COMPARAÇÃO MORFOLOGICA, PATOGENICA,
ELETROFORETICA DE *Exserohilum turcicum* (PASS.)
SUGGS., ISOLADO DE MILHO, SORGO E CAPIM MASSAMBARA

ERNA ELISABETH BACH

Bacharel Química

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz
de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre em
Agronomia - Área de
concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Bach, Erna Elisabeth

b118c Comparação morfológica, patogênica, serológica e eletroforética de Exserohilum turcicum (Pass.) Leonard & Suggs., isolado de milho, sorgo e capim massambará. Piracicaba, 1991.
137p. illus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

. Capim massambará - Doença 2. Fungo fitopatogênico
3 Mancha foliar em capim massambará 4. ~~mancha foliar~~
~~em milho~~ 5. ~~mancha foliar~~ em sorgo 6. Milho - Doença 7.
Sorgo - Doença I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz, Piracicaba

CDD 632.44

COMPARAÇÃO MORFOLOGICA, PATOGENICA, SEROLOGICA E
ELETROFORETICA DE *Exserohilum turcicum* (PASS.) LEONARD &
SUGGS., ISOLADO DE MILHO, SORGO E CAPIM MASSAMBARA.

ERNA ELISABETH BACH

Aprovada em 20/09/1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

ESALQ/USP

Prof. Dr. ERIC BALMER

ESALQ/USP

Dr. ALUISIO PAIVA DE CARVALHO ALBA

Inst. Biológico

Prof. Dr. HIROSHI KIMATI
orientador

Aos meus filhos Edgar e Eric,
durante minha ausência.

Ao meu marido,
pelo carinho e apoio.

A minha mãe,
pela compreensão.

DEDICO.

Amizade! misterioso vínculo da
alma!

Adoçante da vida, argamassa
da sociedade!

Robert Blair

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos,

Ao Prof. Dr. HIROSHI KIMATI, pela orientação, apoio e incentivo dispensados à realização deste trabalho.

Ao Prof. CLELIO SALGADO pelo apoio e compreensão durante o Curso de Pós-graduação.

Ao Dr. ALUISIO P. C. ALBA, Pesquisador Científico do Instituto Biológico, pelas sugestões em serologia.

A OLGA RUSSOMANO, Pesquisadora Científica do Instituto Biológico, pelo auxílio prestado nos primeiros isolamentos do fungo.

Ao Dr. CARLOS CASTRO, Pesquisador da EMBRAPA, pela sugestão e auxílio na extração do DNA do fungo.

Ao Eng. Agr. IVAN C. RESENDE da Firma AGROCERES, e ao Eng. Agr. ALEXANDRE S. FERREIRA do Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo, pelo envio de material foliar infectado e sementes de sorgo e milho.

Ao Dr. PAULO B. ALCANTARA e VALQUIRIA ALCANTARA, Pesquisadores Científicos do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pelo fornecimento de sementes de capim massambará.

Ao Dr. SERGIO VIANNA, da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico de São Paulo, pelo auxílio prestado na confecção das fotos.

A DENIZA PALAZZO, Pesquisadora Científica do Instituto Biológico, pela colaboração prestada na revisão dos originais.

A Diretoria e Assessoria do Instituto Biológico de São Paulo, pelo empréstimo do computador.

Ao meu primo HENRIQUE GORTE, pelo apoio e colaboração prestada na revisão dos originais.

A FLORINDA NAIDE MAGLIO e SILVANA D'AGOSTINI da Seção de Desenho do Instituto Biológico de São Paulo, pela confecção das figuras.

A Seção de Meios de Cultura do Instituto Biológico de São Paulo, no preparo de meios.

A TEREZINHA DE CASTRO, Pesquisadora Científica do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, pelo fornecimento de drogas para eletroforese.

A MIRIAM CRISTINA DE SANTIS, estagiária da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pelo auxílio na execução dos trabalhos.

Ao CELSO BEZERRA DE JESUS, MARIA ANISIA MATOS DA SILVA, MARLY DA SILVA, e MARCELO DE LUCCA FIGUEIREDO, funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica, pelo auxílio na manutenção de plantas e coelheira.

A todo Corpo Docente e demais colegas do curso de Pós-graduação em Fitopatologia do Depto. de Fitopatologia da ESALQ, pela acolhida.

A CAPES, pelo auxílio financeiro prestado.

Aos colegas da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo e a todos que, diretamente ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

A DEUS e a toda FORÇA OCULTA, pelo apoio em todos os momentos.

SUMARIO

Página

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xvi
LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	xxii
RESUMO.....	xxiv
SUMMARY	xxvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Taxonomia e Nomenclatura do fungo.....	4
2.2. Patogenicidade.....	7
2.3. Serologia	12
2.4. Eletroforese	
2.4.1. Enzimas e proteínas.....	19
2.4.2. DNA.....	32
3. MATERIAIS E METODOS	
3.1. Materiais	
3.1.1. Patógeno	30
3.1.2. Plantas.....	32

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamentos de <i>Exserohilum turcicum</i> ...	32
3.2.2. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de <i>Exserohilum turcicum</i>	
3.2.2.1. Determinação da idade ideal da cultura para esporulação.....	33
3.2.2.2. Determinação da esporulação com o número de repicagens....	35
3.2.2.3. Determinação da fonte de carboidrato ideal para esporulação e/ou crescimento	36
3.2.2.4. Tamanho dos conídios.....	37
3.2.3. Patogenicidade	
3.2.3.1. Preparação da suspensão de conídios.....	38
3.2.3.2. Cultivo do milho, sorgo e capim massambará.....	38
3.2.3.3. Inoculação das plantas.....	38
3.2.4. Eletroforese	
3.2.4.1. Crescimento dos isolados de <i>Exserohilum turcicum</i> em meio líquido.....	40
3.2.4.2. Extração de proteínas dos isolados de <i>Exserohilum turcicum</i>	41
3.2.4.3. Determinação da concentração de proteínas nas amostras.....	41

3.2.4.4.Preparo do Gel de Poliacrilamida	43
3.2.4.5.Aplicação das amostras e corrida eletroforética.....	45
3.2.4.6.Coloração.....	45
3.2.4.7.Extração do DNA.....	46
3.2.4.8.Preservação dos géis.....	49
3.2.4.9.Análise do perfil eletroforético	50
3.2.5.Serologia	
3.2.5.1.Extração de antígenos.....	50
3.2.5.2.Produção de antissoros.....	54
3.2.5.3.Testes serológicos.....	55

4.RESULTADOS

4.1. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de <i>Exserohilum turcicum</i>	58
4.1.1. Determinação da idade ideal da cultura para esporulação.....	58
4.1.2. Determinação da esporulação com o número de repicagens.....	58
4.1.3. Determinação da fonte de carboidrato ideal para esporulação e/ou crescimento	66
4.1.4. Tamanho dos conídios.....	73
4.2. Testes de patogenicidade.....	73
4.3. Eletroforese	
4.3.1. Enzimas	79
4.3.1.1.Esterase.....	79
4.3.1.2.F oxidase.....	80

4.3.2. DNA.....	85
4.4. Serologia	
4.4.1. Teste de Duchterlony.....	88
4.4.2. Teste de ELISA.....	90
5. DISCUSSAO	
5.1. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de Exserohilum turcicum.....	95
5.2. Patogenicidade.....	100
5.3. Eletroforese.....	102
5.4. Serologia.....	107
5.5. Considerações finais.....	111
6. CONCLUSOES.....	114
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	116

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N.		PAGINA
01	Diâmetro médio e esporulação de <i>Exserohilum turcicum</i> isolado de milho (número 10) em diferentes meios (A-BDA, B-LCH) e, diferentes idades	63
02	Diâmetro médio e esporulação de <i>Exserohilum turcicum</i> isolado de capim (número 5) em diferentes meios (A-BDA, B-LCH) e, diferentes idades	64
03	Diâmetro médio e esporulação de <i>Exserohilum turcicum</i> isolado de sorgo (número 15) em diferentes meios (A-BDA, B-LCH) e, diferentes idades	65
04	Concentração da suspensão de conídios ⁵ (número de conídios .10 /ml) dos isolados de sorgo(A), capim(B) e milho(C) em meios BDA e LCH no decorrer das repicagens	71
05	Inoculação de diferentes isolados de <i>Exserohilum turcicum</i> em hospedeiros de milho(B), sorgo(C) e capim massambará(D). Escala de notas (A)	78

- 06 Diagrama eletroforético em gel de poliacrilamida de isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho do Brasil, de milho dos Estados Unidos, do capim e, do sorgo. Gel corado para a visualização das isoenzimas da esterase 81
- 07 Densitometria do padrão de esterase de isolados de *Exserohilum turcicum* de milho do Brasil (MB), milho dos Estados Unidos (ME), sorgo (S) e, capim (C). Leitura com filtro 545nm 82
- 08 Diagrama eletroforético em gel de poliacrilamida (5-7%) de isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho do Brasil, de milho dos Estados Unidos, do capim e, do sorgo. Gel corado para a visualização das isoenzimas da peroxidase. (IG) intersecção entre os géis concentrador e de corrida 83
- 09 Densitometria do padrão de peroxidase de isolados de *Exserohilum turcicum* de milho do Brasil (MB), milho dos Estados Unidos (ME), sorgo (S) e, capim (C). Leitura com filtro 545nm 84

- 10 Diagrama eletroforético em gel de poliacrilamida dos isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho do Brasil (MB), de milho dos Estados Unidos (ME), do capim (C) e, do sorgo (S). Gel corado pelo método de prata para DNA 86
- 11 Eletroforese em gel de poliacrilamida dos isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho do Brasil (MB), de milho dos Estados Unidos (ME), do capim (C) e, do sorgo (S). Géis corados para a visualização das isoenzimas de peroxidase (1), esterase (2) e, DNA (3) 87
- 12 Resultados do DAS-ELISA (A405) envolvendo antissoros para conídios de isolados de milho (A) e capim (C) contra antígenos obtidos de conídios de isolados de capim, milho e sorgo de *Exserohilum turcicum* na concentração de 600ug em equivalentes de SAB/ml 94

LISTA DE TABELAS

TABELA N.		PAGINA
01	Relação dos isolados de <i>Exserohilum turcicum</i> utilizados	31
02	Crescimento e esporulação do fungo <i>Exserohilum turcicum</i> isolado de milho, desenvolvido em meio de LCH	59
03	Crescimento e esporulação do fungo <i>Exserohilum turcicum</i> isolado de capim e sorgo, desenvolvido em meio LCH	60
04	Crescimento e esporulação do fungo <i>Exserohilum turcicum</i> isolado de milho, desenvolvido em meio BDA	61
05	Crescimento e esporulação do fungo <i>Exserohilum turcicum</i> isolado de capim e sorgo, desenvolvido em meio BDA	62
06	Concentração de conídios nas suspensões dos isolados de milho, nos meios BDA (B) e LCH (L) no decorrer de 7 repicagens	67
07	Concentração de conídios nas suspensões dos isolados de milho, nos meios BDA (B) e LCH (L) entre 8 e 14 repicagens	68
08	Concentração de conídios nas suspensões dos isolados de capim e sorgo, nos meios de BDA (B) e LCH (L) no decorrer de 7 repicagens	69

- 09 Concentração de conídios nas suspensões dos isolados de capim e sorgo, nos meios de BDA (B) e LCH (L) entre 8 e 14 repicagens 70
- 10 Crescimento e esporulação dos isolados de *Exserohilum turcicum* em meios contendo diferentes fontes de carbono, incluindo os meios de BDA e LCH 72
- 11 Dimensões dos conídios de *Exserohilum turcicum* isolados de milho 74
- 12 Resultados das inoculações de plantas de milho, sorgo e capim massambará, com isolados de *Exserohilum turcicum* 77
- 13 Resultados observados em teste de Ouchterlony utilizando antissoros obtidos a partir de micélios e conídios, em reação com antígenos extraídos do micélio e conídios dos isolados de *Exserohilum turcicum* 89
- 14 Resultados do DAS-ELISA (A405) envolvendo antissoros para micélios de isolados de milho e capim de *Exserohilum turcicum*, e antígenos obtidos de micélios de isolados de capim, milho e sorgo na concentração de 600ug em equivalentes de SAB/ml 92

- 15 Resultados do DAS-ELISA (A405) envolvendo antissoros para conídios de isolados de milho e sorgo de *Exserohilum turcicum*, e antígenos obtidos de conídios de isolados de capim, milho e sorgo na concentração de 600ug em equivalentes de SAB/ml

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA N.		PAGINA
01	Extração de proteínas à partir de micélio de fungos para análise eletroforética	42
02	Extração e digestão DNA à partir de micélio de fungos	48
03	Extração de antígenos à partir de micélios dos isolados de <i>Exserohilum turcicum</i>	51
04	Extração de antígenos à partir de conídios dos isolados de <i>Exserohilum turcicum</i>	53

LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS

PLANTAS

Nome Científico	Nome vulgar
Allium cepa L.	cebola
Avena sativa L.	aveia
Eucaliptus pellita L.	eucalipto
Fragaria spp.	morango
Hordeum vulgare L.	cevada
Oriza sativa L.	arroz
Shorghum vulgare Pers.	sorgo
Shorghum halepense (L.) Pers.	capim massambará
	Johnson grass
Shorghum vulgare var. sudanense	
(Piper) Hitche.	capim Sudão
	Sudan grass
Solanum tuberosum L.	batata
Triticum aestivum L.	trigo
Zea mays L.	milho

MICROORGANISMS

Ascochyta phaseolorum Sacc.

Aspergillus nidulans (Eidam) Wint

Aspergillus niger V. Tiegh.

Bipolaris turcicum (Pass) Shoemaker

Botrytis allii Munn

Botrytis cinerea Pers

Botrytis squamosa Walker

Bremia lactucae (Mich.)

Chaetomium aureum (Ames)

Colletotrichum falcatum Went

Colletotrichum graminicola (Ces.) Wils (Sensu Arx, 1957)

Colletotrichum graminicola f.sp. *sacchari* Mess. Laf & Mol.

Colletotrichum graminicola f.sp. *sorghii* Mess. Laf & Mol.

Colletotrichum graminicola f.sp. *zeae* Mess. Laf & Mol.

Cronartium quercuum (Berk) Miyabe ex. Shirai f.sp.
banksianae

Cryphonectria cubensis (Bruner) Hodges

Cryphonectria parasitica (Murr.) Barr

Drechslera erythrospilum (Drechs.) Shoem.

Drechslera teres (Sacc.) Shoem.

Erysiphe graminis de Candole

Erysiphe graminis f.sp. *hordei* Candole

Exserohilum turcicum (Pass.) Leonard & Suggs

- Fomes annosus* (Fr) Kaarst
Fusarium moniliforme (Schl) Sn. & Hn. var. *subglutinans*
 (Schl) Sn. & Hn.
Fusarium oxysporum (Schlect) Sn. & Hn.
Fusarium oxysporum f.sp. *conglutinans* (Schl.) Sn. & Hn.
Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* (E.F.Sn.) Wr. & Reink.
Fusarium oxysporum f.sp. *elaeidis* Toovey
Fusarium oxysporum f.sp. *lupini* (Linf.) Sn. & Hn.
Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Synd & Hn.
Fusarium oxysporum f.sp. *melonis* Synd & Hans.
Fusarium oxysporum f.sp. *pisi* (Schl.) Sn. & Hn.
Helminthosporium australiense (Dresch.) Leon. & Suggs
Helminthosporium cynodontis (Drechs.) Leon. & Suggs
Helminthosporium hawaiiense (Drechs.) Leon. & Suggs
Helminthosporium nodulosum (Drechs.) Leon. & Suggs
Helminthosporium soghicola (Drechs.) Leon. & Suggs
Helminthosporium spiciferum (Drechs.) Leon. & Suggs
Helminthosporium rostratum Dreschler
Helminthosporium velutinum (Link) Gray
Helminthosporium turcicum Pass.
Hemiléia vastatrix (Berk & Br)
Microcyclus ulei (P. Henn) v. Arx.
Nectria haematococca (Mart.)
Neurospora crassa Falk
Neurospora intermedia Falk
Neurospora sitophilia Falk

Peridermium harknessi Moore
Phytophthora cactorum (Leb & Cohn) Schroet
Phytophthora cinnamomi Rands
Phytophthora citrophthora (R.E.Sm. & E.H.Sm.) Leonian
Phytophthora infestans (Mont.) de Barry
Phytophthora fragariae Hickman
Phytophthora palmivora (Butl.) Butl.
Puccinia chondrillina Bubak and Syd.
Puccinia coronata Corda f.sp. *avenae* Erikss.
Puccinia coronata f.sp. *festucae* Erikss.
Puccinia coronata f.sp. *lollii* Erikss.
Puccinia graminis Pers. f.sp. *avenae* Erikss. and Henn.
Puccinia graminis Pers. f.sp. *secalis* Erikss. and Henn.
Puccinia graminis Pers. f.sp. *tritici* Erikss. and Henn.
Puccinia helianthi Schw.
Puccinia hieracii (Roehling) Mart.
Puccinia menthae Pers.
Puccinia oxalidis Diet and Ell.
Puccinia recondita f.sp. *bromina* Erikss.
Puccinia recondita Rob.ex.Desm. f.sp. *tritici* Erikss and Henn.
Puccinia sorghi Schw.
Puccinia striiformis Westend
Puccinia versicolor Diet and Holw.
Pyricularia oryzae Cavara
Pythium Prings.

Setosphaeria turcica (Luttrell) Leonard & Suggs
Suillus tomentosus (Kauffm.) Singer, Snell & Dick
Trichometasphaeria turcica Luttrell
Uromyces appendiculatus (Pers.) Unger.
Ustilago maydis (DC) Cda.
Verticillium alboatrum (Isaac)
Verticillium dahliae Reink
Verticillium lecanii Reink
Verticillium tricorpus (Isaac)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AG	Agroceres
BDA	batata-ágar-dextrose
LCH	lactose-caseína hidrolisada
PS.....	pêso seco
PF.....	pêso fresco
TRIS.....	tris-hidroxí-amino-metano
PVP.....	polivinilpirrolidona
SAB.....	soro albumina bovina
AA.....	acrilamida
BIS.....	metileno-bis-acrilamida
TEMED....	tetrametildiamina
v/v.....	volume/volume
Sn.....	sobrenadante
Sn1.....	sobrenadante-1
Sd.....	sedimento
Eq.	equivalentes
ELISA....	"enzyme-linked immunosorbent assay"
Ag.....	antígeno
AS.....	antissoro
SN.....	soro normal
IgG.....	imunoglobulina G

PBS..... tampão fosfato salina

DNA..... ácido desoxiribonucleico

RNase enzima ribonuclease

EDTA..... etileno diamino tetra acético

COMPARAÇÃO MORFOLOGICA, PATOGENICA, SEROLOGICA E
ELETROFORETICA DE *Exserohilum turcicum* (PASS.) LEONARD &
SUGGS., ISOLADO DE MILHO, SORGO E CAPIM MASSAMBARA.

