem ser variados. As lesões de *C. zeina* são mais uniformes, confinadas entre as nervuras com 2-3 mm de largura, e o comprimento pode variar de 5-40 mm, a coloração varia de cinza claro a marrom palha com bordos indistintos e cloróticos em lesões jovens. Mas essas características apenas podem ser notadas sob condições controladas. No campo os primeiros sintomas são observados geralmente na fase de floração e nas folhas baixas (WARD et al., 1998), onde o patógeno coloniza o limbo foliar, podendo provocar extensas áreas necróticas. A doença caracteriza-se pelo aspecto linear-retangular das lesões que são geralmente delimitadas pelas nervuras (LATTERELL e ROSSI, 1983).

Sob condições ambientais favoráveis de alta umidade relativa e presença de orvalho, as lesões resultantes da infecção inicial ficam acinzentadas, em

virtude da alta produção de esporos, os quais são transportados pelo vento ou por respingos de chuva para as folhas superiores. Os esporos germinam em 24 horas, em plantas inoculadas mantidas à temperatura ambiente (entre 22 e 30 °C). O microclima que se forma a 1-2 mm acima da lâmina foliar pode permanecer saturado de umidade por um longo período, ainda que a umidade relativa esteja abaixo de 95%. Essa condição é favorável à infecção e ao desenvolvimento da lesão, não tendo necessidade de períodos contínuos de alta umidade relativa para a ocorrência de infecção, uma vez que o patógeno pode permanecer latente até o retorno de condições ambientais favoráveis (WARD et al., 1998).

As espécies de *Cercospora* do milho estão distribuídas geograficamente de forma diferente. No Brasil é possível encontrar as 3 espécies, exceto em Goiás, onde apenas há a *C. zeina* (BRUNELLI et al., 2006), enquanto em outros países a distribuição desses patógenos pode alterar. Wang et al. (1998) constataram que há *C. zea-maydis* em todo território americano, enquanto o *C. zeina* fica confinado na região leste do país e na África apenas há ocorrência apenas da *C. zeina* (DUNKLE e LEVY, 2000).

Cercospora spp é um fungo mitospórico da classe dos Hyphomycetes, da família Dematiaceae (AGRIOS, 2005; BARNETT e HUNTER, 1998).

Dentre as espécies de *Cercospora* do milho, *C. sorghi* f. sp. *maydis* é bem distinta das demais, segundo Crous et al. (2006), elas apresentam as seguintes características: *C. zea-maydis* tem conidióforo pequeno e fasciculado (3-14), divergente, ereto, subcilíndrico a flexuoso, distintamente geniculado-sinuoso, não ramificado, dimensões de 40–180 × 4–8 µm, com (0-) 1-8 septos, de coloração marrom clara, com paredes finas e lisas. A célula conidiogênica é integrada, terminal, com 10-40 µm de comprimento e 2-3 µm de largura. Os conídios são solitário, obclavado-subcilíndrico, 30-100 x 4-9 µm, 1-10 septos,

com paredes finas, lisas, hialino, com uma ponta obtusa, base truncada, com hilo grosso e escuro, apresentando 2-3 μm de largura.

C. zeina tem conidióforos agregados (3-20), semidenso, fasciculados, divergente, ereto, subcilíndrico a flexuoso, distintamente geniculado-sinuoso, não ramificado, dimensões de 40-100 x 5-7 μm , com 1-5 septos, de coloração marrom clara, com paredes finas e lisas. Células conidiogênica integrada terminal 40-60 x 5-6 μm , com 2-3 μm de largura. Conídios solitários, fusiformes (40-)60-75(-100) x (6-)7-8(-9) μm , (1-)3-5(-10) septos, hialinos, lisos, com uma ponta subobtusada, base truncada, hilo escuro, grosso e refrativo, 2-3 μm de largura.

C. sorghi f. sp. *maydis* é bem distinto das demais, apresenta conídios de 300 x 2-5,5 μm , hialino, acicular a abclavado, quase cilíndrico, reto a moderadamente curvado, base truncada e conidióforos com coloração marrom escuro a oliváceo-palha, estreito na ponta, irregular na largura, não ramificado 20-150 x 3-5,5 μm , ambos multiseptados (CHUPP, 1953).

Além dessas características, *C. zea-maydis* forma apressórios, que é uma estrutura de penetração e exerce função de turgor e auxilia na penetração das hifas no hospedeiro (DEAN, 1997). No caso específico de *C. zea-maydis* a formação de apressórios é inibida na presença de água livre (THORSON e MARTINSON, 1993)

A produção de toxina é outra característica marcante deste gênero, que promove o desenvolvimento de manchas necróticas e de queima típicas de cercosporioses. A principal toxina é conhecida como Cercosporina (BATCHVAROVA et al., 1992.), toxina do grupo químico das perylenequinonas, cuja principal característica do grupo é a capacidade de absorver energia luminosa. Na presença de luz, a Cercosporina torna-se excitada e capaz de reagir com outras moléculas. O principal alvo de reação é o oxigênio. Esse, ao reagir com a Cercosporina, é convertido em espécies reativas de

oxigênio, que são altamente tóxicas e podem interagir e danificar macromoléculas como DNA (DAUB e BRIGGS, 1983).

Várias medidas são recomendadas para o manejo de doenças na cultura do milho, as quais levam em consideração a época de plantio, qualidade de semente, manejo cultural como a adoção da prática da rotação de culturas, nutrição de planta e associado a estas o uso da resistência genética. A aplicação dos princípios de manejo integrado de doenças requer que esse seja considerado como parte do manejo da cultura de uma forma mais ampla, o que, por sua vez, é parte de um componente integral de todo o ecossistema de uma região produtora (CASA et al., 2003).

O uso de fungicidas no combate a esta doença oferece controle em campos de híbridos suscetíveis onde existem condições ótimas ao desenvolvimento da doença (WARD et al., 1998). No Brasil, durante os surtos epidêmicos de 2000 e 2001, muitos produtores da região centro-oeste do país optaram pelo uso de fungicidas, os quais evitaram perdas na produção e controle da severidade.

Munkvold et al., (2001) ressaltam a resistência genética como controle para esta doença no Brasil, pois, genes de resistência foram descritos em germoplasmas tropical e temperado (BUBECK et al., 1993; COATES e WHITE, 1998; CLEMENTS et al., 2000) e incorporados a híbridos comerciais. Entretanto, um problema enfrentado de maneira recorrente pelos melhoristas é a mudança de comportamento de resistência dos híbridos, tanto ao longo dos anos quanto entre as áreas de cultivo (BUBECK et al., 1993). Esse comportamento pode estar relacionado, em parte, à diferença em agressividade dos isolados presentes nos diferentes ambientes e, também, à diferença de resistência dos híbridos como comprovado por Brito et al., (2007). Assim, Dunkle e Carson (1998) sugerem a seleção e utilização de isolados mais agressivos do patógeno em programas de seleção de genótipos superiores para resistência, na tentativa de minimizar a interação entre genótipo e ambiente.

2.2 Esporulação do fungo

De uma forma geral, o gênero *Cercospora* apresenta alto potencial de esporulação nas folhagens do hospedeiro (JENCO e NUTTER, 1992), mas em condições *in vitro* apresenta crescimento lento e reduzida esporulação (NAGEL, 1934). Motivo que dificulta investigações científicas com este gênero de fungo.

Não são raros estudos que tentam induzir a produção de conídios em condições artificiais. Diversos autores já constataram que diferentes fatores podem alterar a produção de esporos, tais como: luz, meio de cultura, temperatura, tempo de exposição a esses fatores e o tipo de cultura fúngica a ser plaqueado (MONTEIRO et al., 2004; NAGEL, 1934).

Brunelli et al. (2006) obtiveram melhores resultados de esporulação para *Cercospora zea-maydis* em meio Suco de Tomate Temperado e V8, sob fotoperíodo de 12/12 h. Castro e Coêlho (2000) verificaram que a produção dos conídios da *Cercospora cruenta* começou no 5º dia, ocorrendo o pico de esporulação no 8º dia de incubação sob regime de luz contínua em meio Cenoura-Dextrose-Ágar. Além desses fatores, o tipo de cultura fúngica a ser plaqueado influencia diretamente na produção de esporos, Vathakos e Walters (1979), observaram que ao transferirem apenas conídios de *Cercospora kikuchii* a quantidade de conídios produzidos era superior àquelas culturas que foram transferidas apenas micélio. Resultado semelhante foi observado por Nagel (1934).

Além dos fatores citados, há técnicas que visam estressar o fungo para a obtenção de conídios, por meio de injúrias na colônia. Dentre estas, estão as de secagem micelial, maceração ou raspagem de micélio e uso de luz ultravioleta, no entanto, existem poucos estudos envolvendo estas técnicas em *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora zeina*.

2.3 Conidiação microcíclica em *Cercospora* do milho.

Conidiação microcíclica consiste na produção de esporos sem a fase de crescimento vegetativo. Neste processo, um conídio germina (tubo germinativo, caracteriza-se por ser menor) gerando outro conídio, chamado de conídio secundário, sem a intervenção de crescimento micelial (SMITH et al., 1981), ou seja, é um método de formação de esporos assexuais, em que o ciclo de vida do fungo é reduzido. Ressalta-se que tal processo não é observável em esporos sexuais (HANLIN, 1994).

Trata-se de um mecanismo de sobrevivência, quando as condições para o crescimento vegetativo são desfavoráveis (FERNANDEZ et al., 1991; ROSSIER et al., 1977; ROTEM e BASHI, 1969; STAVELY e NIMMO, 1968), e fatores como seca, reduzida nutrição, mudança de pH, pouca umidade e temperatura podem influenciar neste processo (HANLIN, 1994).

A conidiação microcíclica tem sido descrita para mais de 100 espécies de fungos (HANLIN, 1994), incluindo fungos fitopagênicos, dentre o gênero *Cercospora* as seguintes espécies já foram relatadas: *C. beticola* (RATHAIAH, 1977), *C. kikuchii* (FERNANDEZ, et al., 1991), *C. zae-maydis* (LAPAIRE e DUNKLE, 2002).

Os conídios secundários de *Cercospora* apresentam as mesmas características dos conídios primários, no que diz respeito à patogênese, ou seja, conídios secundários de *C. beticola* penetram tão bem pelo estômato, quanto os conídios primários, no entanto, em relação à morfologia, os conídios de *C. zae-maydis* apresentam as mesmas dimensões (LAPAIRE e DUNKLE, 2002). Embora Chupp (1953) tenha observado que o comprimento dos conídios difere com as condições ambientais, indica que muitos fatores podem influenciar o tamanho dos conídios secundários.

Até o presente momento não há relatos de esporulação com este processo com isolados brasileiros de *Cercospora* do milho.

2.4 Produção de Cercosporina

Muitos fungos fitopatogênicos produzem metabólitos secundários de baixo peso molecular, que tem papel significativa na interação planta hospedeiro (WOLPERT et al.; 2002; YODER 1980), como muitas espécies de *Cercospora* (ASSANTE et al.,1977; FAJOLA 1978) que produzem a toxina; Cercosporina.

No entanto, existem espécies patogênicas altamente destrutivas e virulentas, que não produzem a toxina em meio de cultura, é o caso da *Cercospora sojina* e *Cercospora zeina*. Carson et al. (2002) e Brunelli et al. (2008) já haviam observado que alguns isolados do antigo grupo II do *C. zeaemaydis*, atual *C. zeina*, não produziam a Cercosporina. A hipótese mais aceita para explicar tal observação é que essas espécies são produtoras de toxina apenas *in planta*, uma vez que as condições apropriadas para induzir a toxina não foram providenciadas em meios artificiais. Além disso, *Cercospora sojina* e *Cercospora zeina* contêm o gene que confere auto-proteção contra a ação da toxina, o que reforça a hipótese que elas realmente são produtoras de toxina *in vivo* (GOODWIN e DUNKLE, 2010).

A Cercosporina é uma fitoxina com atividade tóxica contra um amplo espectro de organismos, portanto, não seletiva ou não específica, é produzida pelas hifas em meio de cultura, resultando em acúmulo de cristais de Cercosporina ao redor da hifa (DAUB e CHUNG, 2009); apresenta coloração avermelhada que se torna verde em condições alcalinas (presença de KOH), exibindo a máxima absorção no comprimento de onda de 480nm (JENNS et al., 1989). Pertence ao grupo das perilenequinonas e sua produção ocorre via rota

dos policetídeos, (condensação das moléculas de malonato e acetato) (DAUB e EHRENSHAFT, 2000; DAUB et al., 2005; CHOQUER et al., 2005).

Uma importante característica do grupo é a capacidade de absorver energia luminosa. Na presença de luz, a Cercosporina torna-se excitada e capaz de reagir com outras moléculas. O principal alvo de reação é o oxigênio. Este, ao reagir com a Cercosporina, é convertido em espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicas, por poderem interagir e danificar macromoléculas como DNA (DAUB, 1982b; DAUB e BRIGGS, 1983). Daub (1982) observou correlação positiva de intensidade luminosa e atividade da toxina nas células vegetais. Portanto, o papel da toxina na patogênese é bem conhecido (BALIS e PAYNE, 1971; DAUB e CHUNG, 2007; DAUB e EHRENSHAFT, 2000; DAUB et al., 2005).

A produção de toxina *in vitro* via rota dos policetídeos varia com diversos fatores, como: meio de cultura, temperatura, luz, taxa de C:N, entre as espécies, isolados de uma mesma espécie pelo meio de cultura, temperatura e luz (JENNS et al., 1989). O fator mais importante tanto para a ativação de toxina quanto para biossíntese, é a luz, pois, em sua ausência a produção de Cercosporina é anulada e a mínima exposição a ela induz produção de toxina (DAUB e CHUNG, 2009). Além desses, outros fatores estão associados à biossíntese de Cercosporina como o cálcio/calmodulina, proteína G e a MAP quinase (CHUNG, 2003; SHIM e DUNKLE, 2003).

O processo de ativação da Cercosporina pela ativação de luz, em nível molecular é conhecido, no entanto, sobre a biossíntese de Cercosporina pouco se sabe a respeito, embora, recentemente, um grupo de genes que codificam enzimas requeridas para a biossíntese dessa toxina foram identificados e caracterizados (CHEN et al., 2007).

O grupo de genes CTB (cercosporin toxin biosynthesis) é responsável pela produção de toxina e estão correlacionados com as condições ambientais, e

o gene *ctb1* produz a enzima envolvida no primeiro passo na biossíntese da Cercosporina, enquanto o gene *cfp* (cercosporin facilitator protein), não está diretamente ligado à produção de toxina e codifica a proteína, CFP, cuja função é eliminar a toxina para o meio externo; sua deleção em *Cercospora kikuchii* promoveu mutantes deficientes na produção de toxina e apresentou reduzida virulência (CALLAHAN et al., 1999). O *czk3* é outro gene que, também, está envolvido na produção de toxina, desenvolvimento do fungo e a patogênese e apenas está presente em *Cercospora zea-maydis*. Isolados que tiveram esse gene inativado apresentaram ausência de Cercosporina e de estruturas reprodutivas na folha e em meio de cultura (SHIM e DUNKLE, 2003). O gene *pdx1* ou *sor1* não está diretamente envolvido na biossíntese da Cercosporina, mas é responsável por conferir resistência contra o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)-produzido quando Cercosporina reage com a luz; a proteína desse gene é um componente essencial da biossíntese da piridoxina (vitamina B6), que é capaz de inativar a ação do oxigênio singleto (DAUB e CHUNG, 2009).

Pode-se detectar a Cercosporina em extratos de cultivos *in vitro* após 2 dias que a cultura foi transferida para o meio (JEENS et al., 1989) ou a partir de tecidos lesionados de plantas infectadas (ROBESON et al., 1993). *In vitro* a Cercosporina é sintetizada apenas em meios de cultura que propiciam o crescimento vegetativo e é reprimida sob condições nutricionais que induzem o processo de conidiação microcíclica, como em meio V8 (DAUB e CHUNG, 2007). Isto sugere que o desenvolvimento do fungo e o metabolismo secundário sejam antagônicos.

2.5 Importância da caracterização molecular em fitopatógenos

Durante os últimos anos, o conhecimento da estrutura genética de populações de fitopatógenos tem se tornado necessário para a implementação de estratégias de controle efetivas. Apesar do número de estudos com fungos ter crescido significativamente, observa-se que os trabalhos têm focado um número restrito de fitopatógenos.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados para caracterizar diversidade genética inter e intra-espécies de patógenos sem interferência do meio ambiente (BECERRA e PAREDES, 2000; BROWN, 1996; MÖLLER et al., 1992). Na maioria dos estudos de genética de populações, utilizam-se marcadores genéticos que são seletivamente neutros, altamente informativos, reproduzíveis e relativamente fáceis de serem estudados (MCDONALD, 1997).

Os *primers* específicos são pares de oligonucleotídeos sintéticos de fita simples, utilizados para iniciar a síntese de um segmento de DNA-alvo. Eles são usados em diagnósticos moleculares como ferramentas de identificação e diferenciação de fungos na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que é uma técnica altamente sensível. Esta utiliza a característica de DNA polimerases de sintetizar milhares de moléculas de DNA de fita simples a partir de uma reação de dupla fita (BORÉM e CAIXETA, 2009). As vantagens dessa técnica como: facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade tornam-a uma ferramenta de uso frequente. No entanto, estudos na área molecular ainda são escassos no Brasil.

Estudos de filogenia molecular realizados por Crous et al. (2006) para *Cercospora* do milho, utilizando sequência de DNA de regiões ITS (internal transcribed spacer) 1 e ITS 2, gene 5.8S rRNA, fator de alongação 1 α , histona H3, actina e regiões do gene calmodulina, foi possível reclassificar o antigo Grupo I e II de *C. zea-maydis*, em *C. zea maydis* e *C. zeina* respectivamente.

A partir destes resultados, *primers* específicos foram desenvolvidos por estes mesmos autores para estas espécies e para *C. sorghi* f. sp. *maydis*.

No entanto, Goodwin et al. (2001) observaram, por meio de estudos filogenéticos com sequências de nucleotídeos das regiões ITS e 5.8S r DNA, que os dois patógenos do milho, eram de fato, distintos, porém, há poucas explicações sobre o mecanismo que levaram esses patógenos a divergirem.

Durante o sequenciamento do genoma do *C. zea-maydis*, Shim e Dunkle (2002) observaram que este fungo continha uma sequência com alta similaridade ao Maggy, um retrotransposon (elemento genético móvel) do *Magnaporthe grisea*, que eles denominaram Malazy, o qual apenas foi detectável em *C. zea-maydis* quando utilizou o *primer* pPOLF2 (SHIM e DUNKLE, 2005). Neste trabalho, os autores sugerem que este elemento transponível foi adquirido pelo *C. zea-maydis*, depois que as duas espécies patogênicas divergiram.

A técnica de AFLP utilizada por Wang et al. (1998) com isolados americanos foi eficiente para separar os isolados de cercopora em dois grupos em que o Grupo I está distribuído por todo território americano, enquanto o Grupo II encontra-se confinado na região leste dos EUA. Mais recentemente, Brunelli et al. (2008) também, utilizaram AFLP, com isolados brasileiros, e foi possível observar a presença dos grupos I e II no território brasileiro, que são *C. zea-maydis* e *C. zeina*, respectivamente. Neste trabalho, também, foi possível observar em Goiás apenas uma espécie de *Cercospora* patogênica do milho, *C. zeina*, além disso, foi constatado alto nível de similaridade genética entre os isolados brasileiros, americanos e africanos.

A importância de ter o conhecimento do patógeno predominante em cada região reside, principalmente, no melhoramento genético, sendo possível manejar o uso de híbridos geneticamente resistentes em cada região, auxiliando desta forma, na quebra do ciclo epidêmico da doença.

2.6 Mecanismos de defesa da planta

A resistência de um hospedeiro a um patógeno pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e a subsequente atividade do mesmo em seus tecidos (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

Isto ocorre em virtude dos mecanismos de defesa da planta que são divididos em duas amplas categorias: a estrutural, morfológica ou anatômica e a bioquímica ou fisiológica. Os fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto as reações químicas que ocorrem nesses tecidos produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas ao crescimento deste no interior do hospedeiro (INGHAM, 1973; PASCHOLATI e LEITE, 1995).

Quando o patógeno supera os mecanismos de defesa da planta, inicia-se o processo de infecção, cujo primeiro evento é a deposição do esporo (adesão) sobre o tecido suscetível, seguida da germinação, formação e crescimento do tubo germinativo e o surgimento de estruturas que participam da penetração (WYNN, 1981).

Nesta interação planta-patógeno, a maioria dos eventos que levam ao estabelecimento das relações parasíticas ou à resistência do hospedeiro, ocorrem na célula, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas, sua visualização apenas é obtida por meio de estudos morfológicos. Desta forma, a ultraestrutura da interação patógeno-hospedeiro permite estudar o processo de infecção, esclarecendo os eventos de pré-penetração, penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro, além de evidenciar possíveis mecanismos estruturais de resistência.

Para se visualizar tais processos de infecção são necessários estudos morfológicos utilizando-se microscópios de luz (ML), eletrônico de transmissão

(MET) e eletrônico de varredura (MEV), os quais proporcionam importantes contribuições. Esses microscópios são importantes ferramentas para o entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, bem como das reações das plantas a esses patógenos.