Autora: ERNA ELISABETH BACH

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

RESUMO

Foram feitas comparações morfológicas, patogênicas, serológicas e eletroforéticas, de isolados de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. de diferentes hospedeiros (milho, sorgo e capim).

Morfológicamente, os conídios dos isolados de capim apresentaram-se significativamente maiores do que os dos isolados de milho e sorgo em relação aos diâmetros.

Testes de patogenicidade em milho, sorgo e capim massambará, mostraram que: isolado de milho dos Estados Unidos com lesão somente no milho, pode ser classificado como *Exserohilum turcicum* f.sp. *zeae*; e que isolados de sorgo, virulentos ao milho, sorgo e capim massambará podem ser classificados como *Exserohilum turcicum* f.sp. *complexa*; entretanto isolados de milho do Brasil, patogênicos ao milho e ao sorgo; e isolados de capim virulentos ao capim, fracamente virulentos ao milho e avirulentos ao sorgo não podem ser enquadrados em nenhuma forma especial descrita.

Os testes de dupla-difusão em ágar de antígenos extraídos de conídios e\ou micélios não conseguiram detectar qualquer distinção serológica entre os isolados.

No teste de ELISA o antissoro do isolado de milho distinguiu os isolados de milho e sorgo dos isolados de capim. O antissoro do isolado de capim distinguiu isolados de capim dos de milho e sorgo, sendo que aparentemente os de sorgo apresentaram-se como intermediários.

Análises eletroforéticas isoenzimáticas envolvendo esterase e peroxidase permitiram diferenciar os isolados entretanto, somente foi possível associar os resultados de serologia com a eletroforese-esterase.

Através da extração do DNA, digestão com enzima de restrição HpaI e análise eletroforética com coloração por prata, foi possível observar que o tamanho dos DNAs de todos os isolados foram iguais.

Os resultados sugerem que testes serológicos e eletroforéticos podem auxiliar no estudo taxonômico para análise de variação inter-específica (ou inter-forma especial).

MORPHOLOGICAL, PATHOGENIC, SEROLOGICAL AND ELECTROPHORETIC
COMPARISONS OF *Exserohilum turcicum* (PASS.) LEONARD &
SUGGS., ISOLATED FROM MAIZE, SORGHUM AND JOHNSON GRASS.

Author: ERNA ELISABETH BACH

Adviser: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

Morphological, pathogenic, serological and electrophoretic comparisons were made among isolates of *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. from maize, sorghum and Johnson grass.

Concerning morphology, it was observed that diameters of conidia of Johnson grass isolates were significantly larger than those of maize and sorghum.

In laboratory and greenhouse conditions, plants from maize, sorghum and Johnson grass inoculated with isolates of *Exserohilum turcicum* showed: isolate of maize from the United States produced lesions only in maize stating that this isolate can be considered as *Exserohilum turcicum* f. sp. *zeae*; isolates of sorghum were virulent to sorghum, maize and Johnson grass stating that these isolates can be considered as *Exserohilum turcicum* f. sp. *complexa*; isolates of maize from Brazil were pathogenic to maize and sorghum; isolates of Johnson grass were virulent only to Johnson grass, inducing flecks to maize and avirulent to

sorghum. These observations concerning isolates of maize from Brazil and of Johnson grass suggest that they can not be treated of *formae speciales*.

Serological reactions in agar double diffusion tests with antigens extracted from conidia and mycelium did not distinguish any isolate from the others.

In the DAS-ELISA test it was observed that antiserum produced against isolates of maize distinguished isolates of maize and of sorghum from isolates of Johnson grass. The antiserum produced against isolates of Johnson grass distinguished isolates of Johnson grass from isolates of maize and sorghum, and revealed that apparently isolates of sorghum are intermediaries.

Electrophoretic analysis with the isoenzymatic variation (peroxidase and esterase) differentiated the isolates however only the results from electrophoretic-esterase could be associated with serological results.

DNA extraction, digestion with HpaI enzyme, electrophoretic analyses and silver coloration demonstrated that the sizes of DNA from all isolates are the same.

The results suggest that serological and electrophoretic tests can help the taxonomic studies in the analyse of inter-specific (or inter-*formae speciales*) variations.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs, classificado anteriormente como *Helminthosporium turcicum* Pass., é responsável pela mancha foliar em milho, sorgo e capim (BHOWMIK e PRASADA, 1970).

Em milho, nos Estados Unidos o ataque deste fungo causa uma importante doença com 40 % de perda nos híbridos suscetíveis (BOWEN e PEDERSEN, 1988). No Brasil, a ocorrência do fungo é frequente, encontrando-se relatos de sua incidência em quase todas as zonas de cultivo de milho pipoca, não se tendo até o presente uma estimativa dos prejuízos acarretados. Assim, mesmo sendo uma das principais doenças da folha de milho, o seu estudo é muito raro (BALMER, 1978; FRDSI e BALMER, 1980a,b; ISSA, 1983).

Em sorgo, em consequência do ataque do fungo *Exserohilum turcicum*, a produção na África foi reduzida em 40% (HENNESSY et alii, 1990). No Brasil, não há relatos de perda.

Para capim, não há descrição sobre o prejuízo causado entretanto, há indícios de mudança na palatibilidade do capim para os animais, mudança esta provavelmente causada por ataque do fungo (SHREE e REDDY, 1986).

Diante de vários ataques causados pelo fungo *Exserohilum turcicum*, vários autores se preocuparam em estudar através da morfologia e patogenicidade, a presença ou não de raças. Os primeiros trabalhos sobre o assunto foram realizados por MITRA (1923) observando através da morfologia, serem os isolados de sorgo idênticos aos isolados de milho entretanto, os isolados de milho não infectavam sorgo e vice-versa. LEFEBVRE e SHERWIN (1945) trabalhando com vários isolados de *Helminthosporium turcicum* identificaram 4 raças através da patogenicidade sendo uma infectando Sudan grass e milho; outra infectando Sudan grass e sorgo; outra infectando milho e; outra infectando Johnson grass. Já em 1970, BHOWMIK e PRASADA (1970) reconheceram a presença de duas raças uma envolvendo isolados de milho e capim Sudão atacando Milho, Capim Sudão e Capim massambará; e; outra com isolados de sorgo atacando todas as variedades. CHIANG et alii (1989) classificaram os isolados de Capim massambará perante a inoculação em hospedeiros em 4 tipos como: o primeiro virulento a Capim massambará e sorgo; o segundo virulento ao Capim massambará; o terceiro virulento ao sorgo e o quarto fracamente virulento ou avirulento ao Capim massambará e sorgo.

Os sintomas da doença, podem ocorrer em qualquer parte da folha, caracterizando-se por lesões necróticas alongadas de formato elíptico com comprimento variável de 2,5 a 15 cm. Em condições de umidade de 100%, as lesões produzem grande quantidade de conídios, podendo estes ser disseminados pelo vento ou por respingos de chuva. Os conídios quando observados em microscópio, após crescimento em meio de cultura, apresentam-se retos ou ligeiramente curvos, cor verde-oliva a cinza, com hilo externo e protuberante pertencente ao gênero *Exserohilum* (LEONARD e SUGGS, 1974). Para o fungo *Exserohilum turcicum* o tamanho dos conídios situam-se em torno de 50-144 x 18-33 um (MUCHOVEJ et alii, 1988) ou entre 55-125 x 12,5-22,8 (BERGQUIST e MASIAS, 1974).

Do ponto de vista dos prejuízos causados pelo patógeno, presença de raças e, a extensão do cultivo de milho e sorgo em novas áreas nos recentes anos, torna-se necessário, no Brasil, a informação sobre a especialização fisiológica entre os isolados do patógeno parasitando diferentes hospedeiros, auxiliando assim no controle da doença.

Com base no exposto, o presente trabalho foi desenvolvido no sentido de avaliar através da morfologia, patogenicidade, serologia e técnicas eletroforéticas, o comportamento do fungo *Exserohilum turcicum* isolado de diferentes hospedeiros (milho, sorgo e capim).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia e Nomenclatura do fungo

O fungo *Helminthosporium* foi descrito pela primeira vez por LINK em 1809 baseando em *Helminthosporium velutinum* sendo o gênero confirmado em 1821 por S.F.GRAY (SHOEMAKER, 1959).

HUGHES (1953) observou uma clara distinção na formação de conídios de algumas espécies do fungo que parasitavam espécies de gramíneas sendo formados no ápice do conidióforo enquanto que o tipo genérico produzia conídios no ápice e na lateral. Mais tarde, HUGHES (1958) apresentou uma relação de algumas espécies que ficaram mantidas no gênero de *Helminthosporium*, excluindo as espécies graminícolas.

LUTTRELL (1957) observou a presença do hilo protuberante no *Helminthosporium turcicum* e *Helminthosporium rostratum* referindo-se a *Leptosphaeria* como sendo a fase ascógena. Sómente em 1958, LUTTRELL estudando o estágio perfeito de *Helminthosporium turcicum*, utilizando fragmentos de folhas de milho, sorgo e outras, em meio de cultura de Sachs., observou que a fase perfeita estava mais relacionada com o gênero *Trichometasphaeria turcica*.

SHOEMAKER (1959) estudando a taxonomia de alguns fungos graminícolas propôs uma distinção em relação à germinação de conídios em *Drechslera*, *Bipolaris* e *Helminthosporium*. O *Bipolaris* foi diferenciado da *Drechslera* por exibir germinação bipolar e conídios fusóides enquanto que a *Drechslera* germina por um dos polos apresentando conídios cilíndricos. Dessa maneira, ambos os gêneros produziam conídios no ápice diferindo do *Helminthosporium* "sensu strictu" onde conídios eram formados no ápice e nos lados dos conidióforos. Em relação ao *Helminthosporium turcicum* este foi classificado como *Bipolaris turcicum* (Pass.) Shoemaker, 1959.

Em 1974, LEONARD e SUGGS analisando os conídios do gênero *Bipolaris* através da patogenicidade e morfologia da fase conidial e ascógena, agrupou as espécies com hilo protuberante no gênero *Exserohilum* como fase imperfeita, e *Setosphaeria* como fase perfeita.

Dessa maneira, o *Helminthosporium turcicum* passou a ser denominado de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs (fase imperfeita) e *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs (fase perfeita).

CHAN e FAN (1986) trabalhando com isolados de *Exserohilum turcicum* de milho e milho pipoca, estudando a morfologia, formação da fase perfeita e hifa germinativa, observaram que os isolados formavam pseudotécios de *Setosphaeria turcica* em meio de cultura Sachs utilizando

fragmentos de folhas de milho, comprovando dessa maneira, o trabalho de LEONARD e SUGGS(1974). Entretanto, em relação ao tamanho dos conídios, estes foram similares mas, em relação ao tamanho dos conidióforos, estes foram significativamente diferentes, sendo o isolado do milho maior do que o do milho pipoca .

MUCHOVEJ et alii (1988) demonstraram em sua revisão os critérios para separar as espécies *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*, através de chaves fornecendo características dos conídios. Em relação a *Exserohilum turcicum*, este foi classificado por possuir septos e os conídios não escurecidos; conídios retos ou ligeiramente curvos; conídios maiores que 18 um de diâmetro, e menores que 150 um de comprimento; conídios de coloração uniforme e mais espessos que 25 um.

No "Compendium of Corn Diseases (1976)" foi citado que os conídios de *Exserohilum turcicum* possuem cor verde-oliva a cinza, ligeiramente curvos, com hilo protuberante, e dimensão de 20 x 105 u.

ALCORN (1988) cita que as segregações das espécies graminícolas em *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum* não estão sendo bem aceitas universalmente. Entretanto, atualmente, as espécies estão sendo referenciadas em muitas revistas como *Exserohilum* e daí sugere-se o uso da mesma.

Na revisão, o autor descreve os critérios para a diferenciação de *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum* segundo tipo do conídio, hilo, germinação, tubo germinativo, e ontogenia do septo.

2.2. Patogenicidade

Desde o primeiro reconhecimento morfológico do isolado de *Helminthosporium turcicum* de sorgo (*Shorghum vulgare* Pers.), sendo idêntico ao isolado de *Helminthosporium turcicum* em milho (*Zea mays* L.), MITRA (1923) observou através da patogenicidade que o isolado de milho não infectava sorgo e vice-versa. Já em 1945, LEFEBVRE e SHERWIN, agruparam culturas de *Helminthosporium turcicum* em quatro raças, sendo uma infectando capim Sudão (*Shorghum vulgare* var. *sudanense* (Piper) Hitchc) e sorgo Atlas; outra infectando capim Sudão e milho; outra infectando milho e; outra infectando somente capim massambará (*Shorghum halepense* (L.) Pers.).

ROBLES (1949) identificou duas raças de *Helminthosporium turcicum* com base nas reações em 10 linhagens de milho. As raças 1 e 2 foram patogênicas ao milho entretanto, a seleção de milho de número 10 da América do Sul foi resistente a raça 2 e não a raça 1. Em relação

8.
a gramíneas, as duas raças foram patogênicas a capim Sudão, milho e, apresentando reação imune com trigo e cevada.

Em testes de inoculação cruzada envolvendo 27 isolados conidiais de *Helminthosporium turcicum* com 8 linhagens de milho, 2 variedades de sorgo e capim Sudão, e uma seleção de capim massambará, ROBERT (1960) encontrou que os isolados diferiam na patogenicidade. Foi observado que os isolados de milho não infectaram variedades de sorgo, e os isolados de sorgo não infectaram o milho. Em relação ao sorgo, capim Sudão e capim massambará, foram citados nove tipos de reações aos diferentes isolados.

RODRIGUES e ULLSTRUP (1962) inocularam 21 isolados de *Helminthosporium turcicum* em seedlings de sorgo (2 variedades), capim Sudão (2 variedades), capim massambará (1 variedade) e, milho (2 linhagens). Oito isolados produziram lesões típicas no milho mas não no sorgo; cinco atacaram sorgo mas não o milho; dois atacaram sorgo e capim Sudão; dois atacaram milho e capim Sudão e; quatro falharam em causar doença. Nenhum dos isolados foi capaz de causar doença no capim massambará. Ficou ainda demonstrado no trabalho que a patogenicidade referente ao milho e sorgo está sob o controle genético dos hospedeiros.

BHOWMIK e PRASADA (1970) identificaram a presença de duas raças de *Helminthosporium turcicum* na Índia. Para isto, elaboraram uma inoculação cruzada envolvendo quatro isolados monoconidiais de *Helminthosporium turcicum* de milho; três isolados de sorgo; e; dois isolados de capim Sudão com os hospedeiros de milho, sorgo, capim Sudão e, capim massambará. Através dos resultados observaram a presença de dois grupos de raças sendo um grupo com os isolados de milho e capim Sudão atacando os hospedeiros de milho, capim Sudão e, capim massambará e, outro grupo com os isolados de sorgo patogênicos a todas as variedades.

Para a demonstração de que a patogenicidade para milho e sorgo resulta de heterocariose e, de que há dois genes envolvidos, cada um específico a um hospedeiro particular, MASIAS e BERGQUIST (1974) caracterizaram através da forma *Trichometasphaeria turcica* Luttrell a heterocariose entre sorgo e milho, e homocariose entre milho, sorgo e capim massambará. Através destas observações, os autores propuseram que os isolados de *Trichometasphaeria turcica* patogênicos somente a um simples hospedeiro fosse denominado de "forma especial" enquanto, o termo "raça" deveria ser reservado para os isolados de fungos de "forma especial" virulentos a um cultivar específico do hospedeiro o qual carrega um gene de resistência.

BERGQUIST e MASIAS (1974) relataram o aparecimento de uma nova raça de *Trichometasphaeria turcica* no Havaí. Este isolado foi virulento em plantas de milho com o gene Ht, e avirulento em plantas com o gene Ht2, pertencendo assim a raça 2 de *T. turcica*. Para resolver a complexidade em relação a especialização dos isolados de milho e sorgo perante os hospedeiros, os autores distinguiram a virulência em forma especial como *T. turcica* f. sp. *sorghii*, e *T. turcica* f. sp. *zeae*.

A partir de 1974, vários autores adotaram a denominação de *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs e *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs para as combinações taxonômicas envolvendo estágios conidial e ascógeno respectivamente, ao invés de *Helminthosporium turcicum*, e *Trichometasphaeria turcica*.

Dessa maneira, HAMID e ARAGAKI (1975), a fim de elucidar a patogenicidade de *Setosphaeria turcica*, analisaram 23 isolados de milho, 13 isolados de sorgo, e 11 isolados de capim massambará em inoculações cruzadas com hospedeiros de milho, sorgo e capim massambará. Dos 23 isolados de milho, quinze foram virulentos ao milho; cinco virulentos ao sorgo e três virulentos a todos. Dos 13 isolados de sorgo, um foi patogênico ao sorgo; oito ao capim massambará e sorgo, e quatro patogênico aos três. Dos 11 isolados de capim massambará, dois foram virulentos ao capim massambará e com indução de "flecks" no sorgo, e os outros nove isolados, virulentos a todos os hospedeiros. A partir

destes resultados os autores sugeriram a presença de 3 grupos de *Setosphaeria turcica*, sendo um como *Setosphaeria turcica* f. sp. *zeae* virulento ao milho; outro como *Setosphaeria turcica* f. sp. *sorghii* virulento ao sorgo e capim massambará, e o terceiro como *Setosphaeria turcica* f. sp. *complexa* atacando milho, sorgo e capim massambará.

No "Compendium of Corn Diseases (1976) está citado que existem raças de *Helminthosporium turcicum* onde isolados de sorgo e capim Sudão não infectam milho, e alguns isolados de milho infectam capim Sudão.

CHIANG et alii (1989) trabalhando com 16 isolados de *Exserohilum turcicum* de capim massambará, e inoculados em hospedeiros de capim massambará e tres híbridos de sorgo, observaram que os isolados responderam diferentemente aos híbridos, sendo que todos apresentaram lesões. Em relação ao capim massambará, 12 isolados produziram lesões necróticas. Dessa maneira, os isolados foram classificados em 4 tipos: virulentos a ambos hospedeiros; virulento ao capim massambará; virulento ao sorgo; e; fracamente virulento ou avirulento a ambos hospedeiros.

Em relação ao milho, antes de 1960, a resistência poligênica foi o tipo de resistência utilizado no controle de *Exserohilum turcicum*. A partir de 1960, um número de fontes de genes dominantes conferindo resistência ao fungo como Ht1, Ht2 e Ht3 foram determinadas. Em

híbridos comerciais nos Estados Unidos tem sido utilizado o gene Ht1 (GEVERS, 1975), e os genes Ht2, Ht3 e Ht4 somente utilizados em experimentos (LEONARD et alii, 1989).