Em relação ao patossistema milho x cercospora há poucos estudos envolvendo a Microscopia eletrônica, principalmente no Brasil. Lapaire e Dunkle (2002) observaram o processo de conidiação microcíclica na folha do hospedeiro, Crous et al. (2006) registraram a morfologia das espécies patogênicas de Cercospora. Mesmo, em estudos histológicos, o número de estudos são poucos, sendo um dos primeiros o de Beckman e Payne (1982).

Não há observações do processo infectivo com as outras duas espécies de Cercospora do milho. Desta forma, a compreensão dos mecanismos estruturais e bioquímicos de resistência de milho a estes patógenos será de suma importância para fornecer subsídios para os programas de melhoramento que objetivam novos cultivares resistentes.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Pesquisas científicas envolvendo o Gênero *Cercospora* em condições laboratoriais sempre foram muito restritas, pois, existe grande dificuldade em obter e esporular o fungo.

A produção de esporos por métodos artificiais é de suma importância, principalmente, para a área de Fitopatologia, pois, eles são essenciais para: identificação e classificação dos fungos, compreensão dos processos de infecção, estudos epidemiológicos, resistência a fungicidas dentre outros.

Uma vez superadas as dificuldade de manipulação do fungo, o número de pesquisas e de contribuições científicas podem aumentar, assim como a rentabilidade dos produtores que, ao fazer o manejo adequado, obtêm maior produtividade. Para tanto, as metodologias empregadas neste trabalho poderão ser usadas ou adaptadas a outras espécies de *Cercospora*.

Além da identificação molecular, pela técnica de PCR, das espécies patogênicas de *Cercospora* do milho, servem como ferramentas de diagnóstico confiável e rápido, auxiliando nos programas de melhoramento genético e na introdução de híbridos mais adequados para cada região.

Estudos de indução e produção de toxina com isolados brasileiros são escassos, no entanto, são importantes para estudos de expressão gênica, agressividade dentre outros.

São necessários mais estudos com os isolados brasileiros, principalmente, com o *Cercospora zeina*, cujo patógeno é encontrado em território brasileiro, é mais agressivo e mais difícil de trabalhar condições *in vitro*

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. 952 p.
- ASSANTE, G. et al. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. **Phytochemistry**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 243-247, July 1977.
- BALIS, C.; PAYNE, M. G. Triglycerides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production. **Phytopathology**, Oxford, v. 61, n. 12, p. 1477-1484, July 1971.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th ed. Minnesota: APS, 1998. 218 p.
- BATCHVAROVA, R. B.; REDDY, V. S.; BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. **Phytopathology**, Oxford, v. 82, n. 6, p. 642-646, Jan. 1992.
- BECERRA, V.; PAREDES, M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. **Agricultura Técnica**, Madrid, v. 60, n. 3, p. 270-281, 2000.
- BECKMAN, P. M.; PAYNE, G. A. External growth, penetration, and development of *Cercospora zea-maydis* in corn leaves. **Phytopathology**, Oxford, v. 72, n. 7, p. 810-811, Oct. 1982.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.
- BRITO, A. H. et al. Efeito da Cercosporiose no rendimento de híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 472-479, dez. 2007.
- BROWN, J. K. M. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. **New Phytopathology**, London, v. 133, n. 1, p. 183-195, Apr. 1996.
- BRUNELLI, K. R. et al. Efeito do meio de cultura e regime de luz para esporulação de *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 92-94, mar. 2006.

_____. Molecular variability in the maize gray leaf spot pathogen in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 4, p. 938-942, Sept. 2008.

BUBECK, D. M. et al. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 4, p. 838-847, May 1993.

CALLAHAN, T. M. et al. CFP, the putative cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v. 12, n. 10, p. 901-910, Oct. 1999.

CALPOUZOS, L. **Studies on the Sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen**. Boston: Atkins Garden; Research Laboratory Cienfuegos, 1955. 68 p.

CARSON, M. L.; GOODMAN, M. M. Pathogenicity, aggressiveness, and virulence of three species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. **Maydica**, Bergamo, v. 51, n. 1, 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**, Quebec, v. 86, n. 10, p. 1089-1093, Oct. 2002.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Decomposição dos restos culturais do milho e sobrevivência saprofídica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 55-61, ago. 2003.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **A Cercosporiose na cultura do milho**. Brasília: EMBRAPA, 2003. 5 p. (Circular Técnica, 24). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2003/circular/Circ_24.pdf>. Acesso em: 8 jun. 2011.

CASTRO, N. R.; COELHO, R. S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 26, n. 3, p. 466-471, 2000.

CHEN, H. et al. Molecular analysis of the cercosporin biosynthetic gene cluster in *Cercospora nicotianae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 64, n. 3, p. 755-770, May 2007.

CHOQUER, M. et al. The *CTB1* gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Microbe Interact**, Saint Paul, v. 18, n. 5, p. 468-476, Jan. 2005.

CHUNG, K. R. Involvement of calcium/calmodulin signaling in cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1187-1196, Feb. 2003.

CHUPP, C. **A monograph of the fungus genus Cercospora**. New York: The Ronald, 1953. 667 p.

CLEMENTS, M. J.; DUDLEY, J. W.; WHITE, D. G. Quantitative trait loci associated with resistance to gray leaf spot of corn. **Phytopatology**, Oxford, v. 90, n. 9, p. 1018-1025, Sept. 2000.

COATES, S. T.; WHITE, D. G. Inheritance of resistance to gray leaf spot in crosses involving selected resistance inbred lines of corn. **Phytopathology**, Oxford, v. 88, n. 9, p. 972-998, Sept. 1998.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos, safra 2010/2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011..pdf>. Acesso em: 10 jun. 2011.

CROUS, P. W. et al. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 55, n. 1, p. 189-197, Jan. 2006.

DAUB, M. E. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, Washington, v. 69, p. 1361-1364, 1982.

DAUB, M. E.; BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. **Plant Physiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 763-766, Apr. 1983.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. **Cercosporin**: a photoactivated toxin in plant disease. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin>>. Acesso em: 12 fev. 2011.

_____. Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis. In: _____. **The mycota V**: plant relationships. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p. 201-219.

- DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 461-490, Sept. 2000.
- DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 197-206, Sept. 2005.
- DEAN, C. R. A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 211-234, Sept. 1997.
- DUNKLE, L. D.; 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, 1998. p. 30-35.
- DUNKLE, L. D.; LEVY, M. Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**, Oxford, v. 90, n. 5, p. 486-490, May 2000.
- FAJOLA, A. O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological and Plant Pathology**, London, v. 13, n. 2, p. 157-164, June 1978.
- FANTIN, G. M. et al. Efeito da mancha de cercospora na produtividade do milho safrinha, no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 7, n. 3, p. 231-250, set. 2008.
- FERNANDEZ, F. A.; GLAWE, D. A.; SINCLAIR, J. B. Microcycle conidiation and nuclear behavior during conidiogenesis in *Cercospora kikuchii*. **Mycologia**, New York, v. 83, n. 6, p. 752-757, Dec. 1991.
- GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D. Cercosporin production in *Cercospora* and related anamorphs. In: LARTEY, R. T. et al. (Ed.). **Cercospora leaf spot of sugar beet and related species**. Saint Paul: APS, 2010. p. 97-108.
- GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMAN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, Oxford, v. 91, n. 7, p. 648-658, Mar. 2001.
- HANLIN, R. T. Microcycle conidiation: a review. **Mycoscience**, Tokyo, v. 35, n. 1, p. 113-123, Apr. 1994.

INGHAM, J. L. Disease resistance in higher plants: the concept of pre-infectious and post-infectious resistance. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 78, n. 4, p. 314-335, Dec. 1973.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1798&id_pagina=1>. Acesso em: 20 jul. 2011.

JENCO, J. H.; NUTTER, F. W. Diurnal and seasonal periodicity of *Cercospora zea-maydis* in Iowa. **Phytopathology**, Oxford, v. 82, n. 9, p. 992-996, June 1992.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E.; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 213-219, Feb. 1989.

LAPAIRE, C. L.; DUNKLE, L. D. Microcycle conidiation in *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 193-199, Feb. 2003.

LATTERELL, F. M.; ROSSI, A. Gray leaf spot of corn: a disease on the move. **Plant Disease**, Quebec, v. 67, n. 8, p. 842-847, Aug. 1983.

MATHIONI, S. M. Aggressiveness between genetic groups I and II of isolates of *Cercospora zea-maydis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 547-551, Dec. 2006.

MCDONALD, B. A. The population genetics of fungi: tools and techniques. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 448-453, Jan. 1997.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, Oct. 1992.

MONTEIRO, A. C. et al. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 561-565, June 2004.

MUNKVOLD, G. P. Probabilities for profitable fungicide use against gray leaf spot in hybrid maize. **Phytopathology**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 477-484, Jan. 2001.

NAGEL, C. M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology**, Oxford, v. 24, p. 1101-1110, Dec. 1934.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 417-453.

PEREIRA, A. O. P.; CAMARGO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho (*Zea mays*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. p. 477-488.

RATHAIAH, Y. Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugarbeet. **Phytopathology**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 358-362, Mar. 1977.

ROBESON, J. R.; JALAL, M. A. F.; SIMPSON, R. B. **Methods for identifying cercosporin-degrading microorganisms**. US n. PI 5.262.306, 16 Nov. 1993.

ROSSIER, C.; TON-THAT, T. C.; TURIAN, G. Microcyclic microconidiation in *Neurospora crassa*. **Experimental Mycologia**, New Jersey, v. 1, n. 1, p. 52-62, Mar. 1977.

ROTEM, J.; BASHI, E. Induction of sporulation of *Alternaria porri* f. sp. *solani* by inhibition of its vegetative development. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 53, n. 3, p. 433-439, Jan. 1969.

SHIM, W. B.; DUNKLE, L. D. *CZK3*, a MAP kinase kinase kinase homolog in *Cercospora zea-maydis*, regulates cercosporin biosynthesis, fungal development, and pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interact**, Saint Paul, v. 16, n. 4, p. 760-768, Aug. 2003.

_____. Identification of genes expressed during cercosporin biosynthesis in *Cercospora zea-maydis*. **Physiological and Molecular, Plant Pathology**, London, v. 61, n. 4, p. 237-248, Oct. 2002.

SMITH, J. E. et al. Microcycle conidiation. In: TURIAN, G.; HOHL, H. R. (Ed.). **The fungal spore: morphogenetic controls**. London: Elsevier, 1981. p. 627-650.

STAVELY, J. R.; NIMMO, J. A. Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotinae*. **Phytopathology**, Oxford, v. 58, p. 1372-1376, 1969.

THORSON, P. R.; MARTINSON, C. A. Development and survival of *Cercospora zeaemaydis* germings in different relative humidity environments. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 2, p. 153-157, Feb. 1993.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World agricultural supply and demand estimates**. Disponível em: < HTTP :// www. usda.gov /oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2011.

VATHAKOS, M. G.; WALTERS, H. J. Production of conidia by *Cercospora kikuchii* in culture. **Phytopathology**, Oxford, v. 69, p. 832-833, 1979.

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

WANG, J.; LEVY, M.; DUNKLE, L. D. Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. **Phytopathology**, Oxford, v. 88, n. 12, p. 1269-1275, Dec. 1998.

WARD, J. M. J.; NOWELL, D. C. Integrated management for the control of maize gray leaf spot. **Integrated Pest Management Reviews**, Heidelberg, v. 3, n. 3, p. 177-188, Sept. 1998.

WOLPERT, T. J.; DUNKLE, L. D.; CIUFFETTI, L. M. Host-selective toxins and a virulence determinants: what's in a name? **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 252-285, Feb. 2002.

WYNN, W. K. Tropic and taxic responses of pathogens to plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 19, n. 1, p. 237-255, Sept. 1981.

YODER, O. C. Toxins in pathogenesis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, n. 1, p. 103-129, Sept. 1980.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**Caracterização morfológica e identificação molecular das espécies de
Cercospora do milho de Minas Gerais**

Morphologic characterization and identification of the species of *Cercospora* from
maize of MinasGerais state.

Artigo preparado conforme normas da Tropical Plant Pathology

Érika Sayuri Maneti Koshikumo, Eduardo Alves, Hilário Antônio de Castro,
Renzo Garcia Von Pinho, Larry D. Dunkle.

RESUMO

Nas lesões de cercosporiose pode-se encontrar três espécies de *Cercospora*: *Cercospora zeina*, *Cercospora zae-maydis* e *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*. Desta forma, uma caracterização morfológica e molecular pode promover maior precisão no diagnóstico, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi fazer identificação molecular, caracterizar morfológicamente e calcular o IVCN em diferentes meios de cultura das espécies de *Cercospora* do milho de Minas Gerais. Para identificação molecular por PCR foram usados *primers* específicos CZ e CZM. A caracterização em meio de cultura foi feita em 4 meios, STT, AO, MA e BDA a 27 °C sob fotoperíodo de 12/12 h. Foi calculado o IVCN, determinada a produção de conídios e medidos os conidióforos. A capacidade de produção de apressório em folhas de milho por *Cercospora zae-maydis* foi, também, avaliada utilizando microscopia eletrônica de varredura. De folhas com sintomas típicos de cercosporiose das safras de milho de 2007 e 2008 do estado de Minas Gerais foi possível obter 106 isolados de *Cercospora*. Destes foram identificados molecularmente 15 isolados de *C. zae-maydis*, 12 de *C. zeina* e 79 *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*. Morfológicamente, *C. zeina* apresenta conidióforos menores que 100 µm e conídios mais fusiformes, enquanto os conídios de *C. zae-maydis* é mais obclavado a subcilíndrico com conidióforos maiores, podendo chegar 180 µm de comprimento, enquanto *C. sorghi* f. sp. *maydis* é bem distinta das demais espécies. Em meio STT todas as espécies de *Cercospora* apresentaram menor IVCN. As colônias apresentam características semelhantes, exceto no meio AO. Foi verificada a produção de apressórios por *Cercospora zae-maydis* em folhas de milho. Desta forma, conclui-se que há 3 espécies de *Cercospora* em Minas Gerais, as quais se diferenciam morfológicamente e apresentam diferentes IVCN.

Palavras-chave: Cercosporiose do milho, biologia molecular de fungos, microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

In the lesion of maize gray leaf spot, is found three species of Cercospora: *Cercospora zeina*, *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora sorghi* f.sp.*maydis*. This way, the morphologic characterization and identification molecular further high precision in the diagnoses. For that reason, the objective of this work is to characterize morphologically, identify molecularly and calculate the MIGS of the species of Cercospora from Minas Gerais state, Brazil. For molecular analysis, we used the PCR technique with specific primers, CZ and CZM. The characterization in culture media was made in 4 media: STT, OA, MA and PDA, at 27 °C, under a photoperiod of 12/12 h. It was evaluated the MGVI and determined the conidia production, and the conidiophores were measured. The capacity of formation of appressoria on the corn leaves by *Cercospora zea-maydis* was evaluate using scanning electron microscopy. Corn leaves with symptoms of Gray Leaf Spot of crops 2007-2008 from Minas Gerais were possible obtain 106 isolates of cercospora. It was identify 15 of *C. zea-maydis* and 12 of *C. zeina* and 79 *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*. Morphologically, *C. zeina* is distinguished by presenting shorter conidiophores (up to 100 µm) and fusiform conidia, while the conidia of *C. zea-maydis* is obclavate to subcylindrical with longer conidiophores (180 µm). *C. sorghi* f. sp. *maydis* is different from others species. In the media STT all species of cercospora grow slower. Generally, the colonies have similar characteristics, except in AO medium. It was observed the production of apressoria by *Cercospora zea-maydis* on the corn leaves. It was possible conclude that there are 3 species of cercospora, which are different morphologically and have different MIGS.

Keywords: maize gray leaf spot, molecular biology of fungi, scanning electron microscopy.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, totalizando 56 milhões de toneladas na safra 2010/2011 (IBGE, 2011) e a cultura do milho está presente em todas as regiões do país, ressaltando que Minas Gerais é terceiro maior produtor brasileiro de milho, responde por 11,9 % da produção nacional (Conab, 2011). O Sul de Minas Gerais produziu 1,3 milhões de toneladas, o que equivale a 21,5% da safra estadual e o Alto Paranaíba com 1,2 milhões de toneladas, representa 21,1% do total colhido em Minas Gerais (IBGE, 2011).

No entanto, as doenças podem prejudicar a produção, dentre elas, a mais preocupante é a cercosporiose do milho. Em Minas Gerais a cercosporiose proporciona perdas de até 27% no período da safra (Brito et al., 2007).

Os primeiros sintomas são observados geralmente na fase de floração e nas folhas baixas (Lipps, 1987; Ward et al., 1998), onde o patógeno coloniza o limbo foliar, podendo provocar extensas áreas necróticas. A doença caracteriza-se pelo aspecto linear-retangular das lesões que são geralmente delimitadas pelas nervuras (Latterell & Rossi, 1983).

Recentemente, Crous et. al. (2006) observaram que há diferenças nas lesões provocadas por cada patógeno. As lesões causadas por *C. zea-maydis* são oblongas, formando extensas faixas irregulares, de coloração cinza amarronzada, com bordos marrons e o formato e o tamanho podem ser variados. As lesões de *C. zeina* são mais uniformes, confinadas entre as nervuras com 2-3 mm de largura, e o comprimento pode variar de 5-40 mm, a coloração varia de cinza claro a marrom palha com bordos indistintos e cloróticos em lesões jovens.

No entanto, essas diferenças de sintomas apenas podem ser percebidas em ambientes controlados e não em campo, o que dificulta a identificação do patógeno que predomina em uma região, surgindo dificuldade de se ter uma tomada de decisão assertiva. O uso de híbridos adequados, ou seja, aqueles que

são resistentes e com alta produtividade podem ser usados para quebrar o ciclo da doença ou evitá-la. Desta forma, é importante conhecer qual é o patógeno prevalente, assim como a biologia deste. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar morfológicamente, fazer identificação molecular, assim como calcular o IVCM em diferentes meios de cultura das espécies de *Cercospora* do milho de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das culturas fúngicas

As colônias monospóricas foram obtidas de folhas sintomáticas provenientes das principais regiões produtoras de milho, da safra 2008-2009 de Minas Gerais e mantidas a 27 °C por 12 horas de fotoperíodo.

Caracterização morfológica

As colônias das 3 espécies de *Cercospora* do milho foram caracterizadas em meio Malte, MA, (20 gramas de malte, 20 gramas de ágar e 1 litro de água destilada), Suco de Tomate Temperado, STT (200 mL de suco de tomate temperado "Super bom"; 20 g de ágar; 3,2 g de CaCO₃), Aveia, AO (20 gramas de farinha de aveia Otter, 20 gramas de ágar e 1 litro de água destilada), e Batata-Dextrose- Agar, BDA (20 g de PDB, 20 gramas de ágar e 1 litro de água destilada), com 20 dias sob temperatura de 27 °C e fotoperíodo de 12/12 horas.

Foram medidos 40 conídios e conidióforos e contados os números de septos de ambos em microscópio Olympus CX 31 em objetiva de 40X de aumento.

Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM)

O IVCM foi determinado com dois tipos de culturas fúngicas: conídios e micélio nos meios MA, STT, OA e BDA. As leituras foram feitas de 4 em 4 dias e o tamanho da colônia foi medido nos dois sentidos perpendiculares da placa com um paquímetro eletrônico digital CE[®].

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com 8 tratamentos e 6 repetições. As avaliações foram realizadas por esquema fatorial 4x2 (meios x tipos de culturas fúngicas). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado utilizando 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 inoculação.

Caracterização molecular

Extração do DNA e utilização de *primer* específicos

O DNA foi extraído com o Kit da Invitrogen, Invisorb[®] Spin Plant Mini kit, de acordo com as instruções do fabricante e foi submetido à amplificação em PCR (Polymerase Chain Reaction) com volume de 50 μ L, contendo 1 μ L (20 a 25 ng) de DNA molde. Os *primers* específicos CZ (5'-GCG ACC CTG CCG TTT -3' e 5'-CTC AGC CGG AGA CTT CG -3') e CZM (Czm forward: 5'-GCG ACC CTG CCG TTC -3' e 5'-AGC TCA GCC GGA GAC TTT A -3') foram desenvolvidos a partir dos resultados dos sequenciamentos das regiões ITS e 5.8S ribossomal DNA (rDNA). E confeccionados pela Invitrogen Brasil Custom Technologies.

A PCR para 50 μL continha: 5,0 μL 10x PCR buffer 100 mM Tris/HCl (pH 8,3), 36,90 μL de água deionizada, 1,6 μL MgCl_2 (25Mm), 1,0 μL de dNTP mix (10 mM) 1,0 μL de DNA(20 a 25 ng), 2,0 μL de cada *primer* específico. Para cada reação foi adicionado 0,5 μL AmpliTaq DNA polymerase. O DNA foi incubado no Multigene I, da Labnet International Inc., modelo LA-TC6000-G-230, programado para 2 min a 94 °C, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 64 °C por 45s, e a 72 °C por 1 min, estendendo 10 min a 72 °C.