Dessa maneira, isolados de milho avirulentos a linhagens com gene Ht1 foram designados como raça 1; isolados virulentos a linhagens com gene Ht2 designado como raça 2 (BERGQUIST e MASIAS, 1974); isolados de milho virulentos a linhagens com genes Ht2 e Ht3 designado como raça 3 (SMITH e KINSEY, 1980); e, isolados virulentos a linhagens de milho com gene Ht2, Ht3 e HtN foram descritos como raça 4 (THAKUR e LEONARD, 1989).

Entretanto, LEONARD et alii (1989) propôs uma nova designação para as raças de acordo com os genes de resistência. Assim, isolados designados como raça 1 passam a raça 0, indicando a perda de virulência em milho com genes Ht. A raça 2 se torna raça 1 indicando ser virulento a Ht1, e, as raças 3 e 4 tornam-se raça 23 e raça 23N, respectivamente.

2.3. Serologia

A serologia vem sendo utilizada há algumas décadas na detecção de fitopatógenos (fungos, bactérias, vírus), tendo importância na identificação e separação de formas especiais e raças fisiológicas de fungos, auxiliando, desta forma, nos trabalhos de patologia.

TEMPEL (1957) ao tentar diferenciar formas especiais e raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* (Schl.) Sn. & Hn., imunizou coelhos por via intraperitoneal, endovenosa, subcutânea e intramuscular, utilizando diferentes preparações de *Fusarium*. Empregou testes de microaglutinação, microprecipitinas e, de dupla-difusão em ágar. Em microaglutinação verificou que os microconídios aglutinavam facilmente em tubos, mesmo na presença de soro normal, dificultando assim as leituras e impossibilitando o uso do método. Nos testes de precipitina, as reações apareceram nos antissoros e não nos soros normais, havendo, todavia, muitas reações cruzadas. Segundo TEMPEL, o método mais adequado para diferenciar formas especiais foi o de dupla-difusão em ágar. A maioria dos antissoros não diferenciou as formas especiais, mas um antissoro preparado com cultura líquida de *Fusarium oxysporum* f. *pisi* (Schl.) Sn. & Hn., e outro com *Fusarium oxysporum* f. *lupini* (Linf.) Sn. & Hn. foram altamente específicos.

BUXTON et alii (1961) também procuraram separar formas especiais e raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* por métodos serológicos. Para isso imunizaram coelhos com esporos de *Fusarium oxysporum* Sch. f. *cubense* (E.F.SN.) WR. & REINK e, *Fusarium oxysporum* f. *pisi* desintegradas por processo de alternância de temperaturas

(congelamento e aquecimento). Reagindo os antissoros com antígenos de 23 raças e formas especiais destes fungos, obtiveram sucesso na caracterização das mesmas.

MADHOSINGH (1964) comparando serologicamente, através de testes de dupla-difusão em ágar, tres espécies do gênero *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* e, *Fusarium solani*), observou reações cruzadas entre elas, em adição a linhas de precipitação com reação específica a cada uma delas. Foi verificada também uma maior proximidade entre *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliforme* do que entre esses e *Fusarium solani*, dados estes de acordo com a taxonomia morfológica.

GOODING Jr. (1966) trabalhando com o fungo *Fomes annosus* (Fr) Kaerst, observou que através de reações químicas e centrifugação diferencial, diminuía o número de linhas de precipitação nas reações com antígenos purificados, em comparação com antígenos do extrato bruto do fungo.

MORTON e DUKES (1966) utilizando-se de métodos serológicos demonstraram a separação das raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Synd. & Hn., após absorção dos antissoros com os antígenos heterólogos.

AMOS e BURRELL (1967), analisando 8 espécies do gênero *Ceratocystis*, através de técnicas de aglutinação, gel difusão e imunofluorescência, observaram a separação e identificação das espécies morfológicamente semelhantes.

Os primeiros trabalhos de serologia envolvendo fungos fitopatogênicos no Brasil, foram iniciados por FIGUEIREDO (1972).

FIGUEIREDO (1972) identificou *Ascochyta phaseolorum*, através de serologia empregando extratos de esporos como antígeno reagente, e antissoro obtido à partir dos conídios de *Ascochyta* através de injeções intramusculares.

Entretanto, FIGUEIREDO e NAMEKATA (1974) diferenciaram *Ascochyta phaseolorum* de outras espécies de *Ascochyta* morfológicamente semelhantes, através de técnicas como aglutinação, precipitação, imunodifusão e absorção. Os autores, realizaram também estudos sobre a natureza química dos antígenos, e os resultados demonstraram a possibilidade de polissacarídeos serem responsáveis pela reação específica detectado nas paredes do fungo. Foi também verificado que os antígenos extraídos de esporos, produziam antissoros mais específicos do que antígenos extraídos de micélio (FIGUEIREDO et alii, 1977).

TERANISHI et alii (1973) através de testes de dupla-difusão em ágar, diferenciaram três espécies de *Verticillium* (*Verticillium dahliae* Reink., *Verticillium albo atrum* e *Verticillium tricorpus* (Isaac).

KIMATI (1975) imunizando coelhos via intramuscular com suspensões de esporos falcados de *Colletotrichum* obtidos da cana-de-açúcar, milho e sorgo, emulsionados com adjuvante incompleto de Freund, conseguiu identificar por dupla-difusão em ágar o *Colletotrichum falcatum* Went., *Colletotrichum graminicola* f.sp.*zeae* Mess. Laf. e Mol. e, *Colletotrichum graminicola* f.sp.*sorghii* Mess. Laf. e Mol.

ALBA et alii (1976) continuando os estudos iniciados por FIGUEIREDO (1972), estudaram a especificidade de antígenos externos e internos dos conídios de *Ascochyta phaseolorum*, perante antissoros obtidos à partir de suspensões de esporos. Os autores observaram que os primeiros anticorpos produzidos no curso da imunização, são específicos para antígenos externos.

GERALDI e KIMATI (1982) verificaram que isolados de *Colletotrichum graminicola* do trigo, eram também patogênicas à cultivares de centeio e cevada, mas não afetavam o milho, sorgo e aveia. Através da sorologia evidenciaram que *Colletotrichum graminicola* do trigo é distinto dos isolados da cana-de-açúcar (*C. graminicola* f.sp.*sacchari*) e sorgo (*C. graminicola* f.sp.*sorghii*). Dessa maneira, foi sugerido pelos autores a designação de forma especial *secalis*, para os isolados de *Colletotrichum graminicola* do trigo, centeio e cevada.

GHINI e KIMATI (1985), verificaram a ocorrência dos fungos *Botrytis squamosa* Walker, *Botrytis allii* Munn e, *Botrytis cinerea* Pers. associados à queima das pontas e crestamento de inflorescências de cebola, em regiões dos Estados de São Paulo e Santa Catarina. Através da morfologia, espectro de hospedeiros e serologia puderam verificar as diferenças entre as três espécies estudadas.

IGARASHI (1984), analisando 33 isolados de *Colletotrichum* spp. de diferentes cultivares de morango, verificou a ocorrência de resistência ao fungicida Benomil, em 27 destes. Através da sorologia, foi possível demonstrar a ocorrência de diferença significativa entre estes isolados, bem como por meio de patogenicidade e morfologia.

CENTURION (1985) estudando a distinção sorológica entre isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* da cana-de-açúcar e abacaxi, não observou nenhuma diferença, podendo ser pelo fato destes fungos, serem realmente indistinguíveis serologicamente ou pela não adequação da metodologia.

O teste utilizado na maioria dos trabalhos, envolvem o de dupla-difusão em ágar, embora esta metodologia pode às vezes fornecer resultados não satisfatórios, pelo elevado número de linhas de precipitação ou pela ausência de reação. A ausência de reação, é às vezes devido ao fato de

possuir baixa concentração de proteína no antígeno ou no anticorpo, sendo esta não detectada no teste de dupla-difusão, e somente observada através do teste de ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent assay).

O teste de ELISA ou imunoenzimático adotado por CLARK e ADAMS (1977), detecta de 1 a 10ng de proteína/ml, enquanto o de dupla-difusão de 2 a 20ug de proteína/ml., sendo atualmente empregado o teste de ELISA por vários pesquisadores, pela alta especificidade que apresenta (VOLLER et alii, 1979).

CASPER e MENDGEN (1979), adotaram o teste de ELISA, a fim de estimar quantitativamente o fungo *Verticillium lecanii* em folhas de trigo infectadas com ferrugem (*Puccinia striiformis*), sendo impossível através de outro método.

MOHAN (1989), analisou através do teste de ELISA a presença de *Phytophthora fragariae* em morango, além da observação de reação cruzada com espécies de *Pythium*. As reações cruzadas desapareceram após fracionamento dos extratos de raízes de *Fragaria vesca*, infectadas com *P. fragariae*, em coluna de afinidade.

HARRISON et alii (1990) quantificaram *Phytophthora infestans* no tecido foliar de batata através do teste de ELISA, utilizando antissoro obtido do micélio do fungo, e antígeno extraído de folhas de batata infectadas com *Phytophthora infestans*.

Outros trabalhos em que foi utilizada esta técnica com grande sucesso foi relacionado com antígeno comum como é o caso de ALBA et alii (1973, 1983, 1985) trabalhando com *Hemileia vastatrix* e, ALBA e DEVAY (1985) trabalhando com *Phytophthora infestans* e batata.

2.4. Eletroforese

2.4.1. Enzimas e proteínas

A possibilidade de se usar a técnica de eletroforese a fim de separar proteínas extraídas de microorganismos, com o objetivo de identificá-los a nível específico e subespecífico, tem nos últimos anos chamado a atenção de um grande número de pesquisadores.

CHANG et alii (1962) analisaram proteínas solúveis extraídas de *Neurospora* em eletroforese de papel, gel de amido e gel de poliacrilamida. O melhor resultado foi visualizado em gel de poliacrilamida apresentando bandas iguais para *Neurospora sitophila* Falk, *Neurospora intermedia* Falk e, *Neurospora crassa* Falk. Sómente para um mutante da *Neurospora crassa* apareceu uma banda de proteína a mais, diferenciando assim mutantes dentro de *Neurospora*.

CLARE e ZENTMYER (1966) trabalhando com gel de amido, separaram as proteínas de três isolados de *Phytophthora cinnamomi* Rands, um de *Phytophthora citrophthora* (R.E.Sm. & E.H.Sm.) Leonian, e, um de

Phytophthora palmivora (Butl.) Butl. Através da coloração para proteína total os padrões eletroforéticos foram similares para todas as *Phytophthora*. Em relação a atividade enzimática da peroxidase entre os 3 isolados de *P. cinnamomi*, e entre os isolados de *P. palmivora*, os padrões foram idênticos. Para *P. citrophthora* somente a enzima 6-fosfogluconato deidrogenase apresenta padrão idêntico entre os isolados. Entre as espécies foi observada diferença nos padrões enzimáticos existindo uma pequena similaridade entre padrões de peroxidase.

GILL e POWELL (1968) procuraram analisar proteínas de 8 isolados de diferentes raças fisiológicas de *Phytophthora fragariae* Hickman, e um isolado de *P. cactorum* (Leb & Cohn) Schroet através da eletroforese em disco de gel de poliacrilamida. O padrão protéico da *P. cactorum*, foi diferente em relação a *P. fragariae* entretanto, entre os isolados de *P. fragariae* não foi possível observar diferença entre raças ou biótipos. Os autores sugeriram que a não diferenciação de raças através desta técnica, foi atribuída a possibilidade de que raças seja o resultado de resposta do hospedeiro ao fungo.

A mesma técnica foi adotada para *Fusarium*. MEYER e RENARD (1969) analisaram proteína total e esterase de *F. oxysporum* f.sp.*elaeidis* Toovey e, *F. oxysporum* f.sp.*melonis* Snyder e Hans. Para esses dois fungos foram encontrados padrões muito diferentes, sugerindo não-válida a técnica para a identificação. O mesmo foi observado por

GLYNN e REID (1969) trabalhando com 33 isolados de *F. oxysporum* spp..

SHIPTON e MCDONALD (1970) observaram padrões eletroforéticos de proteínas extraídas de *Drechslera erythrospilum* (Drechs.) Shoem. e, *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. Os padrões apresentaram poucas diferenças entre si e foi sugerido não próprio para o estudo taxonômico.

A partir dessas controvérsias, GILL e ZENTMYER (1978) procuraram reinvestigar a separação eletroforética em disco das proteínas extraídas de *Phytophthora*, envolvendo um grande número de isolados de *Phytophthora cinnamomi*, e *Phytophthora cactorum* obtidas de diferentes regiões e hospedeiros. Os resultados, demonstraram que as proteínas extraídas do micélio de 30 isolados de *Phytophthora cinnamomi* e cinco de *Phytophthora cactorum*, apresentaram 22 a 26 bandas respectivamente, e com valores de corrida diferentes. Dessa maneira, os autores concluíram que, a técnica eletroforética poderá ser integrada a outras técnicas para uma precisa identificação da espécie do gênero de *Phytophthora*.

BURDON e MARSHALL (1981) analisaram 11 espécies diferentes de *Puccinia* Pers., e três formas especiais de *P. graminis*, *P. recondita* e *P. coronata*, através da análise de enzimas (esterase, leucina

aminapeptidase, glutamato oxaloacetato transaminase, menadione redutase, malato desidrogenase, fosfoglucose isomerase, fosfoglucomutase) por eletroforese. Comparando as 11 espécies diferentes (*P. chondrillina* Bubak and Syd.; *P. coronata* Corda f.sp. *avenae* Erikss; *P. graminis* Pers. f.sp. *avenae* Erikss. and Henn.; *P. helianthi* Schw.; *P. hieracii* (Roehling) Mart.; *P. menthae* Pers.; *P. oxalidis* Diet and Ell.; *P. recondita* Rob. ex Desm.f.sp. *tritici* Erikss and Henn.; *P. sorghi* Schw.; *P. striiformis* Westend; *P. versicolor* Diet and Holw.) foi observado que poucas bandas enzimáticas são comuns a duas ou mais espécies. O grau máximo de similaridade foi de 12% para *P. coronata*, *P. recondita* e *P. helianthi* enquanto que, para outra *Puccinia* foi de 3,7% a similaridade. Para as formas especiais de *P. graminis* (f.sp. *tritici* Erikss and Henn; f.sp. *avenae*; f.sp. *secalis* Erikss and Henn); de *P. recondita* (f.sp. *tritici*; f.sp. *recondita*; f.sp. *bromina* Erikss) e, de *P. coronata* (f.sp. *avenae*; f.sp. *festucae* Erikss; f.sp. *lolii* Erikss) a similaridade entre bandas enzimáticas foi maior, isto é, 49,2% para *P. coronata*, 33,3% para *P. graminis* e 7,1% para *P. recondita*. Os resultados mostraram que diferenças na eletroforese entre espécies ou formas especiais de *Puccinia* podem ser consideradas para estudo taxonômico (BURDON et alii 1982, 1983).

ALFENAS et alii (1984), trabalhando com 5 isolados de *Cryphonectria cubensis* (Bruner) Hodges, analisaram os padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas em gel de poliacrilamida. Diferenças em esterase, peroxidase, fosfoglucomutase e hexoquinase foram detectadas nos isolados do Havaí, Brasil e África. O mesmo foi observado para proteínas. As diferenças coincidiram com a virulência dos isolados em *Eucalyptus pellita*.

HO et alii (1985) analisaram formas patogênicas e saprófitas de *Fusarium oxysporum* através da eletroforese a fim de determinar se podem ser distinguidas. Foi observado que padrões de proteína e esterase não podem ser utilizados para a distinção devido a sua similaridade.

Segundo LU e GROTH (1987), o estudo das isoenzimas através de eletroforese tem sido utilizada em três áreas distintas: a) na taxonomia de patógenos; b) na melhor interpretação da bioquímica a nível da interação planta-patógeno; c) na caracterização da população genética dos fungos (BURDON e ROELFS, 1985).

LEUNG e WILLIAMS (1986) analisaram o polimorfismo enzimático de *Pyricularia oryzae* Cavara, isolado de 350 amostras de arroz e de 34 gramíneas, através de 12 sistemas enzimáticos encontrando-se 18 bandas. Em relação ao aspartato aminotransferase, fumarase-1, fumarase-2, malato desidrogenase-1, malato desidrogenase-2, xantina desidrogenase, glutamino-pirúvico transaminase e, alfa-esterase, não houve variação. Entretanto, lactato

dehidrogenase-1, e lactato dehidrogenase-2 mostraram diferenças em relação a ausência de bandas para os isolados de arroz. Dessa maneira, os isolados de arroz e gramíneas foram separados em dois grupos.

Segundo BOSLAND e WILLIAMS (1987), as isoenzimas podem ser utilizadas no estudo por serem consistentes no indivíduo, não sendo afetadas por fatores ambientais, demonstrando assim uma considerável diferença entre populações de indivíduos diferentes. Dessa maneira, cada locus de uma enzima pode ser usada como fonte independente para informação taxonômica. Os autores trabalharam com 123 isolados de *Fusarium oxysporum* (Schlect), a fim de determinar não só o polimorfismo enzimático, mas a interrelação com patogenicidade e compatibilidade vegetativa. Dos isolados, 103 foram patogênicos em um ou mais cultivares de crucíferas. Em relação ao polimorfismo enzimático foram encontrados 3 padrões em concordância com a compatibilidade vegetativa. Foi sugerido assim, que *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* ficasse dividido em 3 formas especiais: *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* pertencente a *B. oleraceae*; b) *Fusarium oxysporum* f.sp. *mathioli* pertencente a *Mathiola incana*; c) *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* pertencente a *Raphanus sativus*.

LU e GROTH (1987) analisaram o padrão enzimático em gel de poliacrilamida de 12 isolados de *Uromyces appendiculatus* (Pers) Unger, envolvendo 20 enzimas. Dos isolados, 5 foram idênticos dentro do sistema enzimático, enquanto que 4, diferiram apenas 9%, sendo estes produtores de teliosporos, e os outros 3 não produtores de teliosporos, apresentaram-se diferentes no padrão isoenzimático. Foi sugerido a espécie ser heterogênea, pois parece ter 3 grupos de isolados na mesma amostra.

SZECSI e TOTH (1987) compararam 19 isolados de *Chaetomium aureum* (Ames), através da análise isoenzimática e eletrofocalização das esterases. Dentre os isolados, *Chaetomium aureum* e *Chaetomium trilaterale*, foram eletroforéticamente iguais, enquanto que isolados de *Chaetomium confusum*, *Chaetomium humicola*, *Chaetomium rubrogenum* e *Chaetomium trilaterale*, não foram distinguíveis. Dessa maneira, certas bandas de esterase, foram utilizadas como marcadores de diagnóstico para diferenciar as espécies de *Chaetomium*.