O produto da PCR foi separado a 2 % em gel agarose em tampão TAE (TRIS-acetato 0,04M e EDTA 0,001M) corado com gel red (Uniscience), visualizados em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentado. O marcador utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi de 100 pb (Qiagen) O marcador utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi de 100 pb (Qiagen) .

Preparação de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

As folhas foram inoculadas e colocadas em câmara úmida sob fotoperíodo de 12 horas. Após o período de inoculação os fragmentos do limbo foliar ou do meio de cultura foram transferidos para um recipiente de 1,5 mL contendo 500 μl de solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M - pH 7,2 e CaCl_2 0,001M) por um período de no mínimo 24 horas e armazenadas a 4°C. Após este período de fixação, as amostras foram imersas em tampão cacodilato por 3 vezes de 10 minutos em cada imersão. Em seguida foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavadas em água destilada por 3 vezes e subsequentemente desidratados em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100% por três vezes). Posteriormente foram levados para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO_2 e complementação da secagem. Os

espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para serem observados em MEV LEO EVO 40 XVP. As imagens geradas foram registradas e gravadas digitalmente, com posterior aprimoramento das mesmas no Software Photopaint do Corel Draw 12.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica e Índice de velocidade de Crescimento micelial (IVCM)

De folhas com sintomas típicos de cercosporiose das safras 2007 e 2008 do estado de Minas Gerais foi possível obter 106 isolados de cercospora de municípios das principais regiões produtoras de milho: Patos de Minas, Paracatu, Sacramento, Unai, Ibiá, Ipiacu, Lavras, Nazareno, Madre de Deus e Bambuí, sendo 15 de *Cercospora zea-maydis*, 12 de *Cercospora zeina* (Tabela 1) e 79 *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis* (Tabela 2).

As características básicas das colônias de *Cercospora* do milho são erupcentes, densas, margens lisas, mas irregulares, de crescimento lento nos meios MA, BDA e STT, mas quando cultivadas em meio AO, o micélio caracteriza-se por ser esparso, cotonoso, com maior crescimento micelial.

Quando incubadas a 27 °C, sob fotoperíodo de 12 horas por 20 dias, as colônias de *C. zeina* são brancas, brancas-acinzentadas ou brancas com pontuações cinza, de diferentes tonalidades, de cinza escuro a claro, bordos irregulares, lisos, podendo apresentar coloração cinza a preta quando cultivadas em meio BDA, STT ou MA. Em AO o micélio caracteriza-se por ser esparso, cotonoso, margens lisas, mas irregulares, branco-acinzentado (Figura 1). O crescimento é muito mais lento do que as outras espécies de cercospora do

milho. *C. zea-maydis* apresenta as mesmas características que a *C. zeina*, com o diferencial que esse patógeno produz pigmentação avermelhada que é a Cercosporina (Wang et al.,1998), sendo possível observar manchas rosadas nas colônias, principalmente em meio AO.

As colônias *C. sorghi* f.sp. *maydis* têm coloração branca acinzentada, podendo ter coloração rosada nos quatro meios estudados quando o fungo produz a toxina, mas essa produção é mais frequentemente observada nos meio BDA e MA. Alguns isolados dessa espécie podem produzir toxina em STT, sob as condições estudadas, enquanto outros não (Figura 1). Seu crescimento é mais rápido do que as duas espécies e das três espécies, *C. zeina* cresce mais lentamente.

Alguns isolados de *C. sorghi* f.sp. *maydis* produzem a toxina em meio STT a 27 °C sob fotoperíodo de 12 horas. (Figura 2). De acordo Daub & Chung (2007) os processos de esporulação e de produção de toxina são antagônicos, ou seja, em meio de cultura que estimula um processo, inibe o outro, consequentemente.

Os diâmetros das colônias variam de acordo com as espécies e com o meio de cultura, em 20 dias sob as condições citadas foi possível observar que o diâmetro médio das colônias de *C. zeina* em STT, MA, BDA e AO foi de 11-16, 16-19, 21-26 e 17-34 mm, respectivamente, o *C. zea-maydis* apresentou na mesma sequência 20-28, 23-29, 20-33 e 40-48 mm, enquanto no *C. sorghi* f.sp. *maydis* foi observado diâmetros maiores: 30-38, 42-49, 40-50 e 40-48 mm para os meios STT, MA, BDA e AO.

Tabela 1 Isolados de *Cercospora zeina* e *Cercospora zae-maydis* obtidos no estado de Minas Gerais

Código de acesso	Origem geográfica	Espécies
IN-3	Indianópolis	CZM
IN-4	Indianópolis	CZ
IN-5	Indianapolis	CZ
IN-6	Indianópolis	CZ
LV-23	Lavras	CZ
LV-24	Lavras	CZM
PT-27	Patos	CZ
IP-30	Ibiaçu	CZM
IP-31	Ibiaçu	CZM
LV-33	Lavras	CZM
PA-69	Paracatu	CZM
PA-70	Paracatu	CZM
PA-77	Paracatu	CZM
PA-80	Paracatu	CZM
PA-87	Paracatu	CZM
PA-92	Paracatu	CZM
PA-122	Paracatu	CZM
PA-131	Paracatu	CZM
PA-149	Paracatu	CZM
BA-150	BambuÍ	CZ
LV-156	Lavras	CZ
LV-162	Lavras	CZ
BA-164	BambuÍ	CZM
BA-165	BambuÍ	CZ
PA-166	Paracatu	CZ
MC-168	Machado	CZ
MC-171	Machado	CZ

Espécies de *Cercospora* patogênica do milho: *Cercospora zae-maydis* (CZM) e *Cercospora zeina* (CZ)

Tabela 2 Isolados de *Cercospora sorghi* f.sp.*maydis* obtidos no estado de Minas Gerais

Código de acesso	Origem geográfica	Código de acesso	Origem geográfica
LV-1	Lavras	PT-100	Patos
LV-2	Lavras	PT-101	Patos
LV-8	Lavras	PT-102	Patos
LV-10	Lavras	PA-103	Paracatu
LV-12	Lavras	LV-104	Lavras
LV-13	Lavras	PT-105	Patos
LV-14	Lavras	LV-107	Lavras
LV-15	Lavras	BA-108	BambuÍ
LV-16	Lavras	PA-109	Paracatu
LV-25	Lavras	PT-110	Patos
LV-36	Lavras	PA-111	Paracatu
LV-37	Lavras	LV-112	Lavras
LV-38	Lavras	LV-113	Lavras
LV-39	Lavras	LV-114	Lavras
LV-42	Lavras	LV-115	Lavras
LV-45	Lavras	LV-116	Lavras
LV-50	Lavras	IB-117	Ibiá
LV-52	Lavras	IB-118	Ibiá
LV-55	Lavras	MD-119	Madre de Deus
LV-56	Lavras	LV-120	Lavras
LV-60	Lavras	LV-121	Lavras
PA-61	Paracatu	LV-125	Lavras
PT-67	Patos	UN-127	Unai
PT-68	Patos	SJ-128	São João del Rei
PA-70	Paracatu	UN-129	Unai
PA-72	Paracatu	LV-130	Lavras
PT-76	Patos	PA-132	Paracatu
PA-78	Paracatu	LV-133	Lavras
NA-79	Nazareno	MD-134	Madre de Deus
PA-81	Paracatu	SJ-135	S.J. del Rei
PT-82	Patos	LV-136	Lavras
PA-83	Paracatu	SJ-137	São João del Rei
PA-84	Paracatu	LV-138	Lavras
PT-85	Patos	UB-139	Uberlândia
PA-91	Paracatu	LV-140	Lavras
PA-94	Paracatu	LV-141	Lavras
PA-95	Paracatu	LV-142	Lavras
PA-96	Paracatu	SA-143	Sacramento
PA-97	Paracatu	SJ-144	São João del Rei
PA-99	Paracatu		

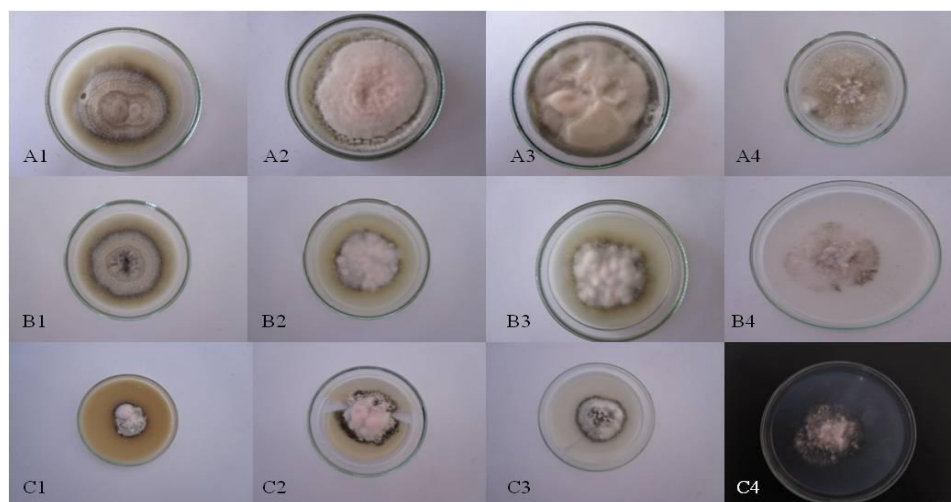


Figura 1 Fotografias de colônias em meio Suco de Tomate Temperado – STT (1), Malte (2), Batata Dextrose Àgar (3), Aveia (4). Espécies de *Cercospora* : *Cercospora sorghi* f.sp.*maydis*, (A), *Cercospora zeae-maydis* (B) e *Cercospora zeina* (C)

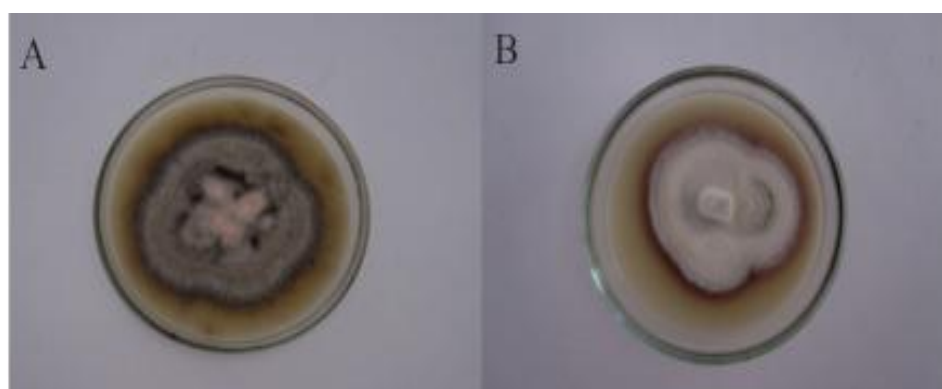


Figura 2 Fotografias de *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* em meio de cultura Suco de Tomate Temperado, a 27 °C e fotoperíodo de 12horas mostrando ausência de toxina no isolado L173 (A) e presença de toxina no isolado L2 (B), sob as mesmas condições

As características das colônias observadas neste trabalho assemelham-se observadas por Crous et al. (2006), embora as condições em que os fungos

foram mantidos fossem diferentes, ou seja, luz UV contínua e temperatura de 25 °C.

O início da esporulação de *Cercospora* ocorre geralmente nos bordos das colônias. A coloração cinza a preta que se inicia nas extremidades das colônias, é a formação dos conidióforos e dos conídios (Figura 3), que ocorre com mais frequência em meio STT sob fotoperíodo de 12 horas a 27 °C (Figura 4).

Ao se transferir apenas conídios foi possível obter colônias contendo grande número de conídios por transferência de esporos (Figura 5).

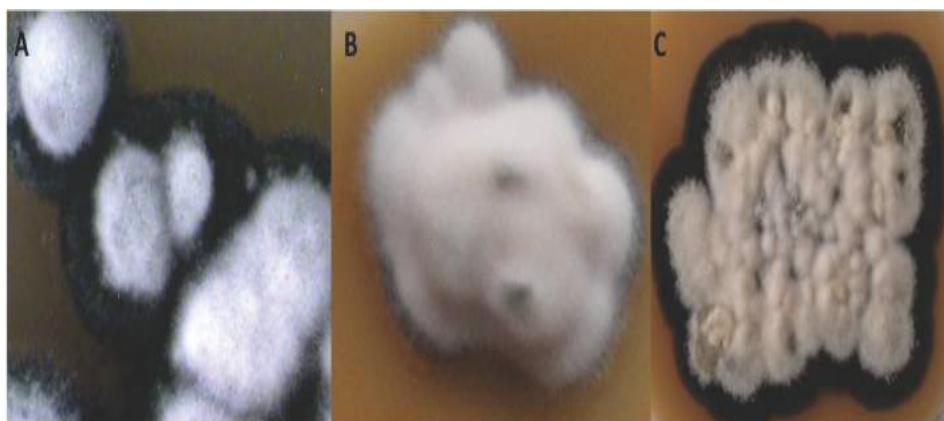


Figura 3 Fotografia de colônias de *Cercospora zeina* em início de esporulação (A) *Cercospora zae-maydis* (B) e *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* (C) a 27 °C e fotoperíodo de 12 horas

Nagel (1933) já havia observado em diversas espécies de *Cercospora* que, ao transferir conídios para outro meio proporcionava culturas, que ele denominou de esporulantes, enquanto ao se transferir meio com micélio geravam-se colônias ricas em hifas. Brunelli et al. (2006) estudaram a esporulação de *C. zae-maydis* em diferentes condições e meios, onde o número de esporos inicial foi de $8,0 \times 10^4$ esporos/mL.

Ao fazer a transferência de esporos dois fenômenos podem acontecer: conidiação microcíclica e germinação interativa.

Conidiação microcíclica consiste na produção de esporos sem a fase de crescimento vegetativo. Neste processo, um conídio germina, (tubo germinativo, caracteriza-se por ser menor) gerando outro conídio, chamado de conídio secundário, sem a intervenção de crescimento micelial (Smith et al., 1981). Trata-se de um mecanismo de sobrevivência quando as condições para o crescimento vegetativo são desfavoráveis (Fernandez et al., 1991; Rossier et al., 1977; Rotem & Bashi, 1969; Stavely & Nimmo, 1968), como: seca, reduzida nutrição, mudança de pH, pouca umidade e temperatura podem influenciar neste processo (Hanlin, 1994). A germinação interativa é quando há a formação de conidióforos e conídios diretamente de um esporo (Mangenot & Reisinger, 1976). Ambos foram registrados em *C. zeina* (Figura 6)

Cercospora zae-maydis tem conidióforo pequeno e fasciculado (3-14), divergente, ereto, subcilíndrico a flexuoso, distintamente geniculado-sinuoso, não ramificado, dimensões de $40-180 \times 4-8 \mu\text{m}$, com (0-) 1-8 septos, de coloração marrom clara, com paredes finas e lisas (Figura 7). A célula conidiogênica é integrada, terminal, com $10-40 \mu\text{m}$ de comprimento e $2-3 \mu\text{m}$ de largura. Os conídios são solitário, obclavado-subcilíndrico, $30-100 \times 4-9 \mu\text{m}$, 1-10 septos, com paredes finas, lisas, hialino, com uma ponta obtusa, base truncada, com hilo grosso e escuro, apresentando $2-3 \mu\text{m}$ de largura (Figura 8).

Cercospora zeina tem conidióforos agregados (3-20), semidenso, fasciculados, divergente, ereto, subcilíndrico a flexuoso, distintamente geniculado-sinuoso, não ramificado, dimensões de $40-100 \times 5-7 \mu\text{m}$, com 1-5 septos, de coloração marrom clara, com paredes finas e lisas. Células conidiogênica integrada (Figura 7) terminal $40-60 \times 5-6 \mu\text{m}$, com $2-3 \mu\text{m}$ de largura. Conídios solitários, fusiformes $(40-60-75(-100) \times (6-7-8(-9) \mu\text{m}$,

(1–)3–5(–10) septos, hialinos, lisos, com uma ponta subobtusada, base truncada, hilo escuro, grosso e refrativo, 2-3 µm de largura (Figura 8).

A maior ocorrência de *C. sorghi* f. sp *maydis* nas folhas sintomáticas de milho é em virtude de : i) maior quantidade do mesmo na superfície foliar, ii) apresentar conídios maiores que os da *C. zeina* e *C. zea-maydis*, característica que facilita sua coleta, iii) estar presente em várias regiões do limbo foliar independente se a área apresenta sintomas típicos de cercosporiose, de outra doença ou ainda se o tecido está sadio, iv) esporula primeiro que as outras espécies de cercospora presentes no milho, e v) cresce mais rapidamente em meio de cultura.

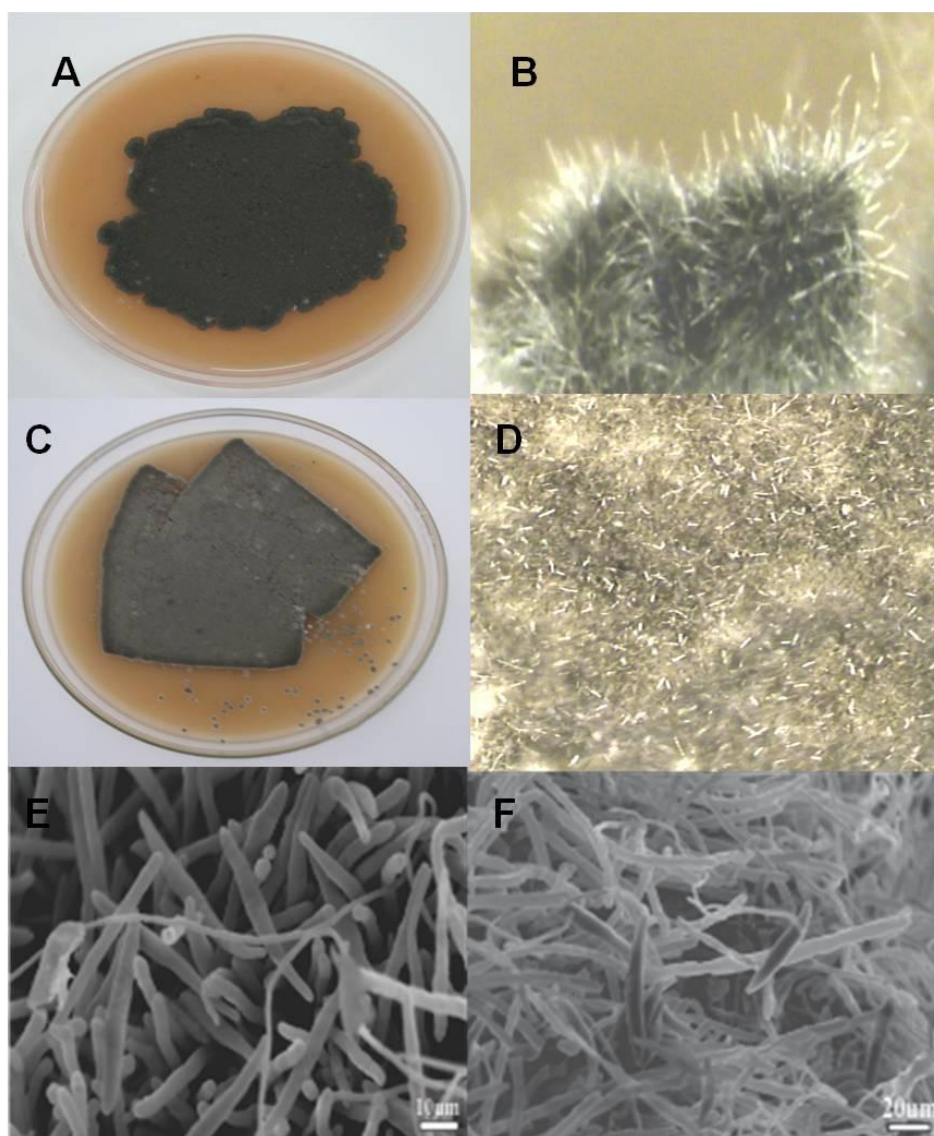


Figura 4 Conídios em meio Suco de Tomate Temperado incubados a 27 °C, sob fotoperíodo de 12/12 horas de *Cercospora zeae-maydis* (A) *Cercospora-zeina* (C), Conídios observados em microscópio estereoscópico de *C. zeae maydis* (B) e *C. zeina* (D), e eletromicrografia de varredura dos conídios (E) *C. zeae-maydis* e (F) *C. zeina*

Carson & Goodman (2006), Wang et al. (1998) relataram a presença de *C. sorghi* f. sp. *maydis* com *C. zea-maydis* nas lesões de cercosporiose, assim como as características do *C. sorghi* f.sp *maydis* mencionadas anteriormente.