JUNQUEIRA et alii (1987) analisaram os padrões enzimáticos de 7 isolados de *Microcyclus ulei* (P.Henn.) v. Ars, com diferentes níveis de virulência em gel de poliacrilamida. As enzimas coradas foram peroxidase, beta-esterase, malato desidrogenase, lactato desidrogenase, beta-glicosidase, polifenoloxidase, álcool desidrogenase, fosfatase alcalina, tetrazolium oxidase e hexoquinase. Os

padrões de esterase, peroxidase e lactato desidrogenase, diferenciaram respectivamente para 6,4 e 5 isolados. As enzimas malato desidrogenase e hexoquinase diferenciaram respectivamente para 2 e 3 isolados. As enzimas beta-glicosidade, polifenoloxidase, álcool desidrogenase e fosfatase alcalina, apresentaram baixa resolução nos géis. Sómente um isolado HM1 foi avirulento, e não esporulante, tendo padrões enzimáticos diferentes dos demais isolados. Os resultados mostraram uma correlação entre virulência dos isolados de *M. ulei*, e seus padrões isoenzimáticos.

ZHU et alii (1988) analisaram a variabilidade genética intraespecífica, através de isoenzimas do fungo ectomicorrízico *Suillus tomentosus* (Kauffm.) Singer, Snell & Dick, envolvendo 43 isolados e 8 enzimas. Foi observada a presença de 21 bandas no sistema enzimático representando 13 locus onde seis locus são polimórficos, comparando as isoenzimas com o local do isolamento. Duas principais conclusões foram dadas: a) existe uma variação genética intraespecífica em regiões entre e dentro da floresta; b) a variação é maior entre as regiões de floresta do que dentro da floresta.

ADASKAVEG et alii (1988) compararam seis espécies de *Pythium* através da focalização isoelétrica. No pH 4-8 foi observado entre as seis espécies, uma ou mais bandas distintas em adição as comuns. Entre os isolados de cada espécie foi observada pequena variação.

TUSKAN e WALLA (1989), trabalhando com *Peridermium harknessii* Moore, e *Cronartium quercuum* (Berk) Miyabe ex Shirai f.sp. *banksianae* analisaram as isoenzimas envolvidas na identificação destes fungos, através de eletroforese em gel de amido. Foi encontrada uma diferença para catalase e fosfoglucomutase, podendo os dados serem interpretados como heterogêneo, homozigoto para *Peridermium harknessii*, e heterogêneo e heterozigoto para *Cronartium quercuum*.

2.4.2. DNA

Para a elucidação de mecanismos envolvidos na patogênese do fungo e no estudo da variabilidade, estão sendo aplicadas técnicas modernas de genética molecular envolvendo DNA (LEONG e HOLDEN, 1989).

Entre as técnicas para obtenção do DNA recombinante, é destacado: a) preparação de amostras de DNA puro; b) corte de moléculas de DNA; c) análise dos fragmentos de DNA de acordo com o tamanho; d) ligação de moléculas de DNA; e) introdução de DNA em células hospedeiras; f) identificação e seleção de células que contém moléculas do DNA recombinante (BROWN, 1986; CASTRO, 1990).

A pesquisa do DNA recombinante em fitopatógenos, já existe para certos gêneros. Transformação genética já foi obtida para *Ustilago maydis*, *Aspergillus nidulans*, e *Nectria haematococca* (LEONG e HOLDEN, 1989), abrindo desta forma, o caminho para o desenvolvimento de métodos para a análise molecular refinada, e manipulação genética destes fungos.

Para a análise do DNA mitocondrial, ou dos fragmentos de DNA, obtidos pelo uso de enzimas endonucleases, ou por uso de marcadores RFLP (fragmentos de restrição), utiliza-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, ou agarose para determinar a diferenciação entre fungos.

MANICOM et alii (1987) analisaram espécies de *Fusarium* utilizando o DNA e fragmentos de restrição (enzima Hind III), observando em eletroforese padrões diferentes entre isolados de *Fusarium oxysporum*, distinguindo assim as espécies.

HULBERT e MICHELMORE (1988) trabalhando com *Bremia lactucae*, analisaram 25 isolados de diversos locais através da técnica do DNA, com fragmentos de restrição. Dessa maneira, isolados da Europa apresentaram-se diplóides, enquanto que isolados da Austrália, Japão e Califórnia foram poliplóides.

O'DELL et alii (1989) isolaram DNA cromossômico de *Erysiphe graminis* de Candole, isolado de trigo, cevada, arroz e aveia com o objetivo de discriminar os isolados para o melhor controle da doença. Foram observadas diferenças entre isolados de sorgo, trigo, aveia e cevada, indicando presença de sítios diferentes para a restrição, demonstrando serem formas especiais.

Já em 1990, BROWN et alii, apresentaram em um dendograma, a separação de 97 isolados de *E.graminis* f.sp. *hordei* (Candole) uma vez que demonstraram diversidade no tamanho do DNA.

GOBBI et alii (1990) extraíram DNA mitocondrial de *Cryphonectria parasitica* (Murr) Barr, a fim de examinar a migração entre isolados compatíveis. O tamanho do DNA mitocondrial foi avaliado em 144Kb. A migração foi examinada por hibridização, sendo observado que não ocorre migração na presença de anastomose de hifa.

3. MATERIAIS E METODOS

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios e casa-de-vegetação da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo.

3.1. Materiais

3.1.1. Patógeno

Os isolados de *Exserohilum turcicum* utilizados no presente trabalho, foram obtidos por isolamento a partir de folhas de milho, capim e sorgo naturalmente infectadas, oriundas da ESALQ de Piracicaba; do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa; da Firma AGROCERES S/A de Jacarézinho, Pr.; e; do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo de Minas Gerais (Tabela 1). O isolado n.3 proveniente dos Estados Unidos foi obtido junto a Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo enquanto que, o isolado de n.1 foi obtido junto a coleção da Seção de Bioquímica Fitopatológica do mesmo Instituto, ambos mantidos em água destilada estéril. O isolado de n.7 foi proveniente da ESALQ, e primeiramente

Tabela 1: Relação dos isolados de *Exserohilum turcicum* utilizados.

ISOLADOS	HOSPEDEIRO	PROCEDENCIA	DATA DO ISOLAMENTO
1	Milho	Piracicaba, SP.	30/8/86 BqF-85
2	Milho	CNMS, MG.	20/11/89
3	Milho	Purdue University	26/6/72 IB31/72
4	Milho	Piracicaba, SP.	5/8/89
5	Capim Massambará	Piracicaba, SP.	5/8/89
6	Capim Massambará	Nova Odessa, SP.	15/8/89
7	Milho	Piracicaba, SP. ESALQ	-----
8	Capim elefante var. Taiwan A-144	Nova Odessa, SP.	1/10/89
9	Capim massambará	São Paulo	3/10/89
10	Milho	Dourados, MS	1/8/89
11	Milho	Sta. Cruz Palmeiras	1/8/89
12	Milho	Jacarézinho, PR.	1/10/89
13	Milho	Castro, PR.	1/10/89
14	Milho	Pato Branco, PR.	1/10/89
15	Sorgo	CNMS, MG	20/11/89
16	Sorgo	CNMS, MG	2/12/89

passado para a planta de milho e reisolado.

3.1.2. Plantas

As sementes de milho AG-64A e de sorgo AG-C-87.2791 foram fornecidas pela Firma de Sementes Agroceres S/A de Capinópolis, PR. e, as de capim massambará pela Seção de Forrageiras do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa.

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamentos de *Exserohilum turcicum*

Os isolamentos foram realizados à partir de folhas de milho, sorgo e capim massambará, coletados de plantas de campo naturalmente infectadas, apresentando lesões características do fungo *Exserohilum turcicum*.

As partes das folhas foram colocadas em placas de petri, em câmara úmida, a temperatura ambiente durante 24-48 horas de escuro, sendo observado grande número de conídios. Os conídios foram transferidos assépticamente, com auxílio de um microscópio estereoscópio e, uma pipeta Pasteur bem fina à superfície de ágar-água 2%. Após o desenvolvimento da cultura, o fungo foi repicado para placa de petri contendo diferentes meios de cultura.

As culturas foram preservadas em tubos contendo meio inclinado de BAD e água destilada estéril e mantidas a temperatura ambiente (FIGUEIREDO, 1967).

3.2.2. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de *Exserohilum turcicum*

3.2.2.1. Determinação da idade ideal da cultura para esporulação.

Para a determinação da idade mais adequada para esporulação, foram empregados dois meios de cultura sendo batata-ágar-dextrose (BDA) e lactose-caseína hidrolisada (LCH).

Meio de Lactose-Caseína Hidrolisada (TUIITE, 1969)

37,5g de Lactose (marca Merck), 3g de Caseína Hidrolisada (marca Sigma), 1g de KH_2PO_4 (marca Merck), 0,5g de MgSO_4 (marca Merck), 2 ml de microelementos, 15g de ágar Difco foram dissolvidos em 1 litro de água. O pH foi ajustado para pH=6, autoclavado, e distribuído em placas de petri em ambiente estéril.

Microelementos: 723mg de nitrato de ferro com 9 moléculas de água + 439mg de sulfato de zinco com 7 moléculas de água + 203mg de sulfato de manganês com 4 moléculas de água.

Foram utilizadas placas de petri (marca Pyrex) de 10cm de diâmetro e 2cm de altura contendo os meios na razão de 20ml por placa. As repicagens foram feitas utilizando-se como inóculo conídios dos isolados de *Exserohilum turcicum* com 8 dias de crescimento nos próprios meios de BDA e LCH. Em relação aos 2 isolados (n. 1 e 3 - Tabela 1) mantidos em água, os discos foram retirados e colocados primeiramente nos meios até a formação de conídios. Os conídios foram retirados por meio de uma pipeta Pasteur bem fina e, transferidos para o centro das placas empregando-se 14 placas para cada isolado e meio. As placas, assim preparadas, foram colocadas em câmara BOD com temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e escuro.

Para a medida do diâmetro médio da cultura, a primeira leitura foi realizada dois dias após a repicagem sendo depois feita diariamente. Para a esporulação, tomou-se como idade mínima o teste de culturas de 6 dias até o máximo de 9 dias. Os conídios foram removidos do substrato com auxílio de 5 ml de água destilada estéril + 0,05% de Tween 20 (poli-oxietileno sorbitan monolaurato, Sigma Chemical Co.), filtrados em gaze para a eliminação de restos de meio de cultura e pedaços de micélio e, contados no hematócitometro (Improved Newbauer 1/400 SQ. MN. 1/10mm deep ultraplane).

3.2.2.2. Determinação da esporulação com o número de repicagens

Para esta medida também foram utilizados os dois meios BDA e LCH. Dessa maneira, isolados mantidos em água destilada estéril (discos com 5mm de diâmetro em meio BDA e LCH), foram colocados em placas de petri de 10cm de diâmetro e 2cm de altura contendo os meios na razão de 20ml por placa. Após a cada 10 dias foram realizadas as repicagens até completar 14 repicagens. As placas foram transferidas para câmara BOD com temperatura controlada de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e escuro.

A esporulação foi medida aos 8 dias utilizando-se 3 placas/isolado/meio. Os conídios foram removidos do substrato com auxílio de 5 ml de água destilada estéril + 0,05% de Tween 20 e filtrados em gaze. As suspensões assim obtidas foram contadas no hematócitosmetro. Este item não foi realizado com o isolado número 3 por apresentar baixa esporulação em relação aos outros.

Após um período de 3 meses de permanência dos isolados em água destilada estéril, alguns vidros foram abertos, repicados e, analisados quanto a esporulação.

3.2.2.3. Determinação da fonte de carboidrato ideal para esporulação e/ou crescimento

Foram utilizadas três fontes de carboidrato (lactose, glicose e sacarose) na quantidade de 0,5% em peso e incluídos no meio mínimo descrito por PONTECORVO (1953) baseado em :

NaNO₃ -5g ; KCl -0,5g ; MgSO₄ .7H₂O -0,5g; FeSO₄ .7H₂O -1mg; KH₂PO₄ - 3,8mg; ZnSO₄ .7H₂O - 1mg ; Agar Difco - 15g;
 Agua - 1 litro; + fontes de carboidrato.

O meio após autoclavado, foi transferido para placas de petri estéreis de 10cm de diâmetro x 2cm de altura na quantidade de 20 ml/ placa.

Conídios crescidos em meio mínimo sem carboidrato foram transferidos após 10 dias a outra placa contendo também meio mínimo sem carboidrato. Sómente após 10 dias os conídios foram finalmente transferidos para placas contendo meio mínimo e carboidratos. Foram realizadas 3 placas/fungo/meio e duas repetições. Após 8 dias da repicagem procedeu-se a medida do diâmetro médio das culturas e, o cálculo da esporulação, realizado conforme item 3.2.2.1. Em relação ao isolado n.3 não foi possível realizar esta fase pelo motivo de baixa esporulação no meio sem carboidrato.

3.2.2.4. Tamanho dos conídios

Isolados de *Exserohilum turcicum* foram repicados para placas de BDA e mantidos à temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro, durante 8 dias. Após esse período os conídios foram removidos do substrato com auxílio de 10ml de água destilada estéril + 0,05% de Tween por placa. Em seguida a suspensão foi filtrada em gaze estéril e, colocada em lâminas de microscópio sendo observados quanto a ontogênia do septo, e, determinado o tamanho médio dos conídios com auxílio de uma ocular micrométrica, em microscópio Leitz-SM-lux sob aumento de 400X (objetiva 40, ocular 10X-Periplan GF 10X Leitz-Wetzlar). Foram realizadas 50 medidas para cada isolado em três repetições, medindo-se a maior e a menor dimensão, as quais foram consideradas como comprimento (C) e diâmetro (D), respectivamente. As fotomicrografias foram obtidas com uma câmara Leitz VARIO-ORTHOMAT de formato pequeno (24X36mm com fator 0,32), ocular VARIO (12,5X) e fotômetro automático, acoplados ao microscópio Orthoplan da Leitz. O filme utilizado foi FUJICHROME 100 ASAS, "daylight".

3.2.3. Patogenicidade

3.2.3.1. Preparação da suspensão de conídios

Os conídios foram removidos da superfície do substrato BDA, até a sétima repicagem, após 8 dias de crescimento com auxílio de uma alça de vidro e 5ml de água destilada estéril + 0,05% Tween 20. Após filtração, o número de conídios foi calculado com auxílio de um hematocitômetro (Improved Neubauer 1/400 SQ. MN. 1/10mm deep ultraplane) e ajustado para 10.000 conídios/ml. (PEDERSEN et alii, 1986; THAKUR et alii, 1989).

3.2.3.2. Cultivo do milho, sorgo e capim massambará

As sementes de milho, sorgo e capim foram colocadas para germinar em sacos plásticos (900cm³) contendo terra adubada, a razão de 8 sementes por saco. O material foi mantido em casa-de-vegetação até a utilização no estágio de 4 a 5 folhas.

3.2.3.3. Inoculação das plantas

16 plantas de cada variedade (8 plantas por repetição) foram inoculadas com os isolados de *Exserohilum turcicum*, por aspersão, utilizando um aspersor de vidro e tendo como agente propulsor o gás nitrogênio (N₂), numa pressão de 0,25 bars. A suspensão foi aspergida a 40cm de distância da folha, na tentativa de manter a maior homogeneidade da dispersão da suspensão de conídios na folha.

Após inoculação, as plantas foram incubadas 16 horas em câmara úmida (100% UR), escuro e 22°C (THAKUR et alii., 1989). Em seguida, as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação, e mantidas sob condições de temperatura e luminosidade ambiente, até o aparecimento de lesões. A avaliação foi feita segundo uma escala de notas como:

0- Plantas com ausência de sintomas visíveis

1- Presença de pequenas lesões cloróticas de formato alongado [reação tipo Resistente segundo BHOWMIK e PRASADA (1970) e, FROSI e BALMER (1980a)].

2- Presença de lesões necróticas de formato alongado, ao longo das nervuras e tamanho variável. Ausência de murchamento. [reação tipo Medianamente Resistente segundo BHOWMIK e PRASADA (1970) e FROSI e BALMER (1980a)].

3- Presença de lesões necróticas, murchamento e seca na parte distal das folhas contendo lesões [reação tipo Suscetível segundo BHOWMIK e PRASADA (1970) e FROSI e BALMER (1980a)].

4- Presença de folhas totalmente secas e plantas com sintoma de murchamento total.

3.2.4. Eletroforese

3.2.4.1. Crescimento dos isolados de *Exserohilum turcicum* em meio líquido

Os isolados de *Exserohilum turcicum* foram cultivados em meio líquido com o objetivo de extrair proteínas e analisar o perfil eletroforético.

Para isto, 5 erlemeyers de 125ml, contendo 30ml de meio líquido de batata-dextrose, foram inoculados com cada isolado de *Exserohilum turcicum*. A repicagem foi feita empregando-se um cilindro de 5mm de diâmetro de meio de cultura BAD contendo o fungo, retirados por meio de um furador de rolhas, da parte periférica da cultura. Os erlemeyers assim preparados foram mantidos em câmara de BOD com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 dias.

Após o período de incubação, o micélio contido em cada frasco foi colhido separadamente, por filtração das culturas em funil Buchner, e, papel de filtro (Whatmann n.1) previamente pesados. Os micélios foram lavados com água destilada estéril, secados a temperatura ambiente e, pesados, obtendo-se o peso fresco (PF.). Para a obtenção do peso seco (PS.) dos micélios, vidros pequenos de penicilina foram tarados, após manutenção a 80°C durante 24 horas, sendo depois, colocados nos vidros uma certa quantidade de PF., e incubados na estufa à 80°C , até obter o peso constante (GARRAWAY e EVANS, 1984).

3.2.4.2. Extração de proteínas dos isolados de *Exserohilum turcicum*

300mg de PS. de micélio de todos os isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos segundo o item anterior, foram triturados no almofariz, em banho de gelo, com 1ml de tampão Tris-glicina 0,125M, pH=8,2 + 10% sacarose + 300mg de polivinilpirrolidona (PVP). Após o processo, as amostras foram mantidas a 4°C por um período de 4 horas, sendo depois centrifugadas a 16.000g, durante 10 minutos. O sobrenadante coletado foi constituído de extrato protéico (Esquema 1).

3.2.4.3. Determinação da concentração de proteínas nas amostras

A concentração de proteínas nos extratos foi estimada quantitativamente através do método de Lowry (LOWRY et alii., 1951).

O método consiste em adicionar a cada 0,2ml das amostras, 1ml da solução reagente C, que consistiu em uma mistura da solução reagente B e de uma solução 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1N, na proporção de 1:50, respectivamente. A solução B foi preparada misturando-se aliquotas iguais de uma solução 1% de sulfato de cobre pentahidratado em água destilada, e de uma solução 2% de tartarato de sódio em água destilada. Em seguida as amostras contendo a solução reagente C, foram agitadas a temperatura ambiente, e, após 10 minutos, adicionou-se 0,1ml

Esquema 1: Extração de proteínas à partir de micélio de fungos para análise eletroforética.

300mg PS micélio

+ 1ml tampão Tris-glicina 0,125M pH=8,2
com 10% sacarose e mg/ml PVP.

Triturado no almofariz

"banho de gelo"

4hr. - 4 °C

C! 16.000g - 10min.

57

50

Teste de Lowry

descartado

(300ug Eq. proteina)

ELETROFORESE (PAGE)

do reagente Folin Ciocalteu 2N (Deel-Ind. Quim. São Paulo, SP), previamente diluído com água destilada (1:1, v/v). As amostras foram agitadas vigorosamente e após 30 min., procedeu-se a determinação das respectivas absorbâncias no comprimento de onda de 500nm, em espectrofotômetro ultravioleta. A concentração de proteínas em cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de soro-albumina bovina por ml (Eq μg SAB/ml) (Sigma Chem. Co.), foi determinada utilizando-se curvas padrão de diferentes concentrações de SAB, variando de 20 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, em função de suas respectivas absorbâncias a 500nm.

3.2.4.4. Preparo do Gel de Poliacrilamida

Para a análise eletroforética dos isolados de *Exserohilum turcicum*, adotou-se a técnica de eletroforese em placa de gel de poliacrilamida, segundo STEGEMANN e BURGERMEISTER (1987).

O processo, consta de uma reação de polimerização entre o monômero Acrilamida (AA) e metileno-bis-acrilamida (BIS) na concentração de 5% para gel de concentração e 7% para gel de corrida na observação de isoenzimas de peroxidase. Para a observação de esterase foi utilizado gel de poliacrilamida na concentração de 5%.

Após a dissolução da AA e do BIS em tampão Tris-glicina 0,125M, pH=8,2, a mistura foi deaerada por alguns minutos, sendo depois adicionado (com muito cuidado para não ser introduzido ar), 0,1ml de tetrametildiamina

(TEMED) e 2,8ml de persulfato de amônio na concentração de 2%. A mistura foi colocada imediatamente entre placas, deixando-se a temperatura ambiente de 4 a 6 horas para polimerização completa. As 2 placas (19 x 19,5cm), sendo uma de vidro e outra de polietileno, foram separadas entre si por intermédio de um espaçador de polietileno com 2mm de espessura, contendo incluso um pente para 12 amostras. Foram montadas com auxílio de grampos e, imediatamente, a mistura foi colocada com auxílio de um funil ou de uma seringa de 25ml. O gel de corrida foi colocado em primeiro lugar, seguido de uma camada de 0,3cm de uma solução de butanol saturado com água. Após a polimerização, que ocorreu a cerca de 30 minutos, aspirou-se a solução de butanol e introduziu-se a solução do gel de concentração, deixando-se ocorrer a polimerização completa.

Após a polimerização completa do gel de poliacrilamida, o espaçador foi retirado e a placa de polietileno foi removida com cuidado, ficando o gel na placa de vidro. A placa foi transferida para uma cuba de sistema horizontal, contendo tampão Tris-glicina 0,125M, pH=8,2 e, fazendo-se ponte com papel de filtro Whatmann n.3.

3.2.4.5. Aplicação das amostras e corrida eletroforética

Em cada cavidade formado pelo pente, no gel, foi aplicado 20ul do extrato contendo 300ug em equivalente de SAB. Imediatamente foi realizada a corrida em aparelho horizontal marca Permatron, mantendo-se a corrente em 5mA até o corante marcador atingir o gel de corrida, passando depois para 10mA até o final da corrida. O corante marcador utilizado foi o azul de bromofenol (ALFENAS et alii, 1987). As corridas eletroforéticas foram realizadas a 4 C em ambiente frio. As amostras dos isolados foram corridas em duplicatas e repetidas tres vezes.

3.2.4.6. Coloração

Os géis, após a corrida eletroforética, foram retirados das placas e imersos imediatamente nas soluções corantes.

Coloração da ESTERASE: O método consiste em dissolver 50mg de Fast red TR em 100ml de tampão fosfato 0,1M, pH=6,5, adicionado de 2ml de solução 1% de naphthylacetato em 50% de acetona. A incubação foi realizada por uma hora e depois fixado com ácido acético 7% (JVO e STOTAKY, 1973 modificado por BACH, 1989).

Coloração da PEROXIDASE: O método consta em dissolver 0,05% de benzidina em tampão acetato de sódio 0,02M, pH=5, adicionado de 0,3% de água oxigenada, incubando o gel por 10 minutos (NADOLNY e SEQUEIRA, 1980).

3.2.4.7. Extração do DNA

Os micélios dos isolados do *Exserohilum turcicum*, obtidos conforme item 3.2.4.1., foram triturados em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. 60mg do pó, em tubos Eppendorf, foram ressuspensos em 500ul de tampão de extração, (200mM Tris-HCl pH=8,5 + 250mM NaCl + 25mM EDTA + 0,5% SDS), sob agitação com pipeta pasteur. Em seguida, sob agitação, foi adicionado 350ul de solução de fenol, (fenol equilibrado com tampão Tris-HCl 100mM, pH=8), e 150ul de clorofórmio. Após centrifugação a 13.000g, durante uma hora, a fase aquosa foi retirada imediatamente, transferindo para outro tubo Eppendorf, contendo 25ul de solução de RNase, (10mg RNase/ 1ml de tampão Tris-HCl 10mM pH=7,5 + 15mM NaCl, aquecido a 100 C por 15 minutos e esfriado), sendo depois os tubos incubados por 5 ou 10 minutos a 37 C. A solução, foi extraída com um volume de clorofórmio, e centrifugada a 13.000g durante 10 minutos. A fase superior foi transferida a outro tubo Eppendorf, e precipitado com 0,54 volumes de isopropanol, sendo após centrifugação, lavado o pelete com 70% de etanol, e seco sob vácuo. O DNA, foi finalmente ressuspensado com 100ul de

tampão (Tris-HCl 10mM pH=8 + 1mM EDTA), e estocado no freezer até a sua utilização (RAEDER e BRODA, 1985)

(Esquema 2).

Toda a vidraria, pipetas, água e tampões foram esterelizados antes da sua utilização segundo MANIATIS et alii (1982).

Digestão do DNA com enzima de restrição

20ul das soluções de DNA, contendo 50ug de DNA/ml, foram digeridos em presença de 1ul da enzima Hpa I, proveniente de *Haemophilus parainfluenzae* (marca Pharmacia), 249ul de água e 30ul de tampão Tris-HCl 100mM, pH=7,5, contendo 100mM MgCl₂, 10mM ditioneitol, e, 1mg/ml SAB. As amostras foram incubadas a 37 C durante uma hora, e o material digerido, precipitado com 660ul de etanol 96%, e 30ul de solução de acetato de sódio 3M. Após centrifugação, o sedimento foi secado a vácuo, e ressuscitado em 40ul de tampão Tris-HCl 10mM, pH=8, contendo 1mM EDTA. Os extratos foram guardados até a sua utilização.

Medida da concentração do DNA.

Para estimar a quantidade de DNA, foi adotado o método descrito em MANIATIS et alii (1982), que consta da medida das amostras em 260 e 280nm. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Pye Unicam SPB-400 UV/VIS, e calculadas, como a razão da leitura em 260 nm, pela de 280nm, igual a 1.8, demonstrando fração de DNA PURO, ou

Esquema 2: Extração e digestão do DNA a partir de micélio de fungos.

MICÉLIO TRITURADO COM N^o 2 Líquido

ainda, se o valor for menor do que 1.8, isto significa que a amostra possui contaminação de proteínas ou fenol.

Separação de fragmentos de DNA.

Gel de poliacrilamida com 8% de AA/BIS, foi utilizado para separar o DNA extraído. 20ul das amostras do DNA, foram submetidas a separação na eletroforese horizontal com 40mA durante 4 horas em tampão Tris/Ácido Bórico pH=8 + EDTA 10mM.

A visualização foi obtida através da coloração com prata (BLUM et alii, 1987).

3.2.4.8. Preservação dos géis

Os géis, após a coloração, foram imersos na solução de metanol, ácido acético e água (50:75:100) contendo 10% de glicerina (v/v) durante uma hora. Duas folhas de papel celofane também foram colocadas nesta solução por alguns minutos.

Uma placa de vidro foi envolta por uma das folhas de papel celofane, dobrando-se as bordas laterais deste por baixo da placa, tendo-se o cuidado de não deixar bolhas de ar entre a placa e o papel. A seguir, colocou-se o gel sobre o celofane na placa, e, com a outra folha, cobriu-se o gel retirando-se qualquer bolha de ar existente, envolvendo-o na placa de acordo com o procedimento anterior. Deixou-se secar a temperatura ambiente. Depois da secagem,

retirou-se o gel da placa de vidro, recortando-se o excesso de papel celofane. Desta forma, o gel pode ser guardado para identificações posteriores (WALLEVIK e JENSENIUS, 1982).

3.2.4.9. Análise do perfil eletroforético

Os perfis foram analisados com base no número de bandas, posição e intensidade. Os géis foram fotografados, passados no densitômetro Desaga utilizando-se o filtro de 545nm e, interpretados.

3.2.5. Serologia

3.2.5.1. Extração de antígenos

A metodologia empregada na extração de substâncias solúveis a partir de micélios e conídios dos isolados de *Exserohilum turcicum*, baseou-se na utilizada por FIGUEIREDO e NAMEKATA (1974).

ANTIGENOS DE MICELIO (Esquema 3): 0,5g de PF de micélios dos isolados de *E. turcicum* obtidos segundo item 3.2.4.1., foram triturados em almofariz de porcelana com 3ml de ácido acético 0,03N. Em seguida os extratos foram submetidos a banho maria fervente durante 45 minutos, centrifugados a 2.000g por 10 minutos, neutralizados até pH=7 com NaOH, e congelado o sobrenadante até a utilização em testes serológicos e quantificação de proteínas (Teste de Lowry item 3.2.4.3).

Esquema 3: Extração de antígenos a partir de micélios dos isolados de *Exserohilum turcicum*

ANTIGENOS DE CONÍDIOS (Esquema 4): As suspensões de conídios dos isolados de *E. turcicum*, obtidos segundo item 3.2.4.1., foram centrifugadas a 2.000g durante 10 minutos para a sedimentação total dos conídios. A seguir, a parte sobrenadante foi eliminada, e os tubos preenchidos com a suspensão e novamente centrifugados, até que a camada de conídios sedimentados atinjam o nível de 0,2ml. A quantidade de conídios assim obtida, foi acrescida de 1ml de ácido acético a 0,03N e submetida a banho-maria fervente por um período de 45 minutos. Terminada a operação, os extratos foram novamente centrifugados a 2.000g por um período de 10 minutos separando o sobrenadante (SN1) e neutralizando com NaOH até pH=7. Os sobrenadantes foram acondicionados em frascos e conservados no congelador, para serem oportunamente utilizados nos testes sorológicos e quantificação de proteínas (Teste de Lowry item 3.2.4.3.).

3.2.5.2. Produção de antissoros

Foram produzidos antissoros para imunógenos de micélios e conídios de *Exserohilum turcicum* de um isolado de milho (n.4 - Tabela 1) e de outro de capim (n.5 - Tabela 1).

Esquema 4: Extração de antígenos a partir de conídios dos isolados de *Exserohilum turcicum*

ANTISSIONOS PARA IMUNOGENOS DE CONIDIOS: Os conídios de *Exserohilum turcicum*, isolados de milho e capim na concentração de 10^6 a 10^7 conídios/ml, foram misturados com volumes iguais de adjuvante de Freund completo, e imunizados dois coelhos para cada isolado. As injeções foram realizadas via linfonódulo de 0,5ml em cada coxa segundo metodologia de OLIVEIRA (1975). Após o intervalo de 20 e 30 dias foram feitas as sangrias, obtendo-se os respectivos antissoros (AS). Antes da injeção, os animais foram sangrados para a obtenção do soro normal (SN). Nos soros foram adicionados mertiolato na concentração de 1:10.000 sendo acondicionados em frascos e mantidos no congelador.

ANTISSIONOS PARA IMUNOGENOS DE MICELIOS: 360mg PF de micélios de *Exserohilum turcicum* isolados de milho e capim obtidos segundo o item 3.2.4.1., foram triturados em almofariz de porcelana com 1ml de NaCl 0,85%, sendo depois emulsionados com volumes iguais de adjuvante de Freund completo, e imunizados dois coelhos por isolado. As

imunizações foram realizadas via linfonóculo (0,5ml por coxa) e as sangrias após 20 e 30 dias da injeção. Antes da injeção, fez-se uma sangria obtendo-se o SN e em todos os soros adicionou-se mertiolato na concentração de 1:10.000 e conservados no congelador.

3.2.5.3. Testes Serológicos

Para a observação e distinção serológica entre os isolados de *Exserohilum turcicum*, foram utilizados dois métodos: dupla-difusão em ágar (Ouchterlony), e o "Enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA).

TESTE DE OUCHTERLONY: Cinco mililitros de uma solução de ágar (ágar 1% em tampão fosfato 0,01M, pH=7 + 0,85% NaCl) foram colocados em lâminas de vidro. Após a solidificação, na camada de ágar foram realizadas perfurações com auxílio de um pequeno cilindro oco de bordos cortantes. As perfurações foram realizadas segundo esquemas, com distâncias de 0,8mm e poços de 0,3mm de diâmetro. Em uma das perfurações, foi colocado o antissoro e nos demais, os antígenos reagentes, ou vice-versa. Após 4 dias, em câmara úmida, procedeu-se a lavagem, secagem e coloração das lâminas (OUCHTERLONY 1958,1962).

TESTE DE ELISA: O método escolhido foi o duplo-sanduiche (DAS-ELISA), segundo CLARK e ADAMS (1977). Para a aplicação do teste, foi necessário preparar o conjugado imunoglobulina-enzima seguindo-se as seguintes etapas baseadas no trabalho de VOLLER et alii (1976):

Etapa 1) Purificação das imunoglobulinas (IgG): 8ml dos antissoros de 30 dias para conídios e micélios, dos isolados de milho e capim de *Exserohilum turcicum*, foram precipitados com 4ml de sulfato de amônio 100% saturado, gota a gota, sob agitação durante 3 horas a 4°C. O precipitado foi centrifugado a 5.000g por 10min. e 5°C, e o sedimento, composto de IgG, foi retomado em 4ml de NaCl 0,85%, e dializado contra NaCl por 24 horas. A IgG foi novamente centrifugada e a absorbância do sobrenadante em um comprimento de onda de 280nm foi determinada no espectrofotômetro Pye Unicam, SPB-400 UV/VIS. A concentração das IgGs em mg/ml, foi determinada, dividindo a leitura pelo coeficiente de extinção 1,8.

Etapa 2) Preparação do conjugado: 0,5ml de IgG na concentração de 1mg/ml, foi misturada com 0,2mg da enzima alcalina fosfatase da Boehringer, e o complexo foi submetido a diálise contra tampão fosfato 0,02M, pH=7 acrescido de 0,85% de NaCl e 0,12ml de glutaraldeído 37%, durante uma hora a 4°C. Após este período, foi trocada a solução de diálise por duas vezes para tampão fosfato 0,02M, acrescido de 0,85% de NaCl durante 12 horas a 4°C. O conjugado foi guardado em geladeira até a realização do teste.

O teste de ELISA foi realizado da seguinte maneira: 200ul das imunoglobulinas diluídas a 1:800 em tampão carbonato pH=9,6, foram colocadas nos poços contidos em placas de poliestireno para microtitulação ELISA (marca Falcon), e incubadas a 4°C durante 24 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato salina, (PBS) pH=7,4 acrescida de 0,05% de Tween 20. Após a lavagem, foi colocado 200ul de antígeno/poço e as placas foram incubadas a 37°C durante 2 a 4 horas. Em seguida, as placas foram lavadas como anteriormente, e depois adicionado 200ul/poço do conjugado IgG-enzima. Após incubação das placas, por 2 a 4 horas a 37°C, essas foram lavadas, e adicionado 200ul/poço do substrato p-nitrofenil fosfato (mg/ml tampão dietanolamina pH=9,8). A absorbância, foi medida no espectrofotômetro Pye Unicam SP8-400 UV/VIS a 405nm, após 30 minutos com paralização da reação utilizando 0,05ml de NaOH 3M/poço.

Para a otimização de alguns parâmetros para o teste de ELISA, foram estudados o efeito da concentração do antígeno, e da diluição do conjugado sobre a reação. Os antígenos foram analisados nas concentrações de 600, 300 e 150ug em equivalentes de SAB/ml, e, o conjugado nas diluições de 1:5 e 1:10. Os resultados foram acompanhados do soro normal e dos reagentes como referências negativas (VOLLER et alii, 1976).

4. RESULTADOS

4.1. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de *Exserohilum turcicum*.

4.1.1. Determinação da idade ideal da cultura para esporulação.

Com base nos dados das tabelas 2, 3, 4 e 5 e das figuras 1, 2 e 3 verifica-se que o máximo de esporulação ocorreu com a idade da cultura ao redor de 8 dias para os isolados de milho e sorgo em meio de BDA enquanto que, para o isolado de capim, o máximo de esporulação foi no meio de LCH.

4.1.2. Determinação da esporulação com o número de repicagens.

Através das Tabelas 6, 7, 8 e 9 e, da figura 4, foi possível verificar que os isolados de milho após várias repicagens, reduz a capacidade de esporulação

Tabela 2: Crescimento e esporulação do fungo *Exserohilum turcicum* isolado de milho, desenvolvido em meio de LCH.