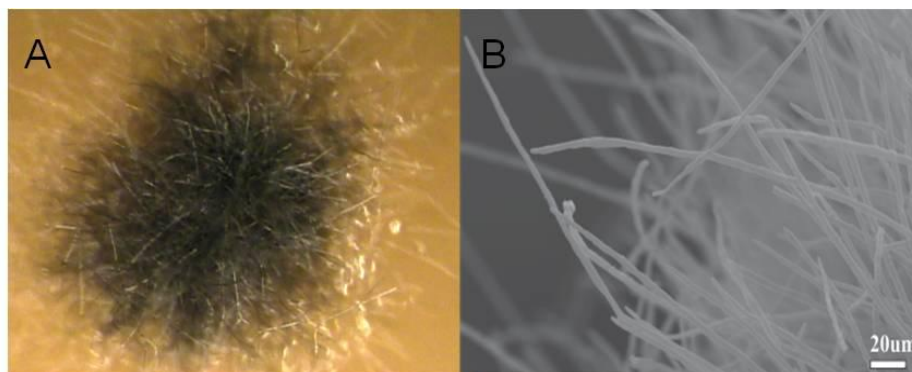


Figura 5 Conídios de *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* em meio de cultura Suco de Tomate Temperado (STT) observados em microscópio estereoscópio (A) e eletromicrografia de varredura da colônia e de conídios (B)

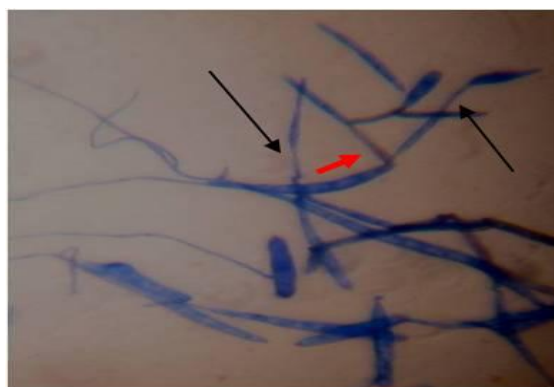


Figura 6 Fotomicrografia do processo de conidiação microcíclica (setas maiores) e germinação interativa (seta menor) em *Cercospora zeina*

Cercospora sorghi f. sp. *maydis* é bem distinto das demais, apresenta conídios de 300 x 2-5,5 μ m, hialino, acicular a obclavado, quase cilíndrico, reto

a moderadamente curvado, base truncada e conidióforos com coloração marrom escuro a oliváceo-palha, estreito na ponta, irregular na largura, não ramificado 20-150 x 3-5,5 µm, ambos multiseptados (Figura 7) (Chupp, 1953). As células conidiogênicas são integradas, terminais e com cicatriz (Figura 7)

Tanto a *C. zeina* quanto a *C. zea-maydis* tem dimensões de conídios muito semelhantes, no entanto, *C. zeina* pode ser diferenciada por apresentar conidióforo menor que 100 µm e conídio mais fusiforme, enquanto os conídios de *C. zea-maydis* é mais obclavado a subcilíndrico com conidióforos maiores, podendo chegar 180 µm de comprimento.

Geralmente os conídios secundários, ou aqueles provenientes de conidiação microcíclica são menores (Lapaire & Dunkle, 2002). Desta forma, foram medidos 40 conídios de dois isolados de *C. zeina* (BA150 e MC-171), e *C. zea-maydis* (PA-92 e IP-30) e os mesmos não apresentaram faixa de variação de dimensões diferentes das dimensões descritas por Crous et al.(2006) (dados não mostrados).

Outra característica comum nas espécies de *Cercospora* do milho é a formação de apressórios (Figura 9), cuja estrutura exerce função de turgor e auxilia na penetração das hifas do hospedeiro (Dean, 1997). Para formá-las não é necessária umidade contínua e na presença de água livre tem sua formação inibida (Thorson & Martinson, 1993)

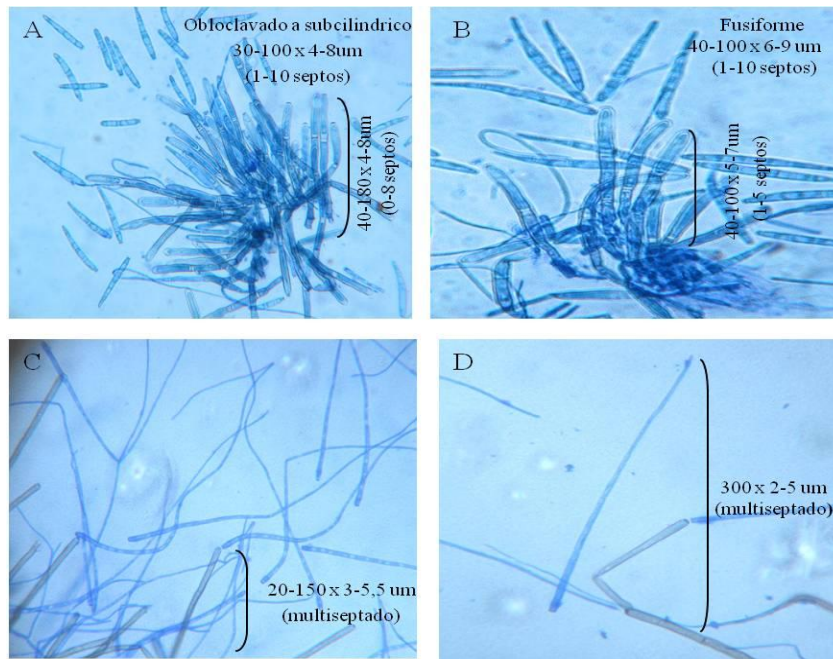


Figura 7 Fotomicrografias de esporodóquios das espécies de cercospora do milho com as respectivas dimensões dos conídios e conidióforos (A) *Cercospora zae-maydis*, (B) *Cercospora zeina* e (C, D) *Cercospora sorghi* fsp *maydis*

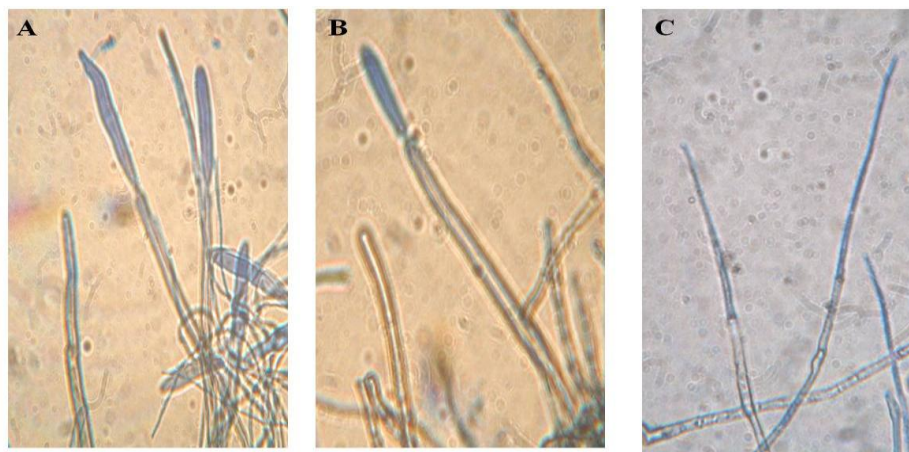


Figura 8 Fotomicrografia de células conidiogênicas das espécies de cercospora do milho (A) *Cercospora zae-maydis*, (B) *Cercospora zeina* e (C e D) *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*.

Portanto, as espécies de *Cercospora* do milho apresentam características morfológicas distintas, produzem apressórios e suas colônias apresentam características comuns nos meios MA, BDA e STT, exceto em AO. Além de que, o crescimento de *C. zeina* caracteriza-se por ser bem mais lento que as demais espécies, fato que fica evidente no estudo de IVCM, onde *C. sorghi* f. sp. *maydis* cresce em média 3 vezes mais que a *C. zeina*, enquanto o *C. zea-maydis* cresce duas vezes mais que o *C. zeina* quando se transfere conídios ou quando se utiliza micélio (Tabela.3).

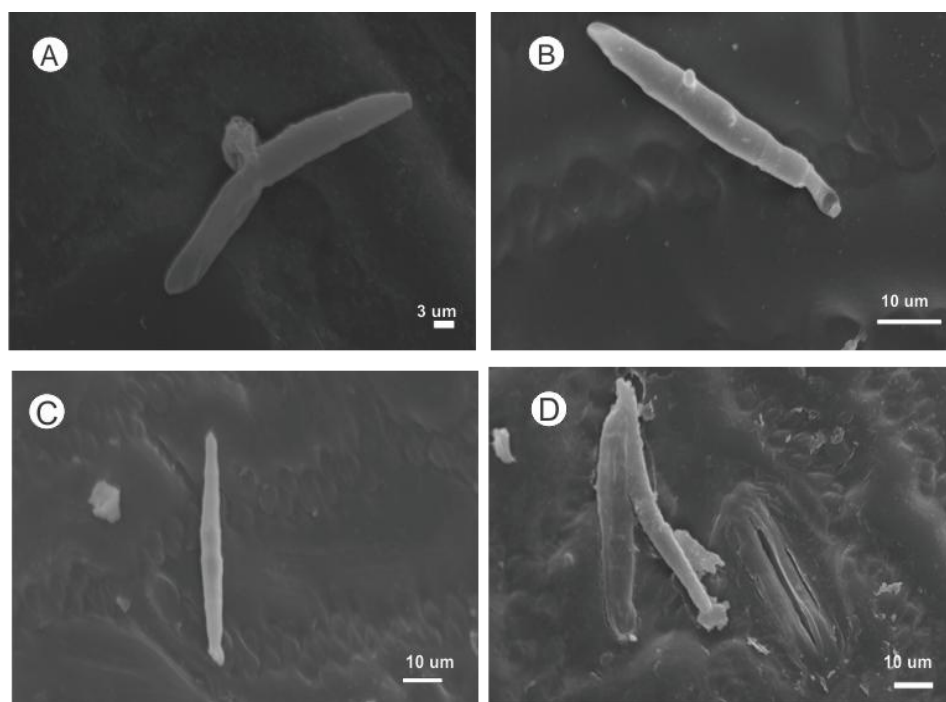


Figura 9 Eletromicrografia de varredura da formação de apressórios em *Cercospora zea-maydis* sobre folhas de milho

Em relação ao estudo de IVCM houve interação significativa ao nível de 5% de probabilidade entre meios de cultura e tipos de cultura fúngicas (conídios e micélio). Quando foram utilizados conídios para inoculação em diferentes

meios foram observados maiores IVCM ou não apresentaram diferenças estatísticas entre os tipos de culturas fungicas, exceto no MA para a espécie de *C. sorghi* f. sp. *maydis* e BDA para *C. zeina*; os meios MA e BDA foram os melhores quando se utilizou micélio de *C. sorghi* f.sp.*maydis* e *C. zeina*, respectivamente.

O fato dos conídios produzirem colônias com maiores IVCM que em micélio é, provavelmente, em razão da massa de conídios que começa a germinar, e, posteriormente, forma o micélio, enquanto na técnica micelial, não há conídios e o micélio tem que se adaptar às condições submetidas.

As características das colônias das espécies de cercospora do milho em meio de cultura não diferem entre si, exceto em meio AO, onde o micélio caracteriza-se por ser esparso com margens lisas, mas irregulares, branco-acinzentado e pelo IVCM, o qual é menor na *C. zeina*, fato que pode ser observado quando se compara o diâmetro das colônias.

O meio STT proporciona, numericamente, menor crescimento em todas as espécies, pois, se trata de um meio com maior riqueza nutricional (Brunelli et al., 2006), contendo vitaminas, aminoácidos e outros nutrientes, que estimulam a produção de esporos, a qual se inicia pelas bordas das colônias, e inibe o crescimento micelial.

Enquanto meios que contêm uma alta concentração de carboidratos simples, como a glicose, que é uma molécula prontamente utilizável, como BDA, AO, e MA cuja fonte de carbono estimula o crescimento micelial (Moore-Landecker, 1972; Carlile & Watkinson, 1994), porém, vários outros açúcares podem ser aproveitados, por exemplo, o amido, o qual foi a fonte de carbono que proporcionou crescimento mais rápido em *A. brassicae* e *A. raphani* (Taber et al., 1968). Glicose, manitol e sacarose foram as melhores fontes de carbono para crescimento e esporulação de *Verticillium fungicola* (Coetzee & Eicker, 1991).

O meio MA promove grande crescimento micelial assim como BDA, por apresentar composição nutricional similar, mas com menores quantidades de glicose. Faleiro et al. (2004) observaram que *Crinipellis pernicioso* produziu maiores quantidades de micélio em ambos os meios.

Tais relatos explicam os maiores IVCM observados nesses meios de cultura e o AO e o BDA apresentaram maiores IVCM.

No entanto, o meio AO é utilizado para induzir a esporulação em muitos fungos fitopagênicos como, *Magnaporthe grisea*, mas também pode proporcionar maior crescimento micelial como foi observado em *Verticillium lecanii*, pois, este meio é considerado rico em minerais como: P, Ca, Fe, Na e vitaminas do complexo B, o que auxiliam em ambos os processos.

Orrego et al. (1996) verificaram que o meio de aveia adicionado com 2% de dextrose, induziu maior crescimento micelial do fungo *Cylindrocladium* sp, mas o micélio foi considerado ralo quando comparado com os demais meios. No caso das espécies de *Cercospora* do milho, as colônias em aveia também apresentam características diferenciadas. As colônias que geralmente são densas e erumpentes tornam-se esparsas, de aspecto cotonosos quando cultivadas em meio AO.

Com as características morfológicas das colônias e do fungo, juntamente com o IVCM, é possível diferenciar as 3 espécies de *Cercospora*. No entanto, o uso dos *primers* específicos CZ e CZM foi eficiente na identificação das espécies. Portanto, o uso de *primers* específicos é uma ferramenta viável e precisa para identificação das espécies de *Cercospora* do milho.

Desta forma, para as espécies de *Cercospora* do milho não existe um meio de cultura melhor a todas. Cada meio propicia um IVCM em função do tipo de cultura fúngica usada, sendo assim, o melhor tipo de cultura para se obter maior IVCM dependerá do meio de cultura a ser utilizado e da espécie de

Cercospora do milho. No entanto, em STT o crescimento é bem mais lento quando comparado com os demais.

Tabela 3 Índice de crescimento micelial (IVCM) em milímetros (mm) das espécies de cercospora do milho: *Cercospora zea-maydis*, *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* e *Cercospora-zeina* em meios BDA (Batata-Dextrose Agar), STT (Suco de Tomate Temperado), MA (Malte) e AO (Aveia), com dois tipos de culturas fungicas (conídios e micélio)

Espécies de Cercospora		Diâmetro das colônia (mm)	
<i>Cercospora zea-maydis</i>	Meios de cultura	Conídios	Micélio
	BDA	11,35 aA	2,62 bB
	SST	2,26 dA	3,06 bA
	MA	3,89 cA	3,48 bA
	AO	6,17 bA	5,47 aA
CV = 16,93%			
<i>Cercospora sorghi</i> f. sp. <i>maydis</i>	Meios de cultura	Conídios	Micélio
	BDA	4,84 bA	4,40 bA
	SST	4,43 bA	3,62 bB
	MA	4,46 bB	5,74 aA
	AO	5,49 aA	5,07 aA
CV = 14,01%			
<i>Cercospora-zeina</i>	Meios de cultura	Conídios	Micélio
	BDA	1,25 bB	2,03 bA
	SST	1,18 bA	1,27 cA
	MA	2,91 aA	1,32 cB
	AO	3,19 aA	2,85 aA
CV = 27,34%			

Meios de cultura: BDA (Batata Dextrose Agar), STT (Suco de tomate tempedado), MA (Malte) e Aveia (AO). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, a de 5% de probabilidade

Identificação molecular das espécies de *Cercospora* do milho

Dos 27 isolados de *Cercospora* patogênicas ao milho, 12 (IN-4, IN-5, IN-6, LV-23, PT-27, BA-150, LA-156, LV-162, BA-165, PA-166, MC-168,

MC-171) tiveram os fragmentos amplificados em 310 pb quando se utilizou o *primer* específico CZ, mostrando que estes isolados pertencem à espécie *Cercospora zeina* (Figura 10). Enquanto os outros 15 isolados (IN-3, LV-24, IP-30, IP-31, LV-33, PA-69, PA-70, PA77, PA-80, PA-87, PA-92, PA-122, PA-131, PA-149 e BA-164) apresentaram amplificação com 310 pb quando utilizou o *primer* CZM confirmando ser a espécie *C. maydis* (Figura 11). O isolado que não houve amplificação de nenhum fragmento quando se utilizaram os *primers* específicos CZ e CZM, foi considerado como sendo da terceira espécie de *Cercospora*, *C. sorghi* f. sp. *maydis*.

Os resultados de identificação morfológica foram concordantes com a identificação das espécies utilizando os *primers* específicos. Portanto, o uso de *primers* específicos é uma ferramenta viável e precisa para identificação das espécies de *Cercospora* do milho.



Figura 10 Produto da amplificação de PCR usando *primers* CZ (5'-GCG ACC CTG CCG TTT -3' e 5'-CTC AGC CGG AGA CTT CG -3') e CZM (Czm forward: 5'-GCG ACC CTG CCG TTC -3' e 5'-AGC TCA GCC GGA GAC TTT A -3') em isolados de *Cercospora zeina-maydis* (1-12), *Cercospora zea-maydis* (13-24) e *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis* (25). (M) Marcador com 100 pb



Figura 11 Produto da amplificação de PCR usando *primers* CZ (5'-GCG ACC CTG CCG TTT -3' e 5'-CTC AGC CGG AGA CTT CG -3') e CZM (Czm forward: 5'-GCG ACC CTG CCG TTC -3' e 5'-AGC TCA GCC GGA GAC TTT A -3') em isolados de *Cercospora zea-maydis* (1-15), *Cercospora zeina* (16-30) e *Cercospora sorghi* f.sp. *maydis* (31). (M) Marcador com 100 pb

Sendo assim, é possível concluir que, em Minas Gerais, há 3 espécies de *Cercospora* que se diferenciam morfológicamente, sendo possível identifica-las utilizando os *primers* específicos CZ e CZM, os quais foram validados e podem ser utilizados para a correta identificação de espécies de *Cercospora* do milho e que a escolha do melhor tipo de cultura fúngica para se obter o melhor IVCM dependerá do meio de cultura e da espécie de *Cercospora* do milho a ser utilizada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo auxílio financeiro projeto de pesquisa CAG-APQ 01719-08 e apoio à manutenção de grandes equipamentos LME/UFLA - APQ 02715-09) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brito AH, Von Pinho RG, Pozza EA, Pereira JLAR & Faria Filho EM (2007) Efeito da Cercosporiose no rendimento de híbridos comerciais de milho. *Fitopatologia Brasileira*, Lavras, 32: 472 – 479.
- Brunelli KR, Fazza AC; Athayde Sobrinho C; Camargo LEA (2006) . Efeito do meio de cultura e regime de luz para esporulação de *Cercospora zae-maydis*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu - SP, 32:92-94
- Carlile, MJ, Watkinson SC (1994). *The fungi*. 1st. San Diego: Academic Press Ltd
- Carson ML, Goodman MM (2006) Pathogenicity, aggressiveness, and virulence of three species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. *Maydica* 51:89-92.

Chupp C (1953). A monograph of the fungus genus *Cercospora*. New York: The Ronald Press, 667.

Coetzee JC; Eicker A (1991) The effect of nutritional and environmental factors on the growth and sporulation of a Southern African isolate of *Verticillium fungicola*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13. Dublin. Proceedings Dublin: Balkema, 2:417-424.

Conab-Milho. Safra 2010-2011. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011.pdf

Crous PW, Groenewald JZ, Groenewald M, Caldwell P, Braun U, Harrington; TC (2006) Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. *Studies in mycology*, 55:189–197.

Daub ME, Chung KR (2007) Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. Acesso em :12/03/2007. Online: <http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin/2007>

Dean CRA (1997) Signal Pathways and Appressorium Morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 35 : 211-234.

Faleiro FG, Niella GR, Cerqueira ARR, Damaceno VO, Gomes LMC, Faleiro ASG (2004) Produção de micélio de *Crinipellis pernicioso* em quatro diferentes meios de cultura, visando extração de DNA. *Fitopatologia Brasileira* 29:312-315.

Fernandez FA, Glawe DA, Sinclair JB (1991). Microcycle conidiation and nuclear behavior during conidiogenesis in *Cercosporakichii*. *Mycologia* 83:752-757.

Hanlin RT (1994). Microcycle conidiation—A review. *Mycoscience* 35:113-123

IBGE –Milho. Safra 2010-2011. http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia = 1798&id_pagina=1.

Latterell FM; Rossi (1983) A. Gray leaf spot of corn: a disease on the move. *Plant Disease*, 67:842-847.

Lapaire CL, Dunkle LD (2003) Microcycle conidiation in *Cercospora zeae-maydis*. *Phytopathology*. 93:193–199.

Lipps PE (1987) Gray leaf spot epiphytotic in Ohio corn. *Plant Disease*; 71: 281, 1987.

Maguire JD (1962) Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2:176-177.

Mangenot F, Reisinger O (1976) Form and function of conidia as related to their development. In: *The fungal spore. Form and Function*, (ed. by Weber, D. J. and Hess, W.H.). 789-847..York.

Moore-Landecker E (1972) *Fundamentals of the Fungi*. London. Prentice-Hall.

Nagel CM (1934) Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. *Phytopathology* 24 : 1101-1110.

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

Orrego Fuente AL, Menezes M, Oliveira SMA, Coelho RSB (1996) Análise comparativa de caracteres patogênicos e fisio-morfológicos para identificação de espécies de *Cylindrocladium*. *Summa Phytopathologica*. v.22, p.127-133.

Rossier C, Ton-That T C, Turian G (1977) Microcyclic microconidiation in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycologia* 1:52-62.

Rotem J, Bashi E (1969) Induction of sporulation of *Alternaria porri* f. sp. *solani* by inhibition of its vegetative development. *Trans. Br.Mycology Society* 53:433-439.

Smith DH (1971) A simple method for producing *Cercospora arachidicola* conidial inoculum. *Phytopathology*, 61:1414.

Taber, RA, Vantekpoo TC, Taber WA . 1968. A comparative nutritional study of *Alternaria raphani*, *A brassicae*, and *A brassicicola* with special reference to *A. raphani*. *Phytopathology*, v.58, p.607 - 616.

Stavely JR, Nimmo JA (1969) Relation of pH and nutrition to growth and

sporulation of *Cercospora nicotinae*. *Phytopathology*, 58:1372-1376.

Thorson PR, Martinson CA (1993) Development and survival of *Cercospora zae-maydis* germings in different relative humidity environments. *Phytopathology*, St. Paul, 83:153 – 157.

Wang J, Levy M; Dunkle LD (1998). Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. *Phytopathology*,88:1269-1275.

Ward JMJ, Nowell DC (1998) Integrated management for the control of maize gray leaf spot. *Integrated Pest Management Reviews*, 3:1-12.

ARTIGO 2

**Esporulação das espécies de *Cercospora* do milho *in vitro* e em sementes de
sorgo**

Artigo em fase de submissão à Ciência Agrotecnologia

Érika Sayuri Maneti Koshikumo, Eduardo Alves, Hilário Antônio de Castro,
Renzo Garcia Von Pinho

RESUMO

O gênero *Cercospora* apresenta alto potencial de esporulação nas folhagens do hospedeiro, mas *in vitro* apresenta crescimento lento e reduzida esporulação. O trabalho objetiva averiguar se o método de transferência de esporos e de secagem micelial são eficientes para a esporulação das espécies de *Cercospora* patogênicas do milho e quais são as condições ótimas para obter a máxima esporulação, assim como conhecer qual é a melhor cultura fungica para se obter o maior número de esporos/semente de sorgo. Para tanto, na secagem micelial foram utilizados os meios: BDA (Batata-Dextrose Agar), STT (Suco de Tomate Temperado), MA (Malte) e Folha de Milho cozida (FM), em DIC com 5 repetições. Os dados foram analisados utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram estudados intervalos de 24 a 168 horas, com 6 repetições, em DIC com análise de Regressão. Na transferência de esporos usou-se os meios de Malte (MA), Batata-Dextrose- Agar (BDA), Suco de Vegetais, V8[®] Campbell Soup Company (V8), Aveia (AO) e (STT); a 27 °C, sob 3 fotoperíodos, 6 repetições, fatorial 3x5. Os dados foram analisados com Scott-knott a 5% de probabilidade. Oito frascos com sementes de sorgo foram inoculados com diferentes culturas fúngicas e mantidos a 27 °C com fotoperíodo de 12 horas. Foi utilizado DIC e teste de tukey a 5% de probabilidade. Na secagem micelial o melhor meio foi STT com 168 horas de agitação para *Cercospora zeina* e *Cercospora zea-maydis*, enquanto para o outro método cada espécie exige uma condição ótima para esporular. As sementes de sorgo inoculadas com conídios foram as que apresentaram maiores número de conídios. Conclui-se que ambos os métodos de esporulação foram viáveis e que sementes de sorgo inoculadas com apenas conídios proporciona maior número de conídios/semente, aumentando a probabilidade de sucesso de inoculação das plantas.

Palavras-chave: indução de esporulação em fungos, doenças do milho, cercosporiose

ABSTRACT

The *Cercospora* genus has high sporulation on the leaves; however in artificial conditions it presents slow growth and produces few spores. The objective of this work is to investigate if the methods of transferring spores and the drying mycelium are efficient for *Cercospora* species of producing the maximal sporulation and what optical conditions to obtain the maximal sporulation, and to know which fungal culture is better to obtain high number of conidia/seed. We used the media: PDA (Potato-Dextrose Agar), STT (Tomato Juice), MA (Malt) e Leaf of corn (FM), in the drying mycelia in CDR with 5 repetitions. The dates were analyzed using Tukey test with 5 % of probability. To analyze what the best period is, the liquid media with mycelium were tested in different time intervals: from 24 to 168 hours. We used 6 repetitions, in CRD with Regression analyses. In the other method, 6 repetitions were used in 5 media: Malt (MA), Potato-Dextrose- Agar (PDA), Vegetable juice, V8® Campbell Soup Company (V8), Oat (AO) e Tomato Juice (STT). They were submitted at 27 °C in 3 photoperiods, 6 repetitions, factorial 3x5. The dates were analyzed using Scott-knott test with 5% of probability. Eight flasks with sorghum seeds were inoculated with different fungi culture and keep at 27 °C under photoperiod of 12 h. It was analyzed in CDR, Tukey test with 5 % of probability. In the drying mycelia, the best medium was STT at 168 hours under shaking. In the other method, *C. zea-maydis* needed 12h darkness in the media STT and V8. *C. zeina* had high sporulation under the photoperiod of 12h in STT or darkness in STT and V8. Under constant light, the fungus produced a lot of conidiophores and few spores. We concluded that both of the methods are viable to produce spores in the *Cercospora* species of maize. The best media were STT and V8, and the best conditions were: the maximum time under shaking and photoperiod of 12 h and darkness. The sorghum seeds inoculated with conidia had high quantity of conidia. This way, we conclude that both the methods of sporulation were viable and that seeds sorghum with only conidia produce high number of conidia/seed, what increase the probability of success of inoculation in the plants.

Keywords: fungi sporulation, maize disease, Gray Leaf Spot of Mayze.

INTRODUÇÃO

A cercosporiose é uma das doenças mais importantes do milho por causar grande redução na produtividade (Fantin et al., 2001). Os sintomas aparecem em toda área foliar, ocorrendo geralmente nas folhas baixas, caracterizando-se pelo aspecto linear-retangular das lesões que são geralmente delimitadas pelas nervuras, de coloração acinzentada em virtude da alta produção de esporos (White, 2000).

A dificuldade de identificar essa doença no campo se deve ao fato da maioria das doenças do milho ocorrer após o pendoamento, sendo assim, os sintomas de diversas doenças coalescem dificultando não apenas o diagnóstico como também o isolamento do fungo para obtenção de cultura monospórica.

Os agentes causais dessa doença são o *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora zeina* (Crous et al., 2006) e das lesões é frequentemente encontrado *C. sorghi* f. sp. *maydis*. No Brasil existem as 3 espécies de *Cercospora*, que se diferenciam basicamente quanto à morfologia, produção de Cercosporina, agressividade e taxa crescimento micelial *in vitro*.

De uma forma geral, o gênero *Cercospora* apresenta alto potencial de esporulação nas folhagens do hospedeiro (Jenco & Nutter, 1992), mas em condições *in vitro* apresenta crescimento lento e reduzida esporulação (Nagel, 1934). Motivo que dificulta investigações científicas com este gênero de fungo.

Diversos autores já constataram que diferentes fatores podem alterar a produção de esporos, tais como: luz, meio de cultura, temperatura, tempo de exposição a esses fatores e o tipo de cultura fúngica a ser plaqueado.

Brunelli et al.(2006) obtiveram melhores resultados de esporulação para *Cercospora zea-maydis* em meio Suco de Tomate Temperado e V8, sob fotoperíodo de 12 h. Castro & Coêlho (2000) verificaram que a produção dos conídios do *Cercospora cruenta* começou no 5º dia, ocorrendo o pico de

esporulação no 8º dia de incubação sob regime de luz contínua em meio Cenoura-Dextrose-Ágar. Além desses fatores, o tipo de cultura fúngica a ser plaqueado influencia diretamente na produção de esporos. Vathakos & Walters (1979) observaram que ao transferirem apenas conídios de *Cercospora kikuchii* a quantidade de conídios produzidos era superior àquelas culturas que foram transferidas apenas micélio. Resultado semelhante foi observado por Nagel (1934) e Calpouzos (1955).

Além dos fatores citados, há técnicas que visam estressar o fungo para a obtenção de conídios, por meio de injúrias na colônia, como é o caso da secagem de massa micelial, maceração ou raspagem de micélio e uso de luz ultravioleta. No entanto, existem poucos estudos envolvendo estas técnicas em *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora zeina*.

Os conídios são essenciais para condução de diversos experimentos em fitopatologia, principalmente na inoculação de plantas. A eficiência da inoculação depende de vários fatores, tais como: patogenicidade, agressividade e virulência; idade das colônias; viabilidade do inóculo; presença de nutrientes na suspensão de inóculo; meios de cultura; estágio fenológico da planta; condicionamento das plantas antes e após a inoculação; condições hídricas e nutricionais da planta; portas de entrada e concentração de inóculo (Alfenas e Maffia; 2007).

A produção de inóculo, conídios, por espécies de cercospora, pode ser obtida mantendo a cultura em meio de cultura V8 ou STT sob fotoperíodo de 12 horas a 27 °C (Brunelli et al., 2006), pelo processo de transferência de esporos (Sistema Patted) e por meio de secagem de massa micelial. No entanto, os tempos de incubação de cada método para se obter a máxima esporulação e o tipo de cultura fúngica diferenciam em cada metodologia. Na primeira, o micélio é incubado sob as condições citadas até a produção de conídios, período que varia de 15 a 25 dias. Enquanto na segunda, a produção de conídios ocorre de 4

a 6 dias. Este processo consiste na produção de esporos sem a fase de crescimento vegetativo, ou seja, um conídio germina gerando outro, sem a presença de micélio (Hanlin; 1994). Este é um mecanismo de sobrevivência quando as condições para o crescimento vegetativo são desfavoráveis (Lapaire & Dunkle, 2002). Na terceira, fragmentos miceliais em meio líquido V8 ou STT são expostos ao ar a 25 °C sob fotoperíodo, até a secagem micelial.

Para inocular *Cercospora* em milho são frequentemente utilizadas sementes de sorgo, no entanto, neste método menciona-se o número de sementes de sorgo e não o de conídios, os quais em baixa ou em excessiva concentração podem acarretar insucesso da inoculação.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo averiguar se os métodos de transferência de esporos e de estresse micelial são eficientes para a esporulação das espécies de *Cercospora zeina* e *Cercospora zae-maydis* e analisar o melhor tipo de cultura fungica, ou seja, aquela capaz de produzir e/ou manter o maior número de esporos de *C. zae-maydis* por sementes de sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das culturas fúngicas e isolados utilizados

Folhas sintomáticas foram colocadas em câmara úmida por 24 horas sem lavagem prévia. Posteriormente, conídios foram coletados das lesões e dispersos em meio BDA (Batata Dextrose Ágar - 200g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de Ágar), após a formação de colônias típicas do gênero *Cercospora*, as mesmas foram transferidas para meio STT (Suco de Tomate Temperado) e mantidas a 27 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Foram utilizados os isolados PA-92 (*Cercospora zae-maydis*) e BA-150 (*Cercospora zeina*), provenientes de Paracatu e Bambuí, respectivamente, obtidos em trabalho realizado previamente.

Produção de esporos

Para obtenção dos conídios foram utilizados dois métodos de esporulação; por meio de secagem de massa micelial e por conidiação microcíclica.

Método de transferência de esporos

Esta técnica consiste em produzir esporos sem a fase de crescimento vegetativo. Para tanto, as colônias foram transferidas periodicamente para outro meio STT, de 4 em 4 dias para *C. zea-maydis* e de 6 em 6 dias para *C. zeina*.

Foram utilizados 5 meios de cultura: Malte (MA), BDA, STT; Suco de Vegetais, V8® Campbell Soup Company (V8), Aveia (AO), sob 3 regimes de luz: 0, 12 e 24 horas de luz.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 6 repetições, fatorial 3x5. Foi utilizado o teste de média Scott-knott com transformação $x^{1/2}$ para a *Cercospora zea-maydis*. Para análise dos dados foi utilizado o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

Método de secagem de massa micelial

A técnica de secagem de massa micelial desenvolvida por Walker (1980) modificada por Nechet et al. (2006) e Souza et al. (2005): para isto transferiram-se três discos de micélio (0,5cm de diâmetro), retirados das bordas das colônias em placas de Petri, para 10 mL de meio líquido, em Erlenmeyers de 25 mL, que permaneceram sob agitação contínua a 120 rpm, a 25 °C aproximadamente. Após 4 dias, verteu-se o conteúdo de cada Erlenmeyer em ágar-água, em três placas de Petri, as quais permaneceram abertas até a secagem do meio de cultura, a 40 cm de distância de lâmpadas fluorescentes brancas de

40W, Sylvania[®], intercaladas com lâmpadas grow lux de 40W, Sylvania[®], intensidade luminosa de $165,3 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, com fotoperíodo de 12h, a 25 °C .

Com a finalidade de saber qual é o melhor meio para se obter a esporulação neste método foram testados 4 meios de cultura em estado líquido: BDA, STT, MA e Folha de Milho cozida (FM). Neste último foram utilizados 200 gramas de folhas de milho saudáveis que foram cozidos em 800 gramas de água. Para cada tratamento tiveram 5 repetições e a quantificação de esporos foi feita em Câmara de Neubauer. O teste de médias utilizado foi Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

Posteriormente, para analisar qual é o melhor tempo de exposição ao fungo sob agitação de 120 rpm, foram analisados diferentes tempos de exposição no agitador 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas, no meio STT.

A parcela experimental compreendeu uma placa de Petri, na qual foram colocados 10 mL Tween 0,01% e foi utilizada uma alça de Drigalsky para liberação dos conídios.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) e os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e análise de regressão a 5% de probabilidade com 6 repetições no programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

Inoculações das sementes de sorgo

Foi utilizado o isolado monospórico PA-92 proveniente de Paracatu/Minas Gerais. A produção de conídios foi por transferência de conídios, onde as colônias foram cultivadas em meio Suco de Tomate Temperado (200 mL de suco de tomate temperado “Super bom”; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO_3 e 800 mL de água destilada) e as colônias foram transferidas periodicamente, de 4 em 4 dias.

As colônias provenientes da transferência de esporos foram incubadas por 4 dias e as contendo micélio e conídios por 20 dias a 27 °C sob fotoperíodo.

Foram inoculados 8 frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 g de sementes de sorgo cv. CMSF 004 da Embrapa, previamente autoclavadas com 16 mL de água destilada com três diferentes tipos de inóculo. O primeiro com 1 mL de suspensão de esporos (10^5 esporos mL^{-1}), o segundo com micélio e conídios com 30 dias após a inoculação e terceiro com apenas conídios provenientes de transferência de esporos pelo Sistema Patted em STT. Para estes últimos foram colocados 5 discos de 0,5 cm de diâmetro em cada frasco. Após 15 dias sob condições controladas de 27 °C e fotoperíodo, 10 sementes de todos os frascos foram escolhidas aleatoriamente e cada uma foi colocada em agitação com 0,5 mL de água destilada e esterilizadas.

A concentração dos conídios (conídios/mL) foi determinada por meio de leituras em câmara de Neubauer.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa Sisvar (Ferreira, 2000).

Preparação de amostras para microscopia Eletrônica de Varredura

As sementes de sorgo com 15 dias após a inoculação (d.a.i.) foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 500 μL de solução fixadora de Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M - pH 7,2 e CaCl_2 0,001M) por um período de no mínimo 24 horas e armazenadas a 4 °C. Após este período de fixação, as amostras foram imersas em tampão cacodilato por 3 vezes de 10 minutos em cada imersão e após este processo foi transferido para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavadas em água destilada por 3 vezes e subsequentemente desidratadas em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100% por três vezes). Posteriormente foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO_2 e

complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para serem observados em MEV LEO EVO 40 XVP. As imagens geradas foram registradas e gravadas digitalmente, com posterior aprimoramento das mesmas no Software Photopaint do Corel Draw 12.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Técnica de secagem de massa micelial

Foi observado que o STT proporciona maior esporulação que os demais meios, com média de $1,40 \times 10^5$ conídios/mL, seguido do MA, FM e BDA, com média de $1,79 \times 10^4$ conídios/mL, $1,17 \times 10^5$ conídios/mL e $3,95 \times 10^3$ conídios/mL (Tabela 1). À medida que o meio líquido e a água são reduzidos é iniciado o processo de esporulação (Figura 1)

O melhor tempo de exposição dos micélios dos patógenos das espécies de *Cercospora* do milho a agitação foi a 168 horas e a equação que melhor ajustou foi a linear para *C. zeina*: $y = 241,38x - 525,57$, com $R^2 = 0,9135$, enquanto para *C. zea-maydis* foi a quadrática $y = 0,6407x^2 - 105,06x + 5519,1$ com $R^2 = 0,7353$, ou seja, para *C. zeina*, quanto maior o tempo de fragmentação do micélio, maior é a esporulação, enquanto para o *C. zea-maydis* a esporulação apresentou incremento a partir de 96 horas (Figura2).

Tabela 1 Esporulação de *Cercospora zae-maydis* em diferentes meios de cultura com a técnica de secagem micelial

Meios de cultura *	Esporulação (conídios /mL)
STT	1,40 x10 ⁵ a
MA	1,79 x 10 ⁴ b
FM	1,17 x10 ⁴ b
BDA	3,95 x 10 ³ b

Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05). *STT (Suco de Tomate Tempedado), MA (Malte), FM (Meio Folha de milho e BDA (Batata Dextrose Agar)

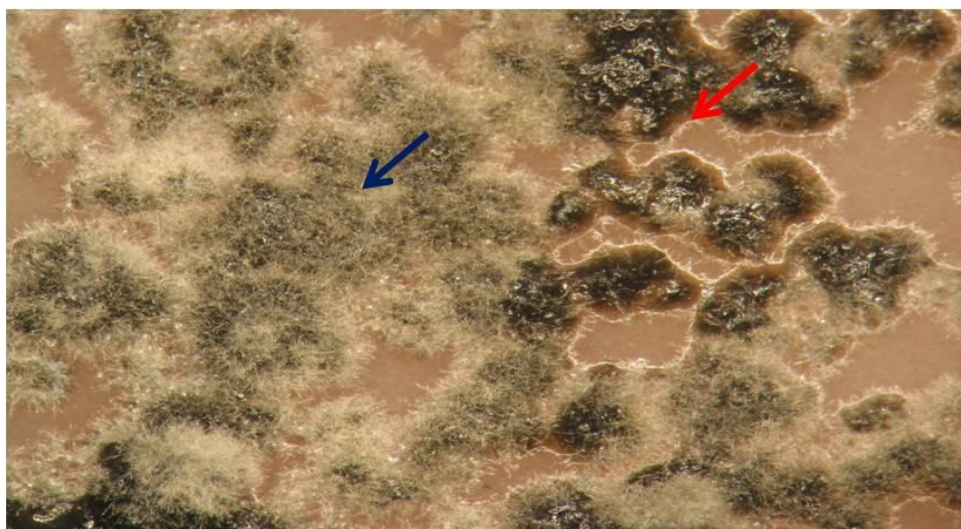
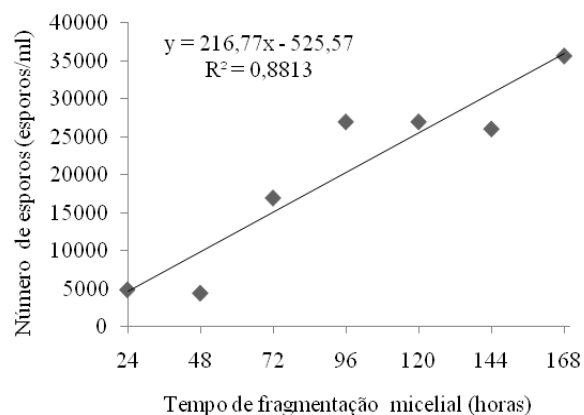


Figura 1 Esteriomicrografia da esporulação de *Cercospora zae-maydis*. Seta vermelha: Início de esporulação, área úmida. Seta azul: Alta esporulação, área seca

Ávila e Pitelli (2004) utilizando-se de técnica semelhante observaram que o melhor tempo de esporulação para *Cercospora piaropi* foi 120 horas a 150 rpm com o meio V8.

Produção de esporos de *Cercospora zeina* pelo método de Secagem Micelal



Produção de esporos de *Cercospora zea-maydis* pela técnica de Secagem Micelal.

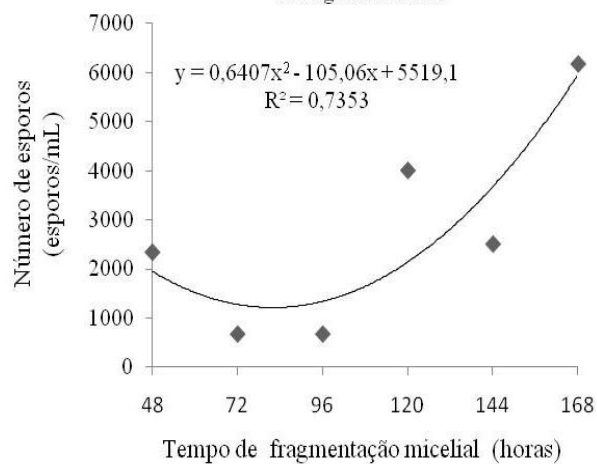


Figura 2 Efeito da fragmentação micelal por agitação na esporulação de *Cercospora zeina* e *Cercospora zea-maydis*

Com esta técnica também foi possível observar esporulação em *C. sorghi* f. sp. *maydis*, apesar do número de esporos não ter sido quantificado (Figura 3).