ISOL		DIAS										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	D*	0	0.4	0.8	1.1	1.7	3.0	5.0	6.1	6.5	7.4	8.0
	E**					0.2	0.6	4.5	3.8			
2	D	0	0.3	0.8	1.1	1.8	3.0	5.0	6.0	6.4	7.2	7.9
	E					0.2	0.6	4.5	4.0			
3	D	0	0.4	0.8	1.0	2.0	3.5	3.6	4.2	4.8	5.4	5.9
	E					0.8	1.6	2.4	1.8			
4	D	0	0.3	0.8	1.2	1.7	3.0	4.9	5.9	6.3	7.3	7.9
	E					0.2	0.5	4.0	3.2			
7	D	0	0.4	0.8	1.2	1.8	3.2	5.0	6.1	6.3	7.2	8.0
	E					0.2	0.7	4.7	4.0			
10	D	0	0.4	0.8	1.2	1.8	3.2	5.0	6.0	6.5	7.3	8.0
	E					0.2	0.7	4.8	4.0			
11	D	0	0.3	0.7	1.0	1.7	3.5	4.9	5.9	6.4	7.2	8.0
	E					0.1	0.4	4.5	3.8			
12	D	0	0.4	0.8	1.2	2.0	3.2	5.0	6.0	6.5	7.3	8.0
	E					0.2	0.8	4.8	4.0			
13	D	0	0.3	0.7	1.0	1.7	2.9	4.9	5.9	6.4	7.2	7.9
	E					0.2	0.6	4.5	3.6			
14	D	0	0.3	0.7	1.0	1.7	3.0	4.9	5.9	6.5	7.3	8.0
	E					0.1	0.6	4.5	3.8			

* D-Diâmetro médio em mm (média de 7 placas).

5

** E-Esporulação do fungo (número de conídios $\cdot 10^5$ /ml)
(média de 3 placas)

Média das repetições foram significativamente iguais a nível de 5% (Teste T).

Tabela 3: Crescimento e esporulação do fungo *Exserohilum turcicum* isolado de capim e sorgo, desenvolvido em meio LCH.

ISOL	DIAS										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5 D*	0.4	0.8	1.4	2.0	2.5	3.3	5.0	6.6	7.5	7.9	8.0
E**					0.9	5.0	23.0	19.0			
6 D	0.4	0.7	1.2	1.9	2.4	3.4	5.1	6.8	7.6	7.9	8.0
E					0.8	5.2	23.3	20.0			
8 D	0.4	0.6	1.5	2.0	2.4	3.4	5.0	6.7	7.6	8	+8
E					0.9	5.0	23.2	20.0			
9 D	0.4	0.7	1.2	1.9	2.4	3.6	5.0	6.8	7.5	7.9	+8
E					0.8	5.0	23.0	18.0			
15 D	0.5	1.0	1.6	2.9	3.4	4.7	6.4	7.2	7.5	8.0	+8
E					0.8	5.0	12.0	9.0			
16 D	0.4	0.9	1.5	2.8	3.5	4.8	6.5	7.2	7.6	8.0	+8
E					1	6	12.8	10.0			

* D- Diâmetro médio em mm (média de 7 placas)

5

** E- Esporulação do fungo (número de conídios.10 /ml) (média de 3 placas).

Média das repetições foram significativamente iguais a nível de 5% (Teste T).

Tabela 4: Crescimento e esporulação do fungo *Exserohilum turcicum* isolado de milho, desenvolvido em meio de BDA.

ISOL		DIAS							
		2	3	4	5	6	7	8	9
1	D*	0.5	0.9	1.5	2.0	3.0	4.8	7.2	8.7
	E**					0.4	1.0	9.4	8.9
2	D	0.5	1.0	1.5	2.3	3.0	4.4	7.0	8.7
	E					0.2	0.9	9.0	8.5
3	D	0	0	0.2	0.4	0.8	2.8	3.7	4.2
	E					0.1	0.8	1.0	1.3
4	D	0.5	1.0	1.4	2.4	3.1	4.8	7.2	8.8
	E					0.3	1.0	9.3	8.9
7	D	0.5	1.0	1.3	2.2	2.9	4.5	7.5	9.0
	E					0.4	1.0	9.6	9.1
10	D	0.5	1.0	1.4	2.5	3.0	4.8	7.5	9.0
	E					0.4	1.2	9.6	9.3
11	D	0.4	1.0	1.4	2.5	3.0	4.5	7.4	9.0
	E					0.3	1.2	9.6	9.1
12	D	0.5	1.0	1.4	2.5	3.0	4.8	7.5	9.0
	E					0.4	1.0	9.6	9.2
13	D	0.5	0.9	1.3	2.2	2.9	4.5	7.2	8.8
	E					0.3	0.8	9.1	8.8
14	D	0.4	0.9	1.4	2.1	2.9	4.5	7.2	8.8
	E					0.2	0.9	9.1	8.9

* D- Diâmetro médio em mm (média de 7 placas).

** E- Esporulação do fungo (número de conídios $\cdot 10^5$ /ml) (média de 3 placas).

Média das repetições foram significativamente iguais ao nível de 5% (Teste T)

Tabela 5: Crescimento e esporulação do fungo *Exserohilum turcicum* isolado de capim e sorgo, desenvolvido em meio BDA.

ISOL	DIAS										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5 D*	0.6	0.8	1.4	2.8	3.4	4.8	6.4	7.0	7.5	7.7	8.0
E**					0.5	3.0	14.0	7.4			
6 D	0.6	0.8	1.6	2.9	3.5	4.9	6.5	7.6	7.7	7.8	8.0
E					0.4	2.0	14.3	7.7			
8 D	0.5	0.9	1.7	2.9	3.5	4.9	6.5	7.6	7.6	7.9	8.0
E					0.5	2.0	14.4	8.0			
9 D	0.5	1.0	1.6	2.8	3.5	4.8	6.5	7.5	7.6	7.9	8.0
E					0.5	1.8	14.4	7.6			
15 D	0.6	1.2	1.9	2.9	3.9	6.1	8.0	+8			
E					5.0	10.0	27.0	23.0			
16 D	0.8	1.9	2.1	3.2	4.0	6.0	8.0	+8			
E					6.0	10.0	27.2	24.0			

* D-Diâmetro em mm (média de 7 placas)

** E- Esporulação de fungo (número de conídios $\times 10^5$ /ml)
(média de 3 placas).

Média das repetições foram significativamente iguais ao nível de 5% (Teste T).

Figura 1: Diâmetro médio e esporulação de *Exserohilum turcicum* isolado de milho (número 10) em diferentes meios (A-BDA; B-LCH) e, diferentes idades.

Figura 2: Diâmetro médio e esporulação de *Exserohilum turcicum* isolado de capim (número 5) em diferentes meios (A-BDA; B-LCH) e, diferentes idades.

Figura 3: Diâmetro médio e esporulação de *Exserohilum turcicum* isolado de sorgo (número 15) em diferentes meios (A-BDA; B-LCH) e, diferentes idades.

enquanto que, os isolados de sorgo mantêm constante essa atividade no meio de BDA. Em relação aos isolados de capim a capacidade de esporulação foi mantida durante as 14 repicagens nos dois meios.

Após o período de 3 meses de permanência dos isolados em água destilada, alguns vidros foram abertos e os fungos repicados em meio de BDA. Os isolados, mesmo após duas repicagens, desenvolveram-se perfeitamente normais, conservando as características da cultura de origem além de possuir esporulação similar ao já observado.

4.1.3. Determinação da fonte de carboidrato ideal para esporulação e/ou crescimento.

A Tabela 10 mostra que os isolados de capim e milho apresentam maior esporulação em meio mínimo contendo lactose comparando com o meio de LCH. Os isolados de sorgo apresentam maior esporulação no meio mínimo contendo sacarose e no meio BDA. Para todos os isolados foi observado o desenvolvimento maior no meio BDA e no meio mínimo contendo glicose.

Tabela 6: Concentração de conídios nas suspensões dos isolados de milho, nos meios BDA (B) e LCH (L) no decorrer de 7 repicagens.

ISOL	MEIOS	Número de repicagens						
		1	2	3	4	5	6	7
1	L	1.6*	2.6	3.4	4.9	5.0	3.9	3.4
	B	3.0	5.0	8.5	8.6	8.5	8.0	7.4
2	L	1.7	2.7	3.5	4.6	4.9	3.4	3.0
	B	2.8	4.9	9.0	9.0	8.8	8.0	7.5
4	L	1.6	2.9	3.8	4.9	5.0	3.8	3.2
	B	3.0	5.7	9.0	8.9	9.0	8.0	7.9
7	L	1.7	3.0	3.9	4.8	5.0	3.9	3.3
	B	3.2	5.4	9.2	9.2	8.9	8.4	8.1
10	L	1.7	3.0	4.0	5.0	5.0	3.8	3.2
	B	3.2	5.7	9.4	9.5	9.0	8.5	8.5
11	L	1.3	2.8	3.6	4.7	4.7	3.6	2.9
	B	3.1	5.0	9.0	9.0	9.0	8.3	8.3
12	L	1.6	3.0	3.9	5.0	5.0	3.8	2.8
	B	3.2	5.6	9.4	9.4	9.0	8.5	8.3
13	L	1.6	2.9	4.0	4.9	4.8	3.9	2.8
	B	3.1	5.3	9.0	9.3	9.0	8.5	8.0
14	L	1.5	2.9	4.0	5.0	5.0	3.8	2.8
	B	3.2	5.2	8.6	8.9	8.5	8.4	8.0

5

* números representam concentração de conídios. 10^5 /ml e, médias de 3 placas/meio/repicagem.

Média das repetições foram significativamente iguais a nível de 5% (Teste T).

Tabela 7: Concentração de confídios nas suspensões dos isolados de milho, nos meios BAD (B) e LCH (L) entre 8 e 14 repicagens.

ISOL	MEIO	Número de repicagens						
		8	9	10	11	12	13	14
1	L	2.6*	2.2	1.9	0.8	0.04	0.03	0.02
	B	7.2	6.8	5.9	4.5	3.6	2.6	0.6
2	L	2.1	1.9	1.4	0.5	0.03	0.02	0.02
	B	7.5	7.0	5.7	4.2	3.0	2.6	0.7
4	L	2.5	2.1	2.0	0.7	0.04	0.02	0.02
	B	7.5	6.8	5.1	4.0	3.1	2.3	0.8
7	L	2.6	2.2	2.0	0.8	0.05	0.03	0.02
	B	7.9	7.0	5.2	4.6	3.9	2.9	0.9
10	L	2.6	2.2	2.0	0.8	0.05	0.03	0.02
	B	7.8	6.9	5.0	4.4	3.8	2.8	0.8
11	L	2.4	1.9	1.5	0.7	0.04	0.03	0.02
	B	7.6	6.5	5.0	4.0	3.5	2.5	0.9
12	L	2.6	2.0	2.0	0.8	0.05	0.03	0.02
	B	7.8	6.6	5.0	4.3	3.6	2.6	0.8
13	L	2.4	2.0	1.8	0.9	0.05	0.03	0.02
	B	7.6	6.5	4.9	4.1	3.5	2.7	0.8
14	L	2.5	2.0	1.6	0.8	0.04	0.03	0.02
	B	7.4	6.1	5.0	4.8	3.9	3.0	0.9

5

* Números representam concentração de confídios.10 /ml e, médias de 3 placas/meio/repicagem. Média das repetições foram significativamente iguais a nível de 5% (Teste T).

Tabela 8: Concentração de conídios nas suspensões dos isolados de capim e sorgo, nos meios de BDA (B) e LCH(L) no decorrer de 7 repicagens.

ISOL	MEIO	Número de repicagens						
		1	2	3	4	5	6	7
5	L	9.2*	11.4	11.9	12.6	12.6	12.4	12.4
	B	6.0	7.3	9.8	10.2	10.5	10.5	10.4
6	L	9.0	11.6	11.8	12.8	12.8	12.5	12.5
	B	6.2	7.8	10.3	10.4	10.8	10.8	10.5
8	L	8.8	11.5	11.8	12.5	12.5	12.4	12.4
	B	6.2	7.8	10.4	10.6	10.6	10.5	10.4
9	L	9.0	10.9	11.0	12.2	12.2	12.1	12.3
	B	5.9	6.9	9.8	9.8	10.0	10.0	10.0
15	L	7.0	9.8	11.6	11.6	11.6	11.0	11.0
	B	18.0	24.0	30.0	33.0	32.0	32.0	30.0
16	L	6.8	9.7	11.6	11.5	11.5	11.0	10.9
	B	19.0	23.0	29.0	29.0	30.0	30.0	30.0

* Números representam concentração de conídios $\cdot 10^5$ /ml e, médias de 3 placas/meio/repicagem.

Média das repetições foram significativamente iguais ao nível de 5% (Teste T).

Tabela 9: Concentração de conídios nas suspensões dos isolados de capim e sorgo, nos meios de BDA (B) e LCH (L) entre 8 e 14 repicagens.

ISOL	MEIO	Número de repicagens						
		8	9	10	11	12	13	14
5	L	11.6*	11.6	11.3	11.3	11.7	11.6	11.0
	B	10.4	10.4	10.2	10.2	10.1	10.0	10.0
6	L	11.7	11.7	11.6	11.6	11.8	11.8	11.5
	B	10.5	10.5	10.2	10.2	10.2	10.1	10.0
8	L	11.6	11.6	11.4	11.4	11.8	11.8	11.3
	B	10.4	10.4	10.2	10.2	10.1	10.0	10.0
9	L	11.7	11.4	11.2	11.2	11.0	11.0	10.9
	B	10.2	10.2	10.1	10.1	10.1	10.0	10.0
=====								
15	L	10.0	10.0	9.0	7.0	6.7	6.3	4.6
	B	28.0	24.0	22.0	19.0	14.0	12.0	9.0
16	L	10.0	9.9	9.0	7.0	6.1	6.3	4.4
	B	29.0	23.0	21.0	18.0	14.0	11.0	10.0

* Números representam concentração de conídios $\cdot 10^5$ /ml e, médias de 3 placas/meio/repicagem.

Média das repetições foram significativamente iguais ao nível de 5% (Teste T).

Tabela 10: Crescimento e esporulação dos isolados de *Exserohilum turcicum* em meios contendo diferentes fontes de carbono, incluindo os meios de BDA e LCH.

ISOL		MNGC		MNLC		MNSC		LCH		BDA	
		D*	E**	D	E	D	E	D	E	D	E
1	M	4.5	1.6	3.9	6.8	3.0	4.8	5.0	4.5	7.2	9.4
2	I	4.6	1.5	4.2	7.0	2.9	4.7	5.0	4.5	7.0	9.0
4	L	4.5	1.5	4.2	7.0	3.0	4.5	4.9	4.0	7.2	9.3
7	H	4.5	1.6	4.5	7.2	3.0	4.8	5.0	4.7	7.5	9.6
10	O	4.6	1.6	4.5	7.2	3.0	4.8	5.0	4.8	7.5	9.6
11		4.5	1.5	3.9	6.7	2.9	4.5	4.9	4.5	7.4	9.6
12		4.5	1.5	3.9	6.5	3.0	4.8	5.0	4.8	7.5	9.6
13		4.5	1.6	4.2	7.0	3.0	4.8	4.9	4.5	7.2	9.1
14		4.6	1.8	4.2	6.8	2.9	4.5	4.9	4.5	7.2	9.1
5	C	5.1	1.5	4.5	12.7	5.0	11.0	5.0	23.0	6.4	14.0
	A										
6	P	5.4	1.6	4.4	12.6	5.0	11.0	5.1	23.3	6.5	14.3
	I										
8	M	5.2	1.6	4.5	12.8	5.0	11.2	5.0	23.2	6.5	14.4
9		5.1	1.4	4.4	12.7	5.0	10.0	5.0	23.0	6.5	14.4
15	S	5.2	1.0	4.4	9.6	4.0	19.0	6.4	12.0	8.0	27.0
	O										
	R										
16	GO	5.2	0.8	4.5	9.6	4.5	19.2	6.5	12.8	8.0	27.2

MNGC- Meio mínimo +glicose+caseína

MNSC- Meio mínimo +sacarrose +caseína

MNLC- Meio mínimo +lactose +caseína

BDA - Batata - Agar - Dextrose

LCH - Lactose- Caseína hidrolisada

* Diâmetro em mm (média de 3 repetições)

5

** Esporulação , em número de conídios.10 /ml (média de 3 repetições)

4.1.4. Tamanho dos Conídios

Os conídios de *Exserohilum turcicum* isolados de capim, milho e sorgo apresentaram quando observados em microscópio, conídios retos ou ligeiramente curvos, cor verde-oliva a cinza, com hilo externo e protuberante.

O tamanho médio dos conídios, desenvolvidos no meio BDA, medidos através do microscópio, está indicado na Tabelas 11. Comparando os resultados dos isolados entre si, em relação ao comprimento, as médias não diferem significativamente. Entretanto, em relação ao diâmetro, os isolados de capim foram significativamente maiores do que os isolados de milho e sorgo.

4.2. Testes de Patogenicidade

Nas plantas de milho, oito dias após a inoculação realizadas com isolados de *Exserohilum turcicum* apareceram os primeiros sintomas. Os isolados de sorgo e capim foram os responsáveis pela manifestação de lesões cloróticas no início sendo que posteriormente aos 20 dias as lesões evoluíram até lesões cloróticas sem murchamento para isolado de capim enquanto que para os isolados de sorgo e milho, as folhas apresentaram-se secas (Tabela 12 e Figura 5B).

Tabela 11: Dimensões dos conídios de *Exserohilum turcicum* isolados de milho, sorgo e capim.

ISOL	Comprimento (um)	Diâmetro(um)
1	115.4 +/- 0.97 (95.5 - 129.3) *a	18.66 +/- 0.21 (14.7 - 22.0) a
2	105.4 +/- 0.92 (88.2 - 125.0) a	18.02 +/- 0.2 (14.7 - 22.0) a
3	113.07 +/- 1.27 (93.3 - 128.0) a	17.02 +/- 0.17 (14.7 - 22.6) a
4	106.72 +/- 0.77 (93.2 - 118.3) a	17.25 +/- 0.17 (15.4 - 21.3) a
7	100.87 +/- 0.86 (88.2 - 114.6) a	18.55 +/- 0.23 (14.7 - 24.9) a
10	109.98 +/- 0.74 (94.0 - 124.0) a	18.49 +/- 0.18 (16.0 - 21.9) a
11	113.19 +/- 0.83 (88.2 - 127.0) a	17.11 +/- 0.19 (14.7 - 22.6) a
12	108.07 +/- 0.86 (93.3 - 120.5) a	19.78 +/- 0.23 (16.9 - 23.8) a
13	109.07 +/- 0.9 (93.4 - 121.8) a	16.46 +/- 0.14 (15.0 - 21.5) a
14	107.57 +/- 0.9 (93.7 - 121.0) a	17.05 +/- 0.17 (14.0 - 19.9) a

Tabela 11: Dimensões dos conídios de *Exserohilum turcicum* isolados de milho, sorgo e capim.