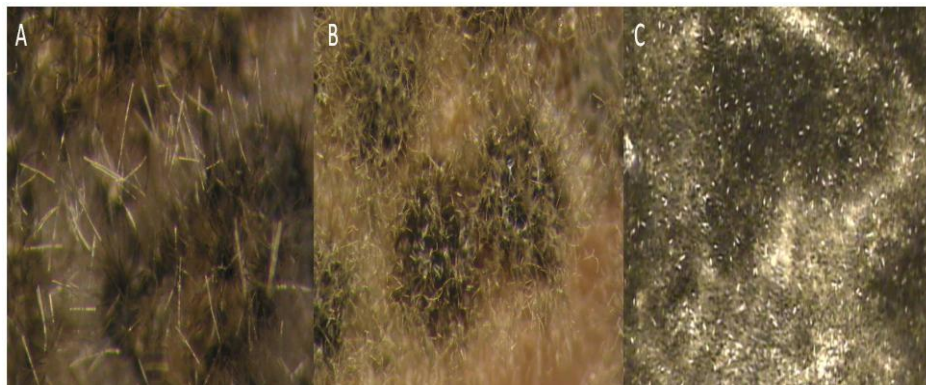


Figura 3 Esteriomicrografias dos esporos de *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* (A), *Cercospora zae-maydis* (B), e *Cercospora zeina* sobre o meio ágar- água

Pelo método de secagem de massa micelial o meio STT foi o que mais produziu esporos em *C. zae-maydis*. No caso das espécies estudadas, colônias sob condições de meio ambiente pode ter a esporulação iniciada normalmente entre: 10-30 dias dependendo do isolado. No entanto, há isolados que não esporulam naturalmente, sendo assim, esta técnica constitui uma estratégia eficaz para induzir a esporulação, pois, a exaustão de nutrientes do meio de cultura conduz muitos fungos à produção de esporos.

Portanto, é uma técnica considerada drástica, pois, a formação de esporos ocorre em razão de uma sequência de estresses que o patógeno sofre, sem a morte do mesmo. Primeiramente o micélio permanece em agitação por 4 dias, o que proporciona fragmentação micelial, posteriormente, esses fragmentos miceliais no meio STT líquido são colocados sob uma fina lâmina de ágar-água, desta forma, o meio de cultura líquido que é fonte de nutrientes diminui

lentamente, uma vez o nutriente exaurido, a lâmina de água-ágar, fornece água e alguns poucos minerais presentes no ágar como: P, Fe, K, Cl, I e Ca, o que causa estresse por diminuição de água e nutrientes lentamente sem matar o fungo, proporcionando conseqüentemente a esporulação. Desta forma, este método torna-se uma alternativa viável que pode ser utilizada em fungos difíceis de esporular.

Para ambas as espécies o melhor tempo de fragmentação micelial para se obter a máxima esporulação foi 168 h, no entanto, o comportamento das espécies foi diferente. Um fator que deve ter contribuído para a diferença de comportamento, ou seja, número de esporos e início da esporulação deve-se ao fato do isolado de *C. zeina* ter sido mais jovem, o que pode ter promovido melhor respostas aos estresses submetidos, apresentando esporulações em todos os tempos testados, enquanto *C. zea-maydis* apenas iniciou a esporulação às 48 horas, ocorrendo aumento de esporulação após 96 horas de fragmentação micelial.

Outro importante ponto a ressaltar nesta técnica é que o número de esporos varia de acordo com a quantidade de micélio colocado em cada placa de Petri, desta forma, o número de esporos por parcela pode apresentar alta variação.

De acordo com os dados apresentados, é possível concluir que pela técnica de secagem de massa micelial é melhor utilizar o meio STT com o tempo de fragmentação de 168 horas em agitação a 120 rpm a 25 °C para se obter maior número de esporos.

Técnica de Transferência de Esporos

Quando se transfere apenas esporos de *C. zea-maydis* produz mais conídios nos meios V8 e STT sob condições de fotoperíodo de 12 horas e em ausência de luz em 4 dias. Sob fotoperíodo de 12 horas o fungo produziu em

meio V8 e STT, $3,47 \times 10^5$ e $1,33 \times 10^5$ conídios/mL, respectivamente, em uma área de 12 cm^2 de meio de cultura, enquanto na ausência de luz, a esporulação foi de $2,61 \times 10^5$ e $2,17 \times 10^5$ conídios/mL, nos respectivos meios. Ressaltando que houve interação significativa entre meios de cultura e regimes de luz ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 1).

As melhores condições de esporulação em 6 dias para *C. zeina* foi o meio STT em fotoperíodo de 12 horas e meio V8 ($5,25 \times 10^5$ conídios/mL) e sob ausência de luz no meio STT ($5,18 \times 10^5$ conídios/mL). Enquanto para ambos os patógenos o regime de luz contínua foi o que menos produziu conídios para todos os meios, exceto para o meio MA, o qual não apresentou diferenças estatísticas entre os fotoperíodos para induzir a esporulação em ambos os patógenos, embora numericamente sejam menores.

Sob luz contínua foi possível observar grande produção de conidióforo, mas pouco conídio, isto também foi observado por Beckman & Payne (1983), os quais também notaram os mesmos efeitos da luz constante sob a produção de conídios. Esta é drasticamente reduzida nestas condições, assim como a germinação e o crescimento micelial, apesar desses autores terem usado suspensão de conídios e não conídios transferidos.

Em relação ao método de transferência de esporos, foi obtido esporulação máxima das espécies de cercospora do milho no meio STT e V8, sob fotoperíodo de 12 horas e/ou ausência de luz. Kilpatrick e Johnson (1956) observaram que o melhor regime de luz para esporular diversas espécies de cercospora foi 12 horas, no entanto, em *Cercospora arachidicola* a máxima esporulação ocorreu em luz contínua (Moraes & Salgado, 1978), ou seja, ocorreu o oposto das espécies de cercospora do milho, o que evidencia a importância de se conhecer cada espécie, não sendo possível generalizar as condições para um mesmo gênero de fungo.

Crous et al. 2006 utilizaram luz contínua para esporular *C. zeina* e *C. zea-maydis*, enquanto Brunelli et al. 2006 concluíram que os melhores meios para obter a máxima esporulação em 9 dias foram STT e V8, sob fotoperíodo de 12 horas, utilizando inicialmente suspensão de conídios para fazer estudos de esporulação em *C. zea-maydis*. Beckman & Payne (1983) estudaram o mesmo patógeno com suspensão de esporos, mas com tempo de incubação de 14 dias, e, concluíram que o melhor meio para esporular o *C. zea-maydis* foi o V8 e meios provenientes de folhagens de milho, enquanto o BDA foi o que apresentou a menor esporulação.

Como mencionado anteriormente, alguns meios induzem o crescimento micelial, enquanto outros a esporulação e a esporulação depende de um conjunto de fatores, tais como condições submetidas ao fungo, os nutrientes contidos no meio, e não apenas das espécies propriamente dita, como também do isolado. Yeh & Sinclair (1980) observaram que isolados de *Cercospora kikuchii* apresentam variações na produção de esporos de acordo com o meio utilizado.

O método de secagem de massa micelial exige o uso maior de utensílios e equipamentos, como: placas de Petri, erlenmeyer, mesa agitadora e câmara de crescimento. Enquanto, quando se transfere esporos apenas é necessário placa de Petri e incubadora. Há, também, maior probabilidade de contaminação no primeiro método, inclusive propiciando crescimento de bactérias, uma vez que as placas ficam abertas e o meio úmido com temperatura de 25-27 °C torna-se ambiente favorável a outros micro-organismos.

O uso do primeiro método torna-se mais adequado quando não há necessidade de trabalhar com volume grande de suspensão de esporos.

No entanto, ambos são eficientes para induzir a esporulação nas espécies de *Cercospora* do milho, a escolha do melhor método dependerá do objetivo do estudo.

Tabela 1 Números médios de conídios/mL de *Cercospora zea-maydis* e *Cercospora-zeina* em uma área de 12 cm² em diferentes meios de cultura e regimes de luz quando se transefem esporos.

Espécies de <i>Cercospora</i>	Meios de cultura	Fotoperíodos		
		Luz contínua	12/12 h	Ausência de luz
<i>Cercospora zea-maydis</i>		Números médios de conídios/mL		
	BDA	5,20 x 10 ³ aB	4,76 x 10 ⁴ bA	4,78 x 10 ⁴ bA
	STT	4,20 x 10 ³ aB	1,33 x 10 ⁵ aA	2,17x 10 ⁵ aA
	MA	2,80 x 10 ³ aA	1,56 x 10 ⁴ bA	4,94 x 10 ⁴ bA
	AO	3,20 x 10 ³ aB	5,16 x 10 ⁴ bA	5,08x 10 ⁴ bA
	CV= 47,09 %	V8	2,78 x 10 ⁴ aB	3,47 x 10 ⁵ aA
<i>Cercospora-zeina</i>		Números médios de conídios/mL		
	BDA	6,60 x 10 ³ aB	4,16 x 10 ⁴ cA	4,23 x 10 ⁴ bA
	STT	3,80 x 10 ³ aC	5,25 x 10 ⁵ aA	4,21 x 10 ⁵ aB
	MA	4,86 x 10 ⁴ aA	3,58 x 10 ⁴ cA	4,36 x 10 ⁴ bA
	AO	3,60 x 10 ³ aB	3,92 x 10 ⁴ cA	4,93 x 10 ⁴ bA
	CV = 41,47 %	V8	5,20 x 10 ³ aC	1,86 x 10 ⁵ bB

Meios de cultura: BDA (Batata Dextrose Agar), STT (Suco de tomate tempedado), MA (Malte), Aveia (AO) e V8 (V8). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, a de 5% de probabilidade

Inoculações das sementes de sorgo

Quando foram empregados conídios, seja em suspensão ou em meio, o número de esporos por semente foi de 2,62 x 10⁴ e 3,20 x 10⁴; respectivamente, significativamente maior do que quando se utilizou micélio com conídios em meio de cultura, 4,66 x 10³ (Tabela 1), aumentando a probabilidade de se obter sucesso na inoculação em plantas de milho.

Tabela 2 Produção média de conídios por semente de sorgo, inoculadas por diferentes tipos de culturas de *Cercospora zea-maydis*: conídios em meio, suspensão de conídios e micélio e conídios

Tipos de culturas fúngicas	Médias
Conídios em meio	3,20 x 10 ⁴ a
Suspensão de conídios	2,62 x 10 ⁴ a
Micélio e conídios	4,66 x 10 ³ b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Apesar dos tratamentos com conídios não apresentarem diferenças estatísticas significantes, os conídios em meio de cultura proveniente de transferência de esporos apresentou em média 5488 conídios/mL a mais do que a suspensão. Isto provavelmente ocorreu em decorrência da germinação dos mesmos na presença de água, o que auxiliou na colonização das sementes pelo micélio e não a produção e/ou manutenção dos mesmos, uma vez que a concentração inicial de conídios foi de 1.0×10^5 conídios/mL. Além disso, a suspensão de esporos auxiliou na distribuição uniforme dos mesmos sobre as sementes, uma vez que, em todas as sementes analisadas observaram-se conídios, cujos números variaram de 1.0×10^3 a 1.58×10^5 conídios/sememente (Tabela 2). Fato que não ocorreu em outros tratamentos que estavam em meio de cultura sem a presença de água livre.

Mathioni et al. (2006) obtiveram sucesso na inoculação de *C. zeina* e *C. zea-maydis*, utilizando a inoculação por sementes de sorgo, com cultura fúngica contendo micélio e esporos com 20 dias. No entanto, quando se utiliza este tipo de cultura há uma grande variabilidade de conídios nas sementes, podendo-se encontrar de 0 a $1,8 \times 10^5$ conídios/sememente e a frequência de 0 conídios/sememente foi alta (Tabela 2). Desta forma, existe maior probabilidade de ocorrer insucesso no processo de inoculação. Para sanar esse tipo de deficiência na condução de

um experimento, pode-se utilizar maior número de plantas, aumentando desta forma, a probabilidade de se obter os sintomas desejados.

Tabela 3 Número de conídios por sementes de sorgo colonizadas por diferentes tipos de cultura de *Cercospora zae-maydis*

Tratamento 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
SC	51000	32000	19000	10000	54000	27000	28000	15000	13000	12000	261000
SC	16000	11000	67000	69000	47000	47000	26000	24000	36000	39000	382000
SC	98000	82000	29000	41000	23000	33000	31000	16000	16000	23000	392000
SC	4500	6000	4000	42000	5000	8000	28000	2000	19500	21500	140500
SC	19500	13000	26000	6500	4500	15000	27500	12500	79000	23000	226500
SC	14500	11500	3500	2500	63500	4000	20500	12000	6500	1500	140000
SC	33000	9000	1000	10000	13000	3000	6000	1000	6000	25000	107000
SC	39000	26000	52000	13000	9000	30000	55000	25000	158000	46000	453000
Tratamento 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
M+C	2000	0	0	1000	4000	0	0	2000	1000	0	10000
M+C	4000	0	1000	20000	13000	0	0	11000	3000	5000	57000
M+C	3000	3000	0	2000	17000	11000	0	16000	8000	2000	62000
M+C	13000	12000	2000	12000	0	1000	5000	4000	4000	9000	62000
M+C	5000	4000	3000	3000	12000	2000	1000	2000	0	18000	50000
M+C	11000	4000	5000	13000	5000	0	13000	3000	2000	1000	57000
M+C	5000	2000	6000	9000	7000	12000	11000	3000	0	10000	65000
M+C	2000	0	0	1000	4000	0	0	2000	1000	0	10000
Tratamento 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
CM	54000	34000	44000	69000	41000	30000	46000	9000	12000	14000	353000
CM	22000	36000	25000	31000	33000	31000	31000	19000	31000	24000	283000
CM	49000	25000	37000	59000	33000	49000	18000	19000	31000	39000	359000
CM	46000	24000	49000	40000	43000	13000	18000	18000	50000	31000	332000
CM	2000	16000	125000	0	7000	111000	3000	0	0	3000	267000
CM	39000	24000	21000	49000	42000	18000	40000	65000	26000	31000	355000
CM	29000	23000	7000	5000	127000	8000	72000	24000	31000	1000	327000

Tratamento 1 = Suspensão de conídios (SC), Tratamento 2 = Micélio e conídios (M+C), Tratamento 3 = Conídios em meio (CM)

Resultado semelhante foi observado quando se utilizou meio de cultura contendo apenas conídios para inoculação das sementes, em relação ao número de conídios/sementes, cuja variação foi de 0 a 1.11×10^5 (Tabela 2) embora, a frequência de 0 foi bem menor (3 zeros) quando comparada com o tratamento micélio e conídios (18 zeros), ou seja, 6 vezes maior, o que possibilita maior probabilidade de se ter sucesso na inoculação, assim como a maior quantidade de conídios por sementes.

A quantidade de conídios/semente em cada tratamento pode ser observada por imagens de microscopia eletrônica de varredura das sementes onde fica evidente que os tratamentos utilizando apenas conídios apresentam maior número de conídios nas sementes, enquanto no tratamento micélio e conídios, há poucos conídios e muito micélio (Figura 4).

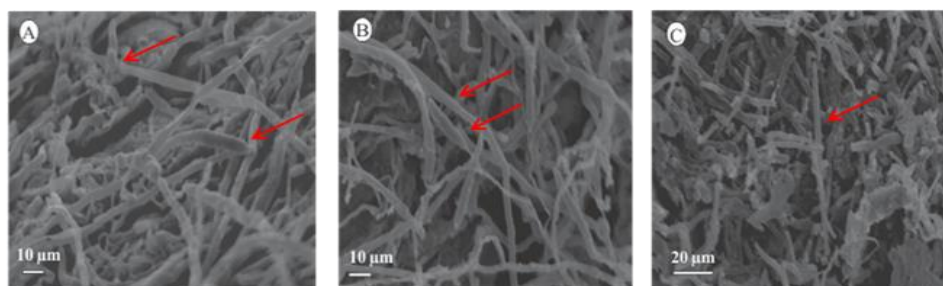


Figura 4 Eletromicrografia de varredura das sementes de sorgo inoculadas com diferentes tipos de cultura de *Cercospora zae-maydis* (A) suspensão de conídios, (B) conídios em meio de cultura, e (C) micélio e conídios

Freppon et al. (1994), também, obtiveram bons resultados quando utilizaram método semelhante de inoculação, onde foram usados grãos de aveia (*Avena sativa* L.) colonizados com culturas de *C. zae-maydis* incubadas por 5 dias a 28 °C sob fotoperíodo, embora não mencionassem o número de conídios.

Os resultados indicam que as diferenças na quantidade de conídios/semente são influenciadas de acordo com o tipo de cultura fúngica utilizado para inocular artificialmente as sementes de sorgo, as quais servem como veículo para o patógeno infectar a planta. No entanto, para conhecer a concentração ideal, ou seja, aquela capaz de produzir sintomas, é necessário conduzir ensaios em casa-de-vegetação sob condições controladas com os 3 tipos de tratamentos estudados.

Em relação ao tipo de cultura fúngica mais adequado para inocular as sementes de sorgo, os conídios, seja em suspensão ou em meio de cultura,

propiciam maior número de conídios/semente, provavelmente, porque o sorgo é um meio que mantém os conídios no meio, e não induz produção dos mesmos, pois, quando é colocado micélio nas sementes de sorgo, o número de conídios/semente é baixo, evidenciando que o processo de crescimento micelial é favorecido em vez da esporulação. Desta forma, para aumentar a probabilidade de sucesso na inoculação das plantas é melhor trabalhar apenas com conídios.

Segundo Alfenas & Maffia (2007) é fundamental empregar a concentração mínima de inóculo capaz de produzir nível desejado de doença. No entanto, neste patossistema há poucos estudos envolvendo inoculação artificial, especialmente no Brasil, portanto, até o presente momento não é conhecida a concentração ideal de conídios capaz de causar sintomas nas condições climáticas do Brasil. Bluhm et al. (2008) citaram uma concentração de 10^5 conídios/ml do *C. zea-maydis*, de um isolado americano proveniente de Ohio. Desta forma, pode-se inferir que uma concentração em torno de 10^5 conídios/mL seja favorável à infecção.

Conlui-se que ambos os métodos de esporulação são eficientes para produzir conídios, principalmente sob condições ótimas de esporulação em meio STT e V8. Pelo método da secagem micelial o melhor tempo de fragmentação foi 168 h, enquanto para o outro método, cada espécie exige uma condição ótima. Para *C. zea-maydis* esta condição é fotoperíodo de 12 horas ou em ausência de luz nos meios STT e V8, enquanto para *C. zeina* fotoperíodo de 12 horas em STT ou na ausência de luz em meio STT e V8.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo auxílio financeiro projeto de pesquisa CAG-APQ 01719-08 e apoio a manutenção de grandes equipamentos LME / UFLA -

APQ 02715-09) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. 2007.382p.

ÁVILA, Z.R.; PITELLI, R.A. Efeito das condições de cultivo sobre a produção e virulência de *Cercospora piaropi*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.3, p.382-388, jul/set. 2004.

BECKMAN, P.M.; PAYNE, G.A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeaе maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology**, St. Paul, v.73, n.2, p.286-289, ago.1983.

BLUHM, B.H.; DHILLON B.; LINDQUIST E.A.; KEMA G.H.; GOODWIN S.B.; DUNKLE L.D. Analyses of expressed sequence tags from the maize foliar pathogen *Cercospora zeaе-maydis* identify novel genes expressed during vegetative, infectious, and reproductive growth. **BMC Genomics**, London, v.9, n.523, p.1-17, nov. 2008.

BRUNELLI, K. R.; FAZZA, A. C. ATHAYDE SOBRINHO C.; CAMARGO, L. E. A. Efeito do meio de cultura e regime de luz para esporulação de *Cercospora zeaе-maydis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n.1, p. 92-94, jan/mar. 2006.

CALPOUZOS, L. **Studies on the Sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen**. Boston: Atkins Garden; Research Laboratory Cienfuegos, 1955. 68 p.

CASTRO, N. R., COÊLHO, R. S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, n.4., p.466-471, out/dec. 2000.

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**, Netherlands, v. 55, p.189–197, jul/ago.2006.

FANTIN, G. M.; BRUNELLI, K. R.; RESENDE, I. C.; DUARTE, A. P. **A mancha de cercospora do milho**. IAC. Boletim Técnico, 192. Campinas: IAC, 2001. 19p.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, SP. **Anais**. São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FREPPON, J.T., LIPPS, P.E. PRATT, R.C.. Characterization of the chlorotic lesion response by maize to *Cercospora zea-maydis*. **Plant Disease** v.78, n.10, p.945-949, jun. 1994.

HANLIN, R. T. Microcycle conidiation: a review. **Mycoscience**, Tokyo, v. 35, n. 1, p. 113-123, Apr. 1994.

JENCO, J.H; NUTTER, F.W., Jr.; Diurnal and seasonal periodicity of *Cercospora zea-maydis* in Iowa **Phytopathology**, St. Paul, v.82, n. 9, p.992-24, set. 1992.

KILPATRICK, R. A.; JOHNSON, H. W. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. **Phytopathology**, Sant Paul.,v.46, n.4, p.180-181, abr.1956.

LAPAIRE, C. L.; DUNKLE, L. D. Microcycle conidiation in *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**, Sant Paul v. 93, n. 2, p. 193-199, feb. 2003.

NAGEL, C.M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology**, Sant Paul. n. 24:p.1101-1110, dez.1934.

MATHIONI SM, CARVALHO RV, BRUNELLI, KR, BELO A, CAMARGO LEAL (2006) Aggressiveness between genetic groups I and II of isolates of *Cercospora zea-maydis*. **Scientia Agricola**, 63:547-551.

MORAES, S. A., SALGADO, C. L. Influencia da luz sobre a esporulação de *Cercospora arachidicola* HORI. **Summa Phytopathologica** , Botucatu, n.4, v.4, p.128-135, 1978.

NECHET, K.L. ; BARRETO, R.W.; MIZUBUTI, E.S.G. Bipolaris euphorbiae as a biological control agent for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host populations. **BioControl** v.51, n.2, p.259-275,ago. 2006.

SOUZA, A.G.C.; MARTINS, R. B.; MIZUBUTI, E.S.G.;MAFFIA, L.A.
Esporulação *in vitro* de *Cercospora coffeicola*. In. XXXVIII Congresso
Brasileiro de Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**. Brasilia, DF, 2005. 216p.

VATHAKOS, M. G., H. J. WALTERS. Production of conidia by *Cercospora kikuchii* in culture. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, p.832-833. fev,1979.

WALKER, H.L. *Alternaria macrospora* as a potential biocontrol agent for spurred
anoda: production of spores for field studies. USDA **Advanced Agricultural
Techniques**, Southern Series n.12. New Orleans, LA, USA, USDA-ARS-SE.
1980. 5p.

WHITE, D. G. **Compendium of corn diseases**. 3. ed. St. Paul: American
Phytopathological Society. APS Press, 2000. 78p.

YEH, C. C., SINCLAIR, J. B. Sporulation and variation in size of conidia and
conidiophores among five isolates of *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease** , Saint
Paul ,v.64, n. 4, p.373-374., abr.1980.

ARTIGO 3

Indução e detecção de toxina em *Cercospora zeina* e *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*.

Artigo em fase de submissão à Tropical Plant Pathology

Érika Sayuri Maneti Koshikumo, Eduardo Alves, Hilário Antônio de Castro,
Renzo Garcia Von Pinho

RESUMO

As espécies de *Cercospora* do milho se diferem quanto à produção de Cercosporina. Para tanto, o objetivo desse estudo foi induzir a produção da toxina em *Cercospora zeina* e *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* em 16 meios de cultura, e averiguar qual é o meio mais adequado para se detectar a toxina. Das margens das colônias foram retirados discos miceliais, os quais foram imersos em KOH por 16 horas. A concentração de toxina foi calculada utilizando o coeficiente de 23.300 L.mol⁻¹. Nas condições em que foram submetidos os fungos, não foi possível a produção de toxina em *C. zeina*, fato que reforça a hipótese de que a toxina só é produzida em planta. Em *C. sorghi* f. sp. *maydis*, a produção de toxina foi intensa nos meios com água de coco, principalmente, quando foi adicionado extrato de leveduras, apresentado 177,34 nmol/disco. Apenas o meio MID não foi capaz de produzir a toxina, embora a pigmentação avermelhada, típica da mesma, esteve presente, tais características podem proporcionar erros em análises qualitativas da mesma. Houve diferenças na produção de toxina, quando se utilizaram marcas e concentração de BDA(s) diferentes, o que evidencia a importância de mencionar ambos em trabalhos dessa linha de pesquisa. Conclui-se que o *C. sorghi* f. sp. *maydis* produz toxina em todos os meios, principalmente em CW+Y, exceto no MID, enquanto com *C. zeina* não foi possível induzir e detectar a Cercosporina.

Palavras-chave: Cercosporiose do milho, *Zea-mays*, cercosporina.

ABSTRACT

Cercospora species differ from capacity to produce toxin. The objective of this study was to induce the production of toxin in *Cercospora zeina* and *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* in 16 culture media, and to know which medium that more induce the production of toxin. Agar plugs cut from margins of the colonies were extracted in KOH for 16 hours. The cercosporin concentration was determined by using a molar extinction coefficient of 23.300 L.mol⁻¹. In the conditions that the fungi were cultured, it was not possible to induce toxin production in *C. zeina*. This fact reinforces the hypotheses that the toxin is only produced *in planta*. *C. sorghi* f. sp. *maydis* produced high concentration of toxin in medium with coconut water, especially when yeast extract was added, 177.34 nmol/plug. Only the medium M1D did not produce the toxin, but produced the red pigmentation similar to that. There was difference in the production of toxin when use BDA from different vendors that show the importance to cite the mark. We conclude that *C. sorghi* f. sp. *maydis* produce toxin in almost all media, mainly in CW+Y, except in M1D, while to *C. zeina* was not possible to detect cercosporin.

Keywords: Maize Gray Leaf Spot, *Zea-mays*, cercosporin.

INTRODUÇÃO

Muitos fungos fitopatogênicos produzem metabólitos secundários de baixo peso molecular, que tem papel significativo na interação planta-patógeno (Wolpert et al., 2002; Yoder 1980), como muitas espécies de *Cercospora* (Assante et al.;1977; Fajola 1978; Lynch & Geoghegan 1979) que produzem a toxina; Cercosporina.

A Cercosporina é uma fitoxina com atividade tóxica contra um amplo espectro de organismos, portanto, não seletiva ou não específica, é produzida pelas hifas em meio de cultura, resultando em acúmulo de cristais de Cercosporina ao redor das hifas e na superfície do meio de cultura (Daub & Chung, 2009); apresenta coloração avermelhada que se torna verde em condições alcalinas (presença de KOH), exibindo a máxima absorção no comprimento de onda a 480 nm (Jenns et al., 1989). Pertence ao grupo das perilenequinonas e sua produção ocorre via rota dos policetídeos, (condensação das moléculas de malonato e acetato) (Okubo et al. 1975; Daub & Ehrenshaft 2000; Daub et. al. 2005; Choquer et al., 2005).

No entanto, existem espécies patogênicas altamente destrutivas e virulentas, que não produzem a toxina em meio de cultura, é o caso da *Cercospora sojina* e *Cercospora zeina*. Carson et al. (2002) e Brunelli et al. (2008) já haviam observado que alguns isolados do antigo grupo II, atual *C. zeina*, não produziam a Cercosporina.

A hipótese mais aceita para explicar tal observação é que essas espécies são produtoras de toxina apenas *in planta*, uma vez que as condições apropriadas para induzir a toxina não foram propiciadas. Além disso, ambas contêm o gene que confere auto-proteção contra a ação da toxina, o que reforça a hipótese que elas realmente são produtoras de toxina *in vivo* (Goodwin & Dunkle, 2010).

A substância do grupo das perilenequinonas contém moléculas fotossensibilizadoras que são capazes de absorver luz e gerar espécies ativas de oxigênio, que danificam a membrana celular, apresentam cor e absorvem comprimento de luz visível (Daub & Chung, 2009)

A produção de toxina *in vitro* via rota dos policetídeos varia com diversos fatores, como: meio de cultura, temperatura, luz, taxa de C:N, entre as espécies, isolados de uma mesma espécie pelo meio de cultura, temperatura e luz. (Jenns et al., 1989). O fator mais importante tanto para a ativação de toxina quanto para biossíntese é a luz, pois, em sua ausência a produção de Cercosporina é anulada e a mínima exposição a ela induz produção de toxina (Daub & Chung, 2009). Além desses, outros fatores estão associados à biossíntese de Cercosporina como o cálcio/calmodulina, proteína G e a MAP quinase (Chung, 2003; Shim & Dunkle, 2003).

O processo de ativação da Cercosporina pela ativação de luz, em nível molecular é conhecido, no entanto, sobre a biossíntese de Cercosporina pouco se sabe a respeito, embora, recentemente, um grupo de genes que codificam enzimas requeridas para a biossíntese dessa toxina foram identificados e caracterizados (Chen et al., 2007).

O grupo de genes *ctb* (cercosporin toxin biosynthesis) é responsável pela produção de toxina e estão correlacionados com as condições ambientais. O gene *ctb1* produz a enzima envolvida no primeiro passo na biossíntese da Cercosporina, enquanto o gene *cfp* (cercosporin facilitator protein) não está diretamente ligado à produção de toxina e codifica a proteína, CFP, cuja função é eliminar a toxina para o meio externo; sua deleção em *Cercospora kikuchii* promoveu mutantes deficientes na produção de toxina e apresentou reduzida virulência (Callahan et al., 1999). O *czk3* é um gene que regula a produção de toxina, desenvolvimento do fungo e a patogênese. Isolados que tiveram esse gene inativado apresentaram ausência de Cercosporina e de estruturas

reprodutivas na folha e em meio de cultura (Shim & Dunkle, 2003). O gene *pdx1* ou *sor1* não está diretamente envolvido na biossíntese da Cercosporina, mas é responsável por conferir resistência contra o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$)-produzido quando Cercosporina reage com a luz, a proteína desse gene, é um essencial componente da biossíntese da piridoxina (vitamina B6), que é capaz de inativar a ação do oxigênio singleto (Daub & Chung, 2009).

Pode-se detectar a Cercosporina em extratos de cultivos *in vitro* após 2 dias que a cultura foi transferida para o meio (Jeens et al., 1989) ou a partir de tecidos lesionados de plantas infectadas (Robeson et al., 1993). *In vitro* a Cercosporina é sintetizada apenas em meios de cultura que propiciam o crescimento vegetativo e esta é reprimida sob condições nutricionais que induzem o processo de conidiação microcíclica, como em meio V8 (Daub & Chung, 2007). Isto sugere que o desenvolvimento do fungo e o metabolismo secundário sejam antagônicos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho consistiu em induzir a produção de toxina em *C. zeina* e *C. sorghi* f. sp. *maydis* em 16 meios de culturas e averiguar qual é o meio mais adequado para se detectar a toxina.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados

Foram utilizados os isolados de *Cercospora zeina*: LV-23, IN-5 e BA-150, provenientes de Lavras, Indianópolis e Bambuí, respectivamente e a *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*, LV- 2, de Lavras.

Meios de cultura

Foram utilizados 16 meios de cultura: Água-Ágar (A), Água+ levedura (A+Y); Batata Dextrose Ágar da marca Himédia (PDA-H), Batata Dextrose

Ágar da marca Himédia com levedura (PDA-H + Y); 0.2 de Batata Dextrose Ágar da Himédia (0.2 PDA-H), 0.2 de Batata Dextrose Ágar da Himédia com levedura (0.2 PDA-H +Y), Batata Dextrose Ágar da marca Merck (PDA-M); Batata Dextrose Ágar da marca Merck com levedura (PDA-M + Y); 0.2 de Batata Dextrose Ágar da Merck (0.2 PDA-M), 0.2 de Batata Dextrose Ágar da Merck com levedura (0.2 PDA-M +Y), M-1-D (M-1-D), Água de coco (CW), Água de coco com levedura (CW+Y); Água de coco com cloreto de magnésio, cloreto de manganês e cloreto de cálcio (CW+S); Água de coco com cloreto de magnésio, cloreto de manganês, cloreto de cálcio e levedura (CW+S+ Y) e Suco de Tomate Temperado (STT) (Tabela 1).

Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem e medidos os pH(s), os quais foram ajustados com NaOH ou KOH quando necessário.

Discos de micélio de cada espécie de *Cercospora* com 4 mm de diâmetro foram colocados no meio de cultura e incubados por 10 dias sob luz contínua a 27 °C.

Extração e quantificação de Cercosporina

Para extração e quantificação da toxina foi utilizada a metodologia descrita por Chung (2003) com algumas modificações. Três discos miceliais com 4 mm de diâmetro foram colocados em 8 mL de KOH (5 mol.L⁻¹) por 16 horas à temperatura de 25 °C no escuro. As leituras da absorbância foram feitas no espectrofotômetro Beckman DU-600. A concentração de Cercosporina foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 23.300 L.mol⁻¹ nas leituras de A₄₈₀ nm (Jenns et al., 1989). Para determinar a concentração de Cercosporina por disco, dividiu-se o resultado por 3.

Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) com 16 tratamentos e 3 repetições e para cada placa de Petri foram feitas 3 leituras de absorbância da toxina. As médias foram comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para análise dos dados foi utilizado o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

Tabela 1 Componentes dos meios de cultura utilizados para induzir a produção de cercosporina por espécies de cercospora do milho

Meios de cultura	Siglas	Componentes dos meios de cultura (1 litro)	pH
Água-agar	AA	20 g de ágar	6,42
Água-agar com levedura	AA+Y	20 g de ágar e 1,5 g de extrato de levedura	9,14
Batata Dextrose Broth da marca Himédia	PDA-H	20 g de PDB e 20 g de ágar	9,15
Batata Dextrose Broth da marca Himédia com levedura	PDA-H + Y	24 g de PDB, 20 g de ágar, 1,5 g de extrato de levedura	9,00
0.2 de Batata Dextrose Broth da Himédia	0.2 PDA-H	4.8 g de PDB e 20 g de ágar	8,97
0.2 de Batata Dextrose Agar da Himédia com levedura	0.2 PDA-H +Y	5 g de PDB, 20 g de ágar, 1,5 g de extrato de levedura	8,99
Batata Dextrose gar da marca Merck	PDA-M	39 g de BDA	5,32
Batata Dextrose Agar da marca Merck com levedura	PDA-M + Y	39 g de BDA e 1,5 g de extrato de levedura	5,25
0.2 de Batata Dextrose Agar da Merck	0.2 PDA-M	7.8g de BDA	9,00
0.2 de Batata Dextrose Agar da Merck com levedura	0.2 PDA-M +Y	7,8 g de BDA, 12 g de ágar e 1,5 g de extrato de levedura	8,98
Água de coco	CW	1000 mL de água de coco "Sococo" e 20 de ágar	5,14
Água de coco com levedura	CW+Y	100 mL de água de coco "Sococo" com 1,5 g de extrato de levedura e 20 g de ágar	8,98
Água de coco com cloreto de magnésio, cloreto de manganês e cloreto de cálcio	CW+S	Água de coco com solução estoque a 1 % de MgCl ₂ 20.3 g; CaCl ₂ 10.2 g; MnCl ₂ 1.0 g para 100mL de água de coco	7.2
Água de coco com cloreto de magnésio, cloreto de manganês, cloreto de cálcio e levedura	CW+S+ Y	Água de coco com solução estoque a 1 % de MgCl ₂ 20.3 g; CaCl ₂ 10.2 g; MnCl ₂ 1.0 g para 100mL de água de coco e 1,5 g de extrato de levedura	8.52
M1D modificado	M1D	Ca (NO ₃) ₂ , 1.2 mM; KNO ₃ , 0.79 mM; KCl, 0.87 mM; MgSO ₄ , 3.0 mM; NaH ₂ PO ₄ , 0.4 mM; sucrose, 87.6 mM; tartarato de amônio, 27.1 mM; FeCl ₃ , 7.4, uM; MnSO ₄ , 30, uM; ZnSO ₄ , 8.7, uM; H ₃ BO ₃ , 22, uM; KI, 4.5 1mM, Inositol (5g/l); Tiamina (0.5 g/l); e água de coco (12 ml/l).	5,5
Suco de tomate temperado	STT	200 mL de suco de tomate temperado "Super bom"; 20 g de agar; 3,2 g de CaCO ₃	6.59

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de Cercosporina foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 23.300 L.mol⁻¹ para leituras de A₄₈₀ nm (Jenns et al., 1989) (Tabela 1). Foi possível induzir e detectar a Cercosporina apenas em *C. sorghi* f.

sp. *maydis*, mas não em *Cercospora zeina*. No caso dos dois isolados de *C. zeina* não foi possível induzir e detectar a Cercosporina, provavelmente, porque faltaram substâncias essenciais que estão presentes no milho para iniciar a produção da mesma, tal resultado suporta a hipótese de que a produção apenas ocorre *in planta*, pois, o patógeno contém o gene que confere autoproteção contra a toxina (Goodwin & Dunkle, 2010) indicando que esta espécie seja uma potencial produtora de Cercosporina.

Dentre os 16 meios de cultura utilizados (Figura 1A e B) apenas no MID modificado não foi possível detectar a Cercosporina, para *C. sorghi* f. sp. *maydis*, embora apresentasse aparentemente todas as características da toxina, ou seja, o meio apresentou coloração avermelhada, assim como as hifas, que apresentaram coloração rósea, característica observada em isolados que produzem muita toxina (Figura 2). No entanto, quando fragmentos miceliais crescidos em meio MID foram colocados em meio alcalino, KOH 0.5 N, a coloração do meio ficou alaranjada e não verde (Figura 3), conforme ocorre com a Cercosporina (Jenns et al., 1989), portanto, não se trata da Cercosporina e, sim, de outra substância com características visíveis no meio de cultura semelhante à toxina estudada. Este constitui um exemplo de que análises qualitativas baseadas em escalas de notas na intensidade da cor em meios de cultura sem uma análise química podem ocasionar erros.

O MID é um meio de cultura sintético frequentemente utilizado para produção da toxina Fijiensi, pelo patógeno *Mycosphaerella fijiensis*, causador da Sigatoka Negra. Para a modificação desse meio foram adicionados compostos orgânicos como Tiamina (Vitamina B1), Inositol ($C_6H_{12}O_6$), que atuam como fator de crescimento de micro-organismos e água de coco, a qual contém todos os ingredientes essenciais necessários para o desenvolvimento dos micro-organismos (Krishnamurthy et al., 1958). Os nutrientes deste meio propiciaram produção de pigmento avermelhado no meio de cultura e coloração rósea do

micélio. Upadhyay et al. (1990) observaram a mesma coloração em *Mycosphaerella fijiensis*.

A concentração de toxina entre os meios utilizados variou de 177,34 a 2,73 nmol/disco (Tabela 2). Os meios com água de coco foram os que mais produziram toxina, principalmente, quando enriquecidos por leveduras e/ou sais (S), como: MgCl₂ CaCl₂ e MnCl₂. O CW+Y foi o que apresentou maior concentração de Cercosporina, 177,34 nmol/disco, seguidos pelos CW+Y+S, CW+S; PDA+Y (H) e CW.