ISOL		Comprimento (um)	Diâmetro (um)
15	S	*a	a
	O	110.51 +/- 1.09	18.42 +/- 0.14
	R	(88.2 - 123.4)	(17.6 - 19.4)
16	G	a	a
	O	99.28 +/- 0.75	18.28 +/- 0.11
		(88.2 - 109.3)	(17.6 - 21.0)
5		a	b
		109.8 +/- 1.12	21.13 +/- 0.23
		(93.3 - 123.4)	(17.6 - 23.4)
6	C		
	A	a	b
		110.16 +/- 0.50	19.29 +/- 0.23
		(88.2 - 129.3)	(14.7 - 27.9)
8	P		
	I	a	b
		107.5 +/- 0.80	21.6 +/- 0.11
		(88.2 - 114.6)	(20.5 - 23.5)
9	M		
		a	b
		115.86 +/- 0.99	22.96 +/- 0.07
		(88.2 - 123.4)	(22.0 - 23.5)

* Médias de 50 leituras com 3 repetições +/- erro padrão.

Números em parenteses representam valores menores e maiores encontrados.

Médias com mesma letra (a ou b), em fileiras verticais, foram significativamente iguais a nível de 5% (Teste T).

Médias com letras diferentes (a,b), em fileiras verticais, foram significativamente diferentes a nível de 5% (Teste T).

Nas plantas de capim e sorgo inoculadas com os isolados de *Exserohilum turcicum*, os sintomas foram perceptíveis 15 dias após a inoculação. Para as plantas de capim, somente o isolado de capim apresentou reação drástica com folha seca enquanto que, os isolados de sorgo apresentaram lesões necróticas e murchamento ou seca somente na parte distal das folhas contendo lesões. Os isolados de milho, tanto do Brasil como dos Estados Unidos, permaneceram com lesões cloróticas (Tabela 12 e Figura 5D).

Já para as plantas de sorgo as lesões secas apareceram com isolados de sorgo e milho do Brasil enquanto que, os isolados de capim e milho dos Estados Unidos apresentaram reação do tipo resistente (Tabela 12 e Figura 5C).

A figura 5A representa a escala de notas adotada para os isolados de milho, sorgo e capim. Entretanto a figura 5B representa os sintomas observados nos hospedeiros de milho quando inoculados com isolados de milho, sorgo e capim. O mesmo acontece na figura 5C com o hospedeiro de sorgo e, na figura 5D com o hospedeiro capim massambará.

Tabela 12: Resultados das inoculações de plantas de milho, sorgo e capim massambará, com os isolados de *Exserohilum turcicum*.

ISOLADOS	HOSPEDEIRO	DIAS APOS A INOCULAÇÃO			
		8	15	20	25
Milho-Br	MILHO	2*	3	4	-
Capim	MILHO	1	1	1	-
Sorgo	MILHO	1	3	4	-
Milho-EU	MILHO	2	2	2-3	-
Milho-Br	CAPIM	0	0-1	0-1	0-1
Capim	CAPIM	0	1-2	3	4
Sorgo	CAPIM	0	1-2	2	2-3
Milho-EU	CAPIM	0	0-1	0-1	0-1
Milho-Br	SORGO	0	3	4	4
Capim	SORGO	0	0	1	1
SORGO	SORGO	0	3	4	4
Milho-EU	SORGO	0	0	1	1

- * ESCALA DE NOTAS
- 0 - Plantas com ausência de sintomas visíveis
 - 1 - Presença de pequenas lesões cloróticas de formato alongado
 - 2 - Presença de lesões necróticas de formato alongado ao longo das nervuras e tamanho variável. Ausência de murchamento
 - 3 - Presença de lesões necróticas, murchamento e seca na parte distal das folhas contendo lesões
 - 4 - Presença de folhas secas totalmente e plantas com sintoma de murchamento total

Figura 5: Inoculação de diferentes isolados de *Exserohilum turcicum* em hospedeiros de Milho (B), Sorgo (C) e Capim massambará (D). Escala de notas (A).

4.3. Eletroforese

4.3.1. Enzimas

Observou-se que a aplicação de um volume de 20 μ l com 300 μ g de SAB dos extratos protéicos obtidos dos isolados de *Exserohilum turcicum*, revelou-se ideal na eletroforese em placas, possibilitando a obtenção de padrões de ótima resolução.

A análise e interpretação dos resultados obtidos, foram feitas por três procedimentos distintos: a olho nú pela observação direta dos géis; através de diagramas esquemáticos, e finalmente, por análise densitométrica, realizada através de aparelhagem. Os padrões isoenzimáticos de todos os isolados examinados foram reprodutíveis em diferentes corridas eletroforéticas.

4.3.1.1. Esterase

Através das Figuras 6, 7 e 11, constata-se nos isolados de milho do Brasil, 3 bandas, enquanto que no isolado de milho dos Estados Unidos 4 bandas, tendo-se sómente uma banda em comum (Rm 5,4-5,6). As bandas com Rm 2,8-3,1; 3,6-3,9; e; 4,6-4,9 são características do isolado de milho dos Estados Unidos enquanto que as bandas com Rm 2,3-2,8; 3,3-3,7 pertencem aos isolados de milho do Brasil.

Dentro dos isolados de milho do Brasil, do sorgo, e do capim os padrões eletroforéticos foram idênticos diferindo apenas na intensidade de algumas bandas.

Em sequência, observa-se para isolados de capim e sorgo 4 bandas apresentando somente uma banda em comum (Rm 3,8-4,1). As bandas com Rm 2,1-2,7; 3,3-3,5; 4,3-4,6 foram características para os isolados de sorgo enquanto que, bandas com Rm 2,9-3,1; 4,5-4,7; 5,1-5,4 pertenceram aos isolados de capim. Entre os isolados de milho do Brasil (3 bandas) e isolados de capim (4 bandas) não foram observadas nenhuma banda em comum entretanto, entre isolado de milho dos Estados Unidos e isolados de capim existe uma banda comum (Rm 2,8-3,1).

Entre isolados de sorgo e milho do Brasil, observou-se banda com Rm 2,1-2,8 e 3,3-3,7 comuns aos isolados. Entretanto, entre isolados de sorgo e milho dos Estados Unidos, não foi observada banda comum. Através da Figura 7 observa-se a análise densitométrica de um isolado de milho do Brasil, capim, sorgo, e isolado de milho dos Estados Unidos.

4.3.1.2. Peroxidase

Detectaram-se 3 a 6 bandas de peroxidase anódicas para os isolados de milho, capim e sorgo (Figuras 8, 9 e 11). Os isolados de sorgo não apresentaram bandas com Rm inferiores a 2,6 os quais estão presentes nos outros isolados. Os isolados de milho do Brasil apresentaram um

Figura 6 : Diagrama eletroforético em gel de poliacrilamida
de isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de
milho do Brasil (1,2,4,7,10,11,12,13,14), de
milho dos Estados Unidos (3), do capim (5,6,8,9)
e, do sorgo (15,16). Gel corado para a
visualização das isoenzimas da esterase.

Figura 7 :Densitometria do padrão de esterase de isolados de *Exserohilum turcicum* de milho do Brasil (MB), milho dos Estados Unidos (ME), sorgo (S) e, capim (C).
Leitura com filtro 545nm.

Figura 8: Diagrama eletroforético em gel de poliacrilamida (5 - 7 %) de isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho do Brasil (1,2,4,7,10,11,12,13,14), de milho dos Estados Unidos (3), do capim (5,6,8,9) e, do sorgo (15,16). Gel corado para a visualização das isoenzimas da peroxidase. (IG) intersecção entre os géis concentrador e de corrida.

Figura 9 : Densitometria do padrão de peroxidase de isolados de *Exserohilum turcicum* de milho do Brasil (MB), milho dos Estados Unidos (ME), sorgo (S) e, capim (C). Leitura com filtro 545nm.

mesmo padrão enzimático, diferindo apenas na intensidade. Entre estes isolados e o isolado de milho dos Estados Unidos somente a banda com Rm 1,4 - 1,6 foi comum diferindo nas demais. Os isolados de milho do Brasil apresentaram banda de migração com Rm 2.4 - 3.0 sendo comum aos isolados de capim com Rm 2.5 - 2.9. Dentro dos isolados de capim somente foi observada diferença na intensidade. O único isolado de milho dos Estados Unidos, apresentou um padrão bastante distinto dos outros, com 6 bandas. Observou-se ainda, que a banda com Rm 2.8 - 3.3 do isolado dos Estados Unidos é comum ao do isolado do sorgo com Rm 2.8 - 3.2. Entre isolados de milho do Brasil e isolados de sorgo; entre isolados de milho dos Estados Unidos e capim, nenhuma correspondência foi encontrada. Já para isolados de capim e sorgo, existem duas bandas comuns (Rm 3,8 e Rm 4,3). Eliminando-se as bandas comuns observou-se presença de bandas características para alguns isolados tais como: isolados de milho do Brasil com Rm 4-4,2; 4,4-4,6; isolados de milho dos Estados Unidos com Rm 1,7-1,8; 1,9-2; 4,3-4,4; e; isolados de capim com Rm 1,8; 2.

Em relação a peroxidases catódicas não foram observadas bandas.

4.3.2. DNA

O DNA, de todos os isolados de *Exserohilum turcicum*, após extração, digestão com a enzima de restrição

Figura 10: Diagrama eletroforético em gel de poliacrilamida dos isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho do Brasil (MB), de milho dos Estados Unidos (ME), do capim (C) e, do sorgo (S). Gel corado pelo método de prata para DNA.

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida dos isolados de *Exserohilum turcicum* obtidos de milho do Brasil (MB), de milho dos Estados Unidos (ME), do capim (C) e, do sorgo (S). Géis corados para a visualização das isoenzimas de peroxidase (1), esterase (2) e, DNA (3).

e, ressuspensão em tampão Tris-HCl contendo EDTA, obteve-se uma solução levemente viscosa com razão da leitura em espectrofotômetro em 260nm, pela de 280nm, igual a 1,9 e 2,0 para os isolados de sorgo e capim e; igual a 1,8 para isolados de milho.

Através das Figuras 10 e 11 observam-se que todos os isolados apresentaram a mesma banda em gel de poliacrilamida quando corado com o método de prata.

4.4.Serologia

4.4.1. Teste de Duchterlony

Os antissoros preparados à partir de micélio dos isolados de capim e milho de *Exserohilum turcicum* quando analisados em relação aos antígenos extraídos dos micélios dos isolados de capim, milho e sorgo do próprio fungo, apresentaram através do teste de dupla-difusão em ágar, reações cruzadas. Essas reações somente foram observadas quando concentrações de antígenos apresentavam 1800ug em equivalentes de SAB / ml e antissoros obtidos 30 dias após a imunização (Tabela 13). Abaixo dessas concentrações de proteínas não foram observadas reações com os antissoros. Com antissoros de 20 dias as linhas de precipitação foram idênticas porém mais fracas.

Com antissoros obtidos à partir de conídios de isolados de capim e milho de *Exserohilum turcicum*, em reação com antígenos extraídos de conídios dos isolados de milho,

TABELA 13 : Resultados observados em teste de Duchterlony utilizando antissoros obtidos a partir de micélios e conídios em reação com antígenos extraídos do micélio e conídios dos isolados de *Exserohilum turcicum*.

Antígenos	AS para micélio		AS para conídio	
	capim	milho	capim	milho
MICELIOS 1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
5	+	+	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	+	+	-	-
9	+	+	-	-
10	+	+	-	-
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
13	+	+	-	-
14	+	+	-	-
15	+	+	-	-
16	+	+	-	-
CONIDIOS 1	-	-	+	+
2	-	-	+	+
3	-	-	+	+
4	-	-	+	+
5	-	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	-	+	+
8	-	-	+	+
9	-	-	+	+
10	-	-	+	+
11	-	-	+	+
12	-	-	+	+
13	-	-	+	+
14	-	-	+	+
15	-	-	+	+
16	-	-	+	+

+ presença de reação sorológica

- ausência de reação sorológica

sorgo e capim, também pode-se observar a presença de reações idênticas e cruzadas. A concentração mínima de antígeno necessária para reação foi de 1000ug em equivalentes de SAB/ml e antissoros de 30 dias (Tabela 13). O mesmo comportamento foi verificado com antissoros de 20 dias porém com linhas de precipitação mais fracas.

Em relação ao soro normal, não foram observadas reações tanto contra antígenos à partir de micélios como à partir de conídios. Não foram notadas também quaisquer relações serológicas entre antissoros para micélios e os antígenos extraídos de conídios dos isolados de *Exserohilum turcicum* e vice-versa (Tabela 13).

4.4.2. Teste de ELISA

Na padronização do teste de ELISA envolvendo imunoglobulina purificada e antígenos de micélios e conídios de *Exserohilum turcicum*, foi observado que a concentração ideal de antígenos era de 600ug em equivalentes de SAB/ml e a diluição do conjugado enzima-IgG em 1:5.

Resultados obtidos no teste de ELISA envolvendo antígenos obtidos de micélios de isolados de milho, capim e sorgo na concentração de 600 ug em equivalentes de SAB/ml, e conjugados para IgG obtidos dos antissoros para micélios de isolados de milho e capim, indicaram ausência de reação específica (Tabela 14).

Utilizando a IgG do antissoro de conídio de milho e antígenos de conídios foi observado através do teste de ELISA a distinção entre isolados de milho

e sorgo dos isolados de capim, com exceção do isolado de milho dos Estados Unidos (isolado número 3) (Tabela 15 e Figura 12), mas não entre isolados de milho e sorgo.

Em relação a IgG do antissoro de conídio de capim observa-se o inverso onde esse antissoro distinguiu os isolados de capim dos isolados de milho e sorgo, não tendo distinção entre os isolados de milho do Brasil do isolado de milho dos Estados Unidos. Para com os isolados de sorgo, os valores em termos de absorbância revelaram-se intermediários entre isolados de milho e capim (Tabela 15 e Figura 12).

Não foi observada reação quando utilizado o soro normal, o branco constituído de todos os reagentes e, antissoro obtido a partir de conídios contra antígenos extraídos de micélios e vice-versa.

TABELA 14: Resultados do DAS-ELISA (A405) envolvendo antissoros para micélios de isolados de milho e capim de *Exserohilum turcicum*, e antígenos obtidos de micélios de isolados de capim, milho e sorgo na concentração de 600 ug em equivalentes de SAB/ml.

Antígenos (Isolados)		ANTISSOROS	
		Isolado de milho	Isolado de capim
M I L H O S O R C A P I M	1	1,180	1,250
	2	1,420	1,500
	3	1,210	1,220
	4	1,074	1,308
	7	1,210	1,621
	10	1,298	1,428
	11	1,200	1,310
	12	1,100	1,220
	13	1,050	1,108
	14	1,120	1,230
	15	1,063	1,510
	16	1,220	1,320
	5	1,210	1,400
	6	1,360	1,500
	8	1,380	1,480
	9	1,100	1,220

Tabela 15: Resultados do DAS-ELISA (A405) envolvendo antissoros para conídios de isolados de milho e sorgo de *Exserohilum turcicum* e antígenos obtidos de conídios de isolados de capim, milho e sorgo na concentração de 600ug em equivalentes de SAB/ml.

ANTIGENOS (Isolados)		ANTISSIONOS	
		Isolado de milho	Isolado de capim
M I L H O	1	1,148	0,900
	2	1,200	0,880
	3	0,310	0,720
	4	1,110	0,750
	7	1,100	0,720
	10	1,150	0,837
	11	1,100	0,720
	12	1,050	0,850
	13	1,050	0,730
	14	1,050	0,730
	15	1,182	1,160
	16	1,140	1,100
	5	0,185	1,945
	6	0,175	1,550
S O R G O	8	0,176	1,800
	9	0,160	1,620

Figura 12 : Resultados do DAS-ELISA (A405) envolvendo antissoros para confídios de isolados de milho (A) e capim (B) contra antígenos obtidos de confídios de isolados de capim, milho e sorgo de *Exserohilum turcicum* na concentração de 600ug em equivalentes de SAB/ml.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estudos sobre alguns aspectos da fisiologia de *Exserohilum turcicum*.

A temperatura ideal para esporulação do fungo *Exserohilum turcicum* foi definido por diversos pesquisadores como 25 C (BHOWMIK e PRASADA, 1970; FROSI e BALMER, 1980a,b; LEATH e PEDERSEN, 1983; CHIANG et alii, 1989). Por outro lado, em relação ao meio, alguns autores utilizaram BDA (HILU e HOOKER, 1965; BHOWMIK e PRASADA, 1970; LINDBERG, 1983; CHANG e FAN, 1986; LEONARD et alii, 1988; CHIANG et alii, 1989) e outros LCH (TUIITE, 1969; FROSI e BALMER, 1980a,b; BOWEN e PEDERSEN, 1988; THAKUR et alii, 1989a,b).

Diante do exposto, na primeira fase do trabalho, procurou-se definir o meio de cultura sintético ideal e a idade da cultura para esporulação dos isolados de *Exserohilum turcicum*. Pela contagem de conídios, ficou constatado que a máxima esporulação dos isolados de milho e sorgo ocorreu no meio de BDA aos 8 dias enquanto que, os isolados de capim apresentaram uma esporulação maior no meio LCH também aos 8 dias de crescimento (Tabelas 2,3,4 e 5; Figuras 1,2 e 3).

Em relação ao crescimento vegetativo, no meio LCH, os isolados de milho, capim e sorgo apresentaram o máximo do diâmetro médio aos 12 dias. Por outro lado, no meio BDA, somente os isolados de capim apresentaram o máximo do diâmetro médio aos 12 dias enquanto que, os isolados de sorgo e milho, apresentaram aos 9 dias. Os resultados de crescimento vegetativo e formação de conídios podem ser correlacionados para isolados de milho e sorgo no meio BDA entretanto, isto não foi possível para os isolados de capim. Isto vem de encontro com KAFI e TARR (1966) onde citam a impossibilidade de correlacionar crescimento vegetativo e esporulação de algumas espécies de *Helminthosporium* (*rostratum*, *sorghicola*, *cynodontis*, *hawaiiense* e *australiense*).

SCHEFFER (1971) em uma conferência em Honolulu, durante a discussão, na qual era debatedor de um trabalho relatado por OGASAWARA et alii (1971), citou que os isolados de *Helminthosporium* spp. geralmente perdem a capacidade de esporular no meio sintético provavelmente devido as alterações bioquímicas, a nível de aminoácidos, que ocorrem durante a formação do conídio. Diante disso, procuramos analisar durante 14 repicagens a esporulação dos isolados de *Exserohilum turcicum*. Para os isolados de milho, a esporulação foi inibida no decorrer das 14 repicagens nos dois meios entretanto, no meio BDA a inibição foi menor. Comparando ainda no meio BDA, os isolados de sorgo apresentaram menor inibição em relação aos isolados de

milho. Os isolados de capim tanto no meio BDA como no LCH, tiveram a esporulação constante (Tabelas 6,7,8 e 9; Figura 4). Através dos resultados pode-se observar que isolados de milho e sorgo perderam a capacidade de esporular no meio sintético no decorrer de 14 repicagens. Nos ensaios posteriores, procurou-se trabalhar com os isolados até a sétima repicagem e meio BDA onde a esporulação se manteve constante.