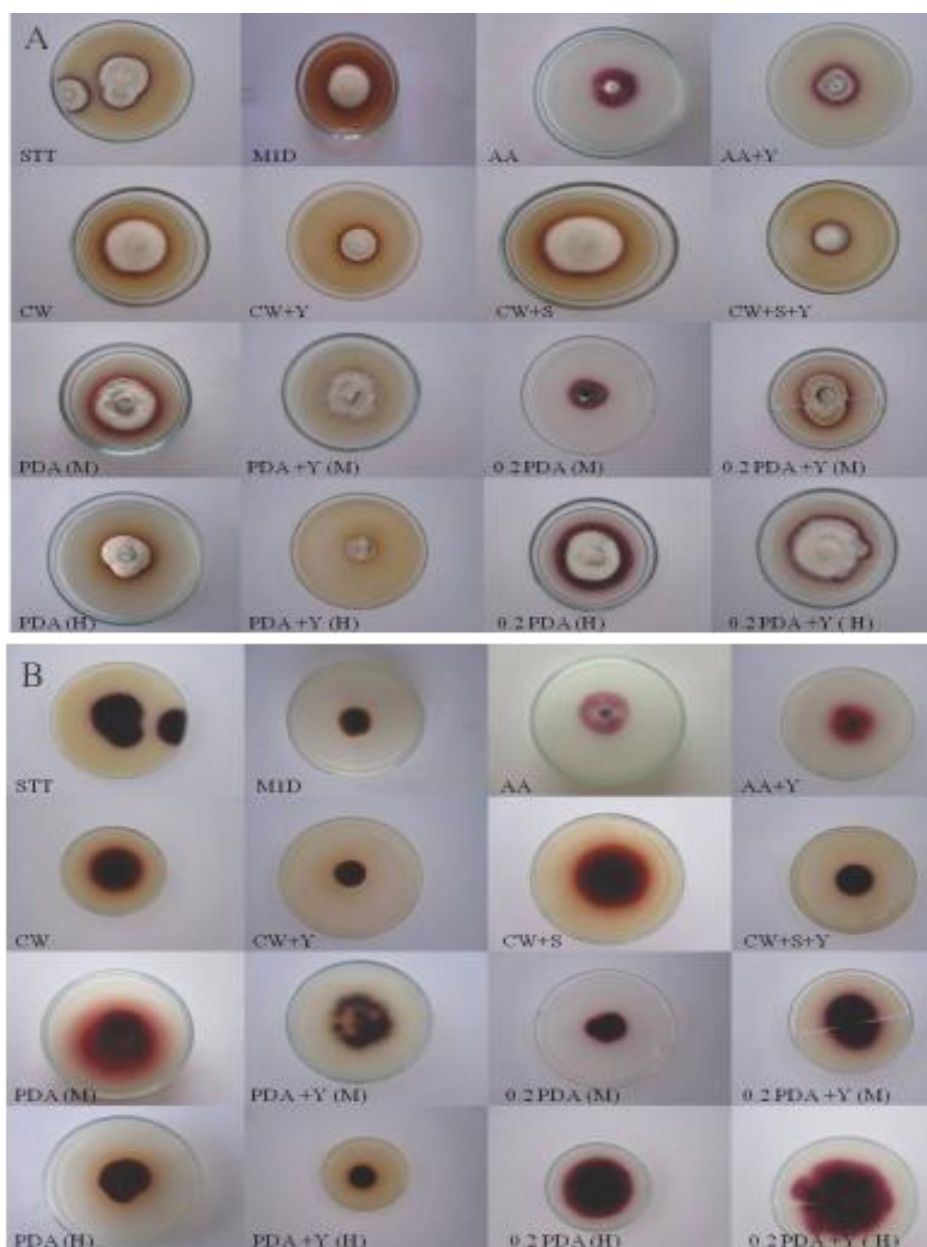


Figura 1 Produção de Cercosporina por *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* em diferentes meios de cultura incubado sob luz contínua a 27 °C (A): frente e (B): verso da placa

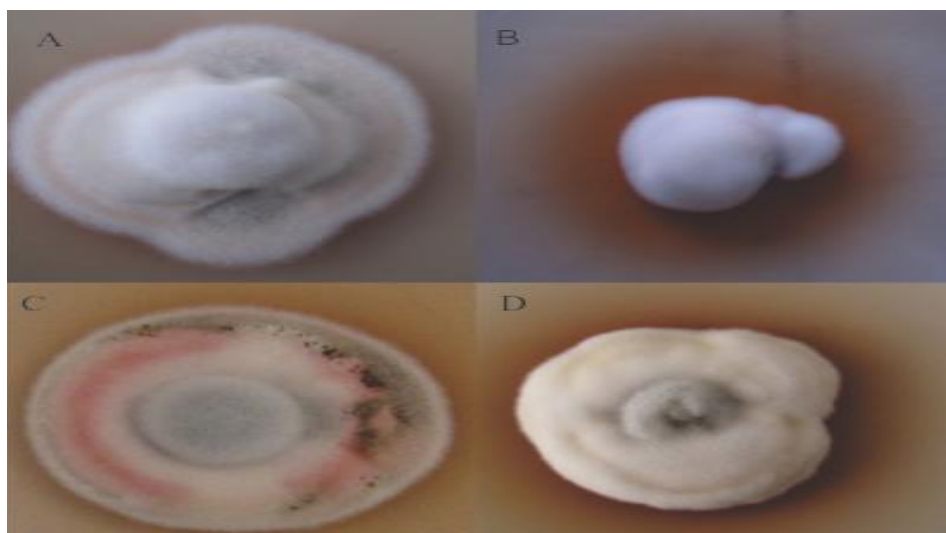


Figura 2 *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* em meio M1D modificado (A,B), em meio PDA+Y(H) (C), em meio PDA(H) (D). Micélio de coloração rósea (A.C), pigmento avermelhado no meio semelhante à Cercosporina (B) e Cercosporina no meio de cultura (D)

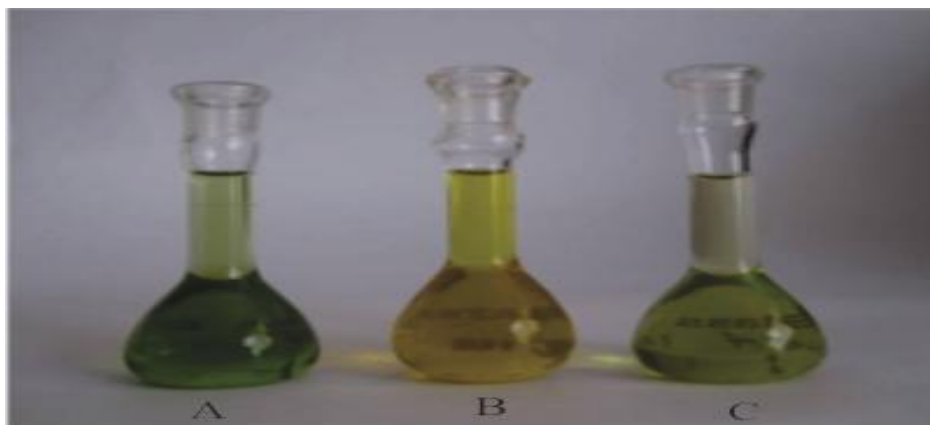


Figura 3 Coloração do KOH após 16 horas em contato com o micélio em meios água de coco (CW), M1D e Suco de Tomate Temperado (STT) de *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis* Cercosporina extraída em KOH 5 N

O meio STT, que é tão utilizado para a esporulação quanto o V8, induziu a produção de toxina, 9,99 nmol/disco, quantidade bem inferior quando comparada com a do CW+Y, que foi 177,34 nmol/disco.

A produção de toxina em meios de culturas que favorecem a esporulação é rara, pois, as condições nutricionais requeridas para cada processo são diferentes, caracterizando-se por serem antagônicas (Daub & Chung, 2009). Portanto, este é o primeiro relato de produção de toxina em meio de cultura que induzem o processo de esporulação, apesar de ambos os processos não serem observados concomitantemente.

O meio Ágar-água (AA) é o mais pobre em nutrientes, apenas contém água e ágar, o qual tem pequenas quantidades de minerais, tais como: P, Fe, K, Cl, I e Ca; além de celulose, anidrogalactose e proteínas, que foram suficientes para induzir a produção de toxina, 4,01 nmol/disco, quantidade muito próxima do tratamento enriquecido com levedura, AA+Y, 4,08 nmol/disco. Portanto, neste meio o extrato de levedura não auxiliou no aumento da concentração da toxina.

A maioria dos meios PDA(s) apresentou concentração inferior aos tratamentos constituídos de água de coco, com exceção do PDA+Y(H) que apresentou 87,96 nmol/ disco, cujo valor não diferenciou estatisticamente dos valores dos tratamentos CW, CW+S e CW+S+Y, mas foi significante maior quando comparado com os outros tratamentos contendo PDA, principalmente quando comparado com o PDA+Y (M), cuja concentração foi de 3,70 nmol/disco. A diferença dos resultados deve-se exclusivamente à composição do meio de cada marca, sendo assim, é de suma importância que ao conduzir experimentos visando à produção de Cercosporina que a marca do produto seja mencionada, caso contrário, o resultado pode ser não reproduzível. Da mesma forma, PDA feitos diretamente de tubérculos de batata devem ser evitados, pois,

a composição nutricional é desconhecida e altamente variável com diferentes fatores, como por exemplo, o tipo de cultivar.

Tabela 2 Produção de Cercosporina em diferentes meios de cultura pelo *Cercospora sorghi* f.sp.*maydis*

Meios de cultura	Concentrações (nmol/disco)
CW+Y	177,34a
CW+Y+S	106,84 b
CW+S	89,96 b
PDA+Y(H)	87,96 b
CW	85,56 b
PDA (M)	66,01 c
PDA (H)	15,46 d
STT	9,99 d
0.2 PDA (H)	6,52 d
0.2 PDA (M)	5,25 d
0.2PDA+ Y (H)	4,31 d
AA+Y	4,08 d
AA	4,01 d
0,2 PDA+ Y (M)	3,70 d
PDA+Y (M)	2,73 d

Ágar-água (AA), Ágar-água + levedura (AA+Y); Batata Dextrose Ágar da marca Himédia (PDA-H), Batata Dextrose Ágar da marca Himédia com levedura (PDA-H + Y); 0.2 de Batata Dextrose Ágar da Himédia (0.2 PDA-H), 0.2 de Batata Dextrose Ágar da Himédia com levedura (0.2 PDA-H +Y), Batata Dextrose Ágar da marca Merck (PDA-M); Batata Dextrose Ágar da marca Merck com levedura (PDA-M + Y); 0.2 de Batata Dextrose Ágar da Merck (0.2 PDA-M), Água de Coco (CW), Água de Coco com levedura (CW+Y); Água de Coco com cloreto de magnésio, cloreto de manganês e cloreto de cálcio (CW+S); Água de Coco com cloreto de magnésio, cloreto de manganês, cloreto de cálcio e levedura (CW+S+ Y) e Suco de Tomate Temperado (STT)

O uso do extrato de levedura para potencializar a produção de toxina ocorre apenas em alguns meios de cultura, necessitando, portanto, de estudos prévios em cada tipo de meio a ser utilizado.

Assim como observado por You et.al.(2008), Daub & Chung, (2009), foi possível verificar que a produção de toxina varia com diferentes fatores nutricionais. Portanto, uma vez observado que a água de coco é um eficiente indutor de toxina, é importante averiguar se diferentes marcas influenciam significativamente para esta produção, pois, mesmo entre os PDA (s) sintéticos, apresentam variações significativas da toxina.

Não foi possível induzir e detectar a Cercosporina em *C. zeina*, provavelmente, faltou substâncias essenciais que estão presentes no milho para iniciar a produção da mesma, tal resultado suporta a hipótese de que a produção apenas ocorre *in planta*, pois, o patógeno contém o gene que confere autoproteção contra a toxina (Goodwin & Dunkle, 2006). Desta forma, estudos envolvendo a produção de toxina *in planta* ou o teste de outros meios são necessários para obtenção de resultados mais conclusivos. Daub & Ehrenshaft (2000) obtiveram resultados com *Cercospora kikuhii* que não produziam toxina *in vitro*, apenas *in planta*. Além disso, estudos com as enzimas degradadoras de parede devem ser estudados na tentativa de elucidar os mecanismos que permitem a esse patógeno ser mais agressivo que as outras espécies de *Cercospora* do milho sem a produção de toxina *in vitro*, a qual auxilia no processo de patogênese

Estudos com diferentes espécies de *Cercospora* envolvendo o efeito da Cercosporina, no processo de patogênese concluíram que essa toxina não é necessária para que o processo de infecção ocorra, mas para aumentar a severidade da doença. Shim & Dunkle (2003) observaram que as espécies mutantes de *C. zae-maydis*, ou seja, aquelas não produtoras de toxina colonizam as plantas, mas não foram capazes de causar sintomas.

A Cercosporina apresenta coloração avermelhada que se torna verde em condições alcalinas, como na presença de KOH (Jenns et al.,1989). Desta forma, a formação, de pigmento avermelhado no meio de cultura, sem coloração verde

na presença de KOH nem sempre é a Cercosporina. Tal fato foi observado no meio M1D, que induziu a produção de uma substância avermelhada, semelhante à Cercosporina, mas que na presença de KOH tornou-se amarelada, o que evidencia a importância de se fazer análises químicas, além da análise qualitativa para se ter precisão.

Em relação aos meios que induziram a produção da toxina, o meio água de coco é muito rico em nutrientes, como açúcares e outros glicídios, aminoácidos e suas amidas, e outros metabólitos (Henão, 1991; Roca & Mroginski, 1991). Esses nutrientes juntamente com o extrato de levedura, que contém pequenas quantidades de cálcio necessárias para indução de toxina (Chung, 2003) propiciaram alta concentração de Cercosporina. You et al. (2008) observaram que o extrato de levedura pode potencializar ou não a produção de toxina, dependendo do meio de cultura utilizado sem alterar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese, o que indica a existência de outros mecanismos que podem estar envolvidos. Neste meio, o extrato de leveduras e outros componentes, como os sais, proporcionaram aumento na produção de Cercosporina, embora a diferença entre a concentração de toxinas dos meios não sejam significativas, a variação entre o CW e o CW+Y+S, e, CW e o CW+S, foram 21,28 e 4,40 nmol/disco, respectivamente.

Neste estudo, os sais apresentaram pouca contribuição no aumento da concentração da toxina e o extrato de levedura foi o composto que mais proporcionou aumento. No entanto, quando adicionado extrato de leveduras e sais simultaneamente, a produção de toxina diminuiu quando comparado com o meio CW+Y, isto ocorreu provavelmente em virtude do excesso de nutrientes, principalmente do cálcio, pois, este está presente no extrato de leveduras e nos sais.

Os sais usados no meio CW+Y+ S e CW+S são fontes de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} e os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} têm efeito estimulador na produção da toxina em *C.*

nicotiane. O Ca^{2+} está envolvido em sinais de tradução iniciais que podem ativar a expressão dos genes envolvidos na regulação e biossíntese da Cercosporina (Chung, 2003).

A Cercosporina é preferencialmente sintetizada em meios que estimulam o crescimento vegetativo, como o PDA e é reprimida quando crescem em meios que favorecem a esporulação, como os meios V8 e STT, pois, as condições nutricionais requeridas para cada processo são diferentes, caracterizando-se por serem antagonísticos (Daub & Chung, 2009). Portanto, este é o primeiro relato de produção de toxina em meio de culturas que induzem o processo de esporulação, apesar de ambos os processos não serem observados concomitantemente. Desta forma, é possível inferir que há outros mecanismos de ativação de toxina neste meio, que ainda é desconhecido.

Jenns et al. (1989) constataram que o melhor meio para produção de toxina era o PDA, posteriormente, Chung (2003) observou que as melhores condições para o *Cercospora nicotianae* produzir a Cercosporina era sob luz e com uma camada fina de 15 mL meio PDA (Difco® Detroit, MI, USA), em placa de Petri de 9 cm, enquanto para *C. zae maydis* frequentemente é utilizado 0.2 PDA da Difco® (Bluhm & Dunkle; 2008, Shim & Dunkle, 2003), pois, a produção é máxima em meios pobres em nutrientes, como o PDA diluído, e mínima ou total ausência de toxina ocorre em meios ricos (Shim & Dunkle, 2003). No entanto, neste trabalho foi observado o oposto para *C. sorghi* f. sp. *maydis*, os meios PDA (H) e (M) induziram mais a produção de toxina, 66,01 e 15,46 nmol/disco, do que em meios diluídos com 0,2 PDA (H) e (M), que foram 6,52 e 5,25 nmol/disco, além disso, a adição de leveduras, nos meios diluídos de PDA da marca da Merck e da Himedia não auxiliaram na produção de toxina, enquanto em meio CW, o extrato de levedura auxiliou na indução da mesma. O motivo pelo qual o extrato de levedura pode aumentar ou diminuir a produção de Cercosporina é desconhecido (You et al., 2008).

Em relação ao cálcio, You et al. (2008) conseguiram induzir a toxina quando utilizaram uma quantidade de 10-100 mmol. L⁻¹ em meio PDA (PDA EM Science®), no entanto, os autores sugerem que manter o Ca²⁺ endógeno em homeostasia é o melhor para se obter a biossíntese da toxina em *C. nicotianae*. Portanto, quando se adicionam doses excessivas de cálcio, ocorre retardamento do processo. O Mg⁺² não apresenta contribuições significativas para a biossíntese da Cercosporina (You et al., 2008).

Um ponto importante de se ressaltar no que diz respeito à indução de Cercosporina, é a importância de se trabalhar com um meio que não apenas induza a Cercosporina, mas que também ofereça, ao fungo, nutrientes suficientes para promover desenvolvimento micelial abundante, pois, quanto mais micélio, maior é a produção de toxina, vide, por exemplo, os meios AA e CW, em ambos a produção da toxina ocorre, no entanto, o AA apresentou baixa concentração da mesma.

Neste trabalho foi possível observar que os meios feitos a partir de água de coco foram altamente indutores de Cercosporina. Sendo assim, este meio constitui uma nova alternativa para obtenção da toxina.

As marcas dos PDA(s) podem levar a resultados totalmente diferentes, portanto, é de extrema importância que em trabalhos com toxina, seja mencionado não apenas a quantidade de PDA, mas também a marca, pois, a concentração de toxina é alterada por diferentes componentes nutricionais, os quais mudam de acordo com o fabricante. Além disso, a toxina pode ser produzida pelo *C. sorghi* f. sp. *maydis* em meios que estimulam a esporulação. Apesar desta espécie de Cercospora não ser patogênica, estes resultados contribuem para futuras investigações em estudos bioquímicos e de expressão gênica, pois, se trata de um caso inédito.

Além disso, pode-se concluir que o melhor meio para se obter produção de toxina em *C. sorghi* f. sp. *maydis* foram aqueles com água de coco,

principalmente quando suplementados com leveduras ou com leveduras e cloretos de magnésio, manganês e cálcio, e a produção de Cercosporina em meio Suco de Tomate Temperado é possível, sendo visível e detectável por Espectrometria.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais – FAPEMIG pelo auxílio financeiro projeto (CAG-APQ 01719-08) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudo ao primeiro autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Assante G, Locci R, Camarda L, Merlini L, Nasini G (1977) Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry* 16: 243-247.

Bluhm, BH, Dunkle, LD (2008) Regulation of pathogenesis by light in *Cercospora zea-maydis*: Identification of a photoreceptor for infection of maize. *Phytopathology*. 98:S23.

Brunelli KR, Athahyde Sobrinho C., Fazza AC, Dunkle LD, Camargo LE (2008) Molecular variability in the maize gray leaf spot pathogen in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 31:938-942.

Callahan TM, Rose MS, Meade MJ, Ehrenshaft M, Upchurch RG (1999), CFP, the putative cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 12, 901–910.

Carson ML; Goodman MM; Williamson SM (2002) Variation in aggressiveness among isolates of *Cercospora* from maize as a potential cause of genotype - environment interaction in gray leaf spot trials. *Plant Disease*, 86:1089 – 1093.

- Chen H, Lee MH, Daub ME, Chung KR (2007) Molecular analysis of the cercosporin biosynthetic gene cluster in *Cercospora nicotianae*. *Molecular Microbiology* 64:755–770.
- Choquer M, Dekkers KL, Chen HQ, Cao L, Ueng PP, Daub ME, Chung KR (2005) The *CTB1* gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. *Molecular Plant Microbe Interact.* 18:468-476.
- Chung KR (2003) Involvement of calcium/calmodulin signaling in cercosporin toxin biosynthesis by *Cercospora nicotianae*. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 1187–1196.
- Daub ME, Ehrenshaft MM (2000), The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review Phytopathology* 38:461–90.
- Daub ME, Herrero S, Chung KR (2005) Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiology Letters* 252:197-206.
- Daub ME, Chung KR (2007) Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. Acesso em: 12/03/2007. Online: [http:// www. apsnet. org/online/feature/Cercosporin](http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin)
- Daub ME, Chung KR (2009) Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis. In: *The Mycota V, Plant Relationships*, 2nd Edition. H. Deising, Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp.201-219.
- Fajola AO (1978) Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. *Physiological Plant Pathology* 13: 157-164.
- Ferreira, DF (2000) Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. São Carlos, SP. Anais. São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.
- Henão, LMM (1991) Cultivo de tejidos vegetales. Medellin: Universidad Nacional de Colômbia.
- Goodwin, SB, Dunkle, LD (2006) Cercosporin production in cercospora and related anamorphs of Mycosphaerella. *Phytopathology* 9:139 [abstract]

Goodwin, SB, Dunkle, LD (2010) Cercosporin production in cercospora and Related Anamorphs. In: Lartey, RT, Weiland, JJ, Panella, L, Crous, PW, & Windels, CE. editors. Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet and Related Species. St. Paul, MN:APS Press. pp. 97-108.

Jenns AE, Daub ME, Upchurch RG (1989) Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation *Phytopathology* 79:213-219.

Krishnamurthy, K., Rajagopalan, R., Swaminathan, M., Subrahmanyam, V., 1958. The chemical composition and nutritive value of coconut and its products. *Food Science*. 7: 365–370.

Lynch FJ, Geoghegan MJ (1979) Regulation of growth and cercosporin photoinduction in *Cercospora beticola*. *Transactions of the British Mycological Society*. 73:311-327.

Okubo A, Yamazaki S, Fuwa K (1975) Biosynthesis of cercosporin. *Agricultural Biology and Chemistry* 39:1173–1175.

Robeson JR, Jalal MAF, Simpsom RB (1993) Methods for identifying cercosporin-degrading microorganisms. *US n. PI 5.262.306*, 16 Nov. 1993.

Roca WM; Mroginski L (1991) *A. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos e aplicações*. Cali: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).

Shim WB, Dunkle LD (2003) *CZK3*, a MAP kinase kinase kinase homolog in *Cercospora zea-maydis*, regulates cercosporin biosynthesis, fungal development, and pathogenesis. *Molecular Plant–Microbe Interact* 16:760–768.

Upadhyay RK, Strobel GA, Coval SJ, Clardy J (1990) Fijiensin, the first phytotoxin from *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of black Sigatoka disease. *Experientia* 46: 982-984.

Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annual Review Phytopathology* 40:252-285.

Yoder OC (1980) Toxins in pathogenesis. *Annual Review Phytopathology* 18:103-129.

You BJ, Lee MH, Chung K (2008) Production of cercosporin toxin by the phytopathogenic *Cercospora* fungi is affected by diverse environmental signals. *Canadian Journal Microbiology* 54:259–269.