Em relação à viabilidade do patógeno em água destilada estéril, foi observado que os isolados se mantiveram com a esporulação mesmo após 3 meses. O dado vem de encontro com FIGUEIREDO e PIMENTEL (1975) que conservaram *Mycosphaerella melonis* em água destilada estéril por 6 anos e 3 meses sem que houvesse perda da viabilidade e patogenicidade.

No tocante a necessidade de diferentes fontes de carbono para esporulação e/ou crescimento, REDDY (1969) trabalhando com cinco espécies de *Helminthosporium* (*spiciferum*, *rostratum*, *hawaiiense*, *nodulosum* e *halodes*) em meios com diferentes fontes de carbono, observou que frutose e xilose foram importantes para o crescimento não tendo correlação com a esporulação. Já em 1984, GARRAWAY e EVANS trabalhando com *Aspergillus niger* observaram que fontes como ribose, galactose e maltose foram importantes para a formação de conídios. Também foi citado que carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos foram as fontes de carbono utilizadas por diferentes fungos como

elemento básico para a formação da estrutura e função bioquímica das células. Os fungos também são capazes de utilizar uma variedade de compostos de carbono para o crescimento e/ou esporulação. Com base no exposto, decidiu-se verificar o comportamento dos isolados de *Exserohilum turcicum* perante meios contendo diferentes carboidratos como fontes de carbono. Os resultados apresentados nesse trabalho, mostraram que, entre os meios mínimos, tanto nos isolados de milho, como no capim, o meio mínimo contendo lactose foi importante na esporulação enquanto que, para os isolados de sorgo o meio mínimo contendo sacarose foi o melhor. Comparando meio mínimo com lactose e LCH, os isolados de milho esporularam menos enquanto que os isolados de capim apresentaram esporulação maior no meio LCH. Isto pode ser devido que para isolados de capim o meio LCH possua alguma substância importante para o metabolismo bioquímico da formação de conídio enquanto que, para o isolado de milho existe alguma substância inibidora no meio. Os isolados de sorgo apresentaram esporulação maior no meio BDA do que no MNS podendo ser devido pela presença de alguma substância no BDA (aminoácido ou outra) importante para a formação de conídio.

Em relação ao crescimento vegetativo e esporulação não foi encontrado nenhuma correspondência estando de acordo com KAFI e TARR(1966). Entretanto, como no meio BDA, os isolados de *Exserohilum turcicum*

apresentaram ótima esporulação, este foi utilizado nos ensaios subsequentes.

Os conídios observados no microscópio, após desenvolvimento no meio BDA, apresentaram-se retos ou ligeiramente curvos, com cor verde-oliva a cinza, com hilo externo e protuberante pertencente ao gênero *Exserohilum* conforme descrito por LEONARD e SUGGS (1974).

Em relação ao tamanho de conídios, ELLIOT (1949) observou diferença na medida para vários isolados de *Helminthosporium*, com exceção do *Helminthosporium turcicum*, mesmo em meios com concentração diferente de açúcar. KAFI e TARR (1966) trabalhando com 5 espécies de *Helminthosporium* observaram diferenças nas medidas dos conídios quando em meios envolvendo diversas concentrações de açúcares. Diante do exposto, para a observação do diâmetro e comprimento dos isolados, procurou-se utilizar o meio (BDA) para o desenvolvimento dos isolados. Através dos resultados (Tabela 11), pudemos observar que os isolados de capim apresentaram diâmetros significativamente maiores em relação aos isolados de milho e sorgo. Os comprimentos para os isolados de milho, sorgo e capim foram significativamente iguais. As medidas dos conídios obtidas estão de acordo com BERGQUIST e MASIAS (1974) e, MUCHOVEJ et alii (1988).

5.2. Patogenicidade

O método escolhido para a inoculação das plantas foi utilizado por THAKUR et alii (1989a) que consta do inóculo na concentração de 10.000 conídios/ml aspergido nas plantas com folhas até o quarto par, e depois transferidas para uma câmara com temperatura controlada de 22 C e umidade relativa de 100%. Perante esta metodologia conseguiu-se observar reação em todas as folhas.

Diversos pesquisadores indicaram que isolados de *Exserohilum turcicum* de um hospedeiro em particular, não necessariamente possui a mesma capacidade patogênica (MITRA, 1923; LEFEBVRE e SHERWIN, 1945; ROBLES, 1949; ROBERT, 1960; BHOWMIK e PRASADA, 1970; HAMID e ARAGAKI, 1975), podendo ser devida a presença nos isolados, de diferentes genes para a patogenicidade (NELSON, 1961). Dessa maneira, a reação das plantas perante a variabilidade de patógenos pode ser diferente (BHOWMIK e PRASADA, 1970).

Com o intuito de verificar o comportamento dos diferentes isolados perante os hospedeiros de milho, capim e sorgo, foram conduzidos os experimentos constantes no item 3.2.3.

Através dos resultados apresentados na Tabela 12 foi possível observar que o isolado de milho dos Estados Unidos produziu lesão em plantas de milho e não em sorgo e capim. Essa observação vem de encontro com MITRA (1923) e, segundo HAMID e ARAGAKI (1975), o isolado

passa a ser denominado como *Exserohilum turcicum* f.sp. *zeae*. Por outro lado, os isolados de milho do Brasil apresentaram reação com hospedeiros de milho e sorgo, e não com o capim, demonstrando serem diferentes do isolado de milho dos Estados Unidos. A reação aqui descrita não foi citada por LEFEBVRE e SHERWIN (1945), BHOWMIK e PRASADA (1970) e HAMID e ARAGAKI (1975).

Em relação aos isolados do sorgo, estes apresentaram lesão nos hospedeiros de milho, sorgo e capim massambará. Segundo HAMID e ARAGAKI (1975) isolados de sorgo quando atacavam os três hospedeiros seriam denominados de *Exserohilum turcicum* f. sp. *complexa*.

Através da Tabela 12, pode-se observar que os isolados de capim foram virulentos ao próprio capim, entretanto apresentando reação com nível de resistência ao milho e ao sorgo. Esta reação observada no capim e sorgo, está de acordo com CHIANG et alii (1989) onde os isolados apresentaram-se virulento ao Johnson grass, e avirulento ao sorgo.

Dessa maneira, confirma-se a existência, dentro dos isolados analisados de: *Exserohilum turcicum* f.sp. *zeae*; *Exserohilum turcicum* f. sp. *complexa*; isolados de milho virulentos ao milho e sorgo; e, isolados de capim virulentos ao capim, fracamente virulento ao milho e avirulento ao sorgo.

5.3. Eletroforese

Variação isoenzimática tem sido usada para determinar taxonomia de microorganismos quando as características morfológicas não são distintas (MEYER e RENARD, 1969). Isto tem sido possível porque as isoenzimas são consistentes no indivíduo e não são afetadas diretamente por fatores ambientais (BOSLAND e WILLIAMS, 1987).

A atividade enzimática e a mobilidade de enzimas na eletroforese podem ser afetadas por compostos fenólicos presentes no extrato do micélio promovendo uma coloração marron (ALFENAS, 1984). Esta oxidação foi prevenida com a utilização de polivinilpirrolidona (PVP) durante a extração o qual adsorve os compostos fenólicos deixando a enzima ou proteína livre (COOPER, 1981).

ALFENAS (1984) levantou a hipótese de que a análise de proteínas e de padrões enzimáticos, através da eletroforese, constitui valioso método para a determinação de componentes genéticos e fisiológicos do hospedeiro e do patógeno. Diante disto, os resultados no decorrer deste trabalho demonstraram certas diferenças e similaridades existentes entre isolados de *Exserohilum turcicum* com respeito ao padrão isoenzimático de Esterase e Peroxidase.

Observando as Figuras 6 e 11, a eletroforese envolvendo esterase dos isolados estudados, permite estabelecer uma comparação entre os isolados de milho, capim

e sorgo. Constatou-se para todos os isolados um padrão isoenzimático diferente e característico para milho, capim e sorgo. Isolados de milho do Brasil e isolados de capim não apresentaram entre si uma banda em comum definindo dessa maneira a não similaridade entre eles. O mesmo foi observado entre isolado de milho dos Estados Unidos e sorgo. Entre os outros isolados observou-se sempre a presença de banda em comum, isto é, para isolados de milho do Brasil e dos Estados Unidos banda com Rm 5,4 -5,6, para isolados de capim e sorgo banda com Rm 3,8- 4,2, para isolado de milho dos Estados Unidos e capim banda com Rm 2,8-3,1, e, para isolados de sorgo e milho do Brasil banda com Rm 2,1 -2,8 e 3,3-3,7. Dentro das três bandas dos isolados do Brasil, uma é comum ao isolado de milho dos Estados Unidos, e duas comuns aos isolados de sorgo não existindo nenhuma outra diferente dos outros isolados. Entretanto, entre isolados de milho dos Estados Unidos, sorgo e capim é possível observar bandas distintas que podem ser marcadores, isto é, específicas a cada isolado. Dessa maneira, isolado de milho dos Estados Unidos apresenta duas bandas com Rm 3,6-3,9 e 4,6-4,9, isolados de sorgo uma banda com Rm 4,3-4,6 e, isolados de capim duas bandas com Rm 4,5-4,7 e 5,1-5,4.

Passando-se agora à análise dos isolados através da eletroforese envolvendo peroxidase, verificou-se nas Figuras 8 e 11, número de bandas diferentes entre os isolados de milho, capim e sorgo. Destas, o que chama mais atenção é que os isolados de sorgo não apresentaram bandas

com Rm inferior a 2,6, presentes nos outros isolados. Em sequencia, observou-se que entre isolados de milho do Brasil e isolados de sorgo, entre isolado de milho dos Estados Unidos e capim, não existe banda correspondente demonstrando assim a não similaridade entre eles. Entre outros isolados observou-se bandas em comum como: entre isolados de milho do Brasil e capim com Rm 2,4-3, entre isolados de milho dos Estados Unidos e Brasil com Rm 1,4-1,6, e, entre isolados de milho dos Estados Unidos e sorgo com Rm 2,8-3,2. Entretanto, entre isolados de capim e sorgo duas bandas apresentaram-se como comuns (Rm 3,8 e Rm 4,3). A presença das bandas em comum indica a existência de uma similaridade parcial entre os isolados. Entretanto, os isolados apresentam bandas específicas como Rm 4-4,2 e, 4,4-4,6 para isolados de milho do Brasil, Rm 1,7-1,8 , 1,9-2 e, 4,3-4,4 para isolado de milho dos Estados Unidos, Rm 1,8 e 2,0 para isolados de capim, e para isolados de sorgo ausência de bandas com Rm inferior a 2,6.

Com respeito as análises densitométricas, as Figuras 7 e 9, mostraram-se bastante interessantes. O traçado eletroforético em forma de picos, representando as bandas de isoenzimas de esterase e peroxidase, dão uma idéia perfeita da diferença entre os isolados de milho-Brasil, milho-Estados Unidos, capim e sorgo.

Verifica-se ainda, para esterase e peroxidase, que dentro dos isolados de milho ou de capim ou

do sorgo, não houve variação de número de bandas mas diferença na intensidade.

Resultados similares foram obtidos por MACKO et alii (1967) onde detectaram diferenças nos padrões isoenzimáticos de peroxidase e polifenoloxidase para raças de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. BURDON et alii (1981) trabalhando com *Puccinia graminis* detectaram diferenças nos padrões enzimáticos envolvendo esterase, leucina aminopeptidase, dihidrolipoamida redutase e fosfoglucomutase entre formas especiais de *Puccinia graminis* patogênica e diferentes hospedeiros. ALFENAS et alii (1984) determinaram através de gel de poliacrilamida, diferenças nos padrões isoenzimáticos de esterase, peroxidase, fosfoglucomutase e hexoquinase entre os isolados de *Cryphonectria cubensis* oriundos do Hawai, Brasil e Africa.

Dessa maneira, através dos resultados obtidos, foi possível diferenciar os isolados através das isoenzimas. De acordo com outros pesquisadores a análise eletroforética abre a possibilidade de se utilizar as enzimas como marcadores moleculares para detecção de recombinações genéticas a nível de campo.

As extracções do DNA dos isolados de sorgo e capim com leitura no espectro na razão de 1,9 a 2. e os isolados de milho na razão de 1,8, traduziram a pureza do ácido nucleico sem contaminação de proteína ou fenol nos extratos de DNA (MANIATIS, 1982).

A separação eletroforética do DNA pode ser realizada em gel-agarose ou gel-poliacrilamida. Segundo MANIATIS (1982) e RAEDER e BRODA (1985) o gel-agarose separa moléculas até 60Kb enquanto o gel-poliacrilamida separa fragmentos de DNA menores do que 1 KB de tamanho. Para a coloração das bandas existem dois métodos sendo um usando brometo de etídeo e visualização em luz ultra-violeta a 300 e 360nm (RAEDER e BRODA, 1985), e outro, aplicando o método de prata (BLUM et alii, 1987). A fim de obter uma distinção entre isolados, MANIATIS (1982) sugere a utilização de uma variedade de endonucleases de restrição. Estas enzimas tem a capacidade de reconhecer sequências de bases específicas cortando a dupla-hélice do DNA num determinado sítio. Através destes cortes, obtém-se vários pedaços de DNA podendo uma das enzimas apresentar bandas diferentes entre os microorganismos. MANICOM et alii (1987) trabalhando com extratos de DNA de várias espécies de *Fusarium* fragmentados com enzima Hind III, foi possível observar diferenças entre isolados de *Fusarium oxysporum*, distinguindo assim as espécies.

No presente trabalho de pesquisa, foi utilizada sómente a enzima de restrição (Hpa I) a qual reconhece pedaços da hélice lendo GTTAAC cortando exatamente no meio da sequência. Através da separação em gel-poliacrilamida na concentração de 8%, com capacidade de separar 60 - 400 nucleotídeos, e coloração pelo método da

prata, foi possível visualizar uma banda idêntica para todos os isolados de *Exserohilum turcicum*. Como conclusão os isolados de *Exserohilum turcicum* apresentando uma mesma banda de DNA, são idênticos. Entretanto, para uma confirmação, seria necessária utilizar outras enzimas de restrição.

Como a técnica DNA-RFLP possui a desvantagem de ser um método dispendioso, não se torna prática a análise para diagnósticos de rotina. Entretanto as técnicas PAGE-enzimas por ser mais simples e por apresentarem resultados satisfatórios, é uma das técnicas indicadas pela sua praticidade na diferenciação de isolados.

5.4. Serologia

Os resultados observados no presente trabalho confirmam aqueles relatados por outros autores com relação ao material utilizado na imunização. Assim, como observado por FIGUEIREDO (1972), os antissoros produzidos contra conídios apresentaram reação específica. Da mesma forma MADOSINGH e WALLEN (1967) obtiveram reação sorológica de difícil interpretação, quando procuravam separar diversas espécies de *Ascochyta* utilizando antissoro obtido à partir de micélio. O mesmo em relação a antissoros obtidos de conídios foi observado por KIMATI (1975) quando identificou tres tipos de *Colletotrichum* (*Colletotrichum falcatum*,

Colletotrichum graminicola f. sp. *zeae*, e, *Colletotrichum graminicola* f. sp. *sorghii*).

Dessa maneira, os antissoros preparados para isolados de *Exserohilum turcicum* foram analisados perante os antígenos, extraídos a partir de micélios e conídios, através de testes serológicos.

Estudos das reações serológicas em testes de dupla-difusão em ágar, efetuados com antígenos extraídos de conídios e/ou micélios contra os mesmos antissoros, em reações homólogas, demonstraram que as linhas de precipitação observadas apresentaram identidade. Tal fato parece indicar que os anticorpos produzidos contra isolados de capim e milho teriam os mesmos determinantes antigênicos. A falta de outras linhas de precipitação devido a baixa concentração de determinantes antigênicos específicos pode não ser visualizado no teste de dupla-difusão em ágar entretanto pode ser através de outras técnicas serológicas mais sensíveis.

Um teste capaz de detectar antígenos de reação cruzada ou comuns presentes nas preparações em baixa concentração é o teste de ELISA (ALBA e DEVAY, 1985).

Uma adequada padronização do ELISA é a chave para a alta precisão e sensibilidade do teste. Dessa maneira, VOLLER (1976) e MARTENSSON et alii (1984) sugeriram padronizar o método incluindo a quantificação de antígeno e

diluição do conjugado até que, em termos de absorbância, seja observada uma definida distinção nos resultados. Para a quantificação do antígeno e do conjugado foi conduzido um teste de ELISA utilizando antígenos de 150 a 600 ug em equivalente de SAB/ml de tampão PBS-Tween, perante conjugado em diluições de 1:5 e 1:10 em tampão PBS. A otimização dos resultados foi observada com antígenos obtidos tanto de micélio como de conídios envolvendo 600ug em equivalente de SAB/ml e conjugado na diluição de 1:5.

Analisando os resultados do teste de ELISA obtidos com antígenos extraídos de micélios e antissoros do próprio micélio não foi observada qualquer diferença entre os isolados de *Exserohilum turcicum*.

O emprego do antígeno extraído de conídios contra o antissoro produzido para conídio, também em ELISA, demonstrou ser o mais adequado pelo fato de visualizar as reações específicas. Dessa maneira, o antissoro de milho distinguiu os isolados de milho e sorgo dos isolados de capim, exceto quanto ao isolado de milho dos Estados Unidos (isolado número 3) (Tabela 15), mas não entre milho e sorgo.

Em relação ao antissoro produzido para conídio do isolado de capim, observa-se o inverso onde esse antissoro distinguiu os isolados de capim dos isolados de milho e sorgo, não se conseguindo todavia distinguir o isolado de milho dos Estados Unidos (isolado número 3) dos demais isolados de milho.

Os valores em termos de absorbância obtidos nas reações de antissoro produzido para conídio do isolado de capim com antígenos dos isolados de sorgo revelaram-se intermediários em relação as reações obtidas entre esse antissoro e os antígenos de isolados de milho e capim.

As reações vieram provar que os antissoros obtidos a partir de conídios foram mais específicos do que aqueles preparados contra micélios. Isto vem de encontro com FIGUEIREDO (1972) e KIMATI (1975) quando utilizavam antígenos de conídios aplicado em outra técnica provando a especificidade do antissoro obtido a partir de conídios.

Sem dúvida isto não ocorre com todos os fungos pois MOHAN (1989) utilizando teste de ELISA determinou que antissoros obtidos de micélios foram os específicos para identificar *Phytophthora fragariae* de outras espécies desse gênero.

Em apoio a esta diferença encontrada e, traçando um paralelo com outros campos da serologia, aplicada a taxonomia, verifica-se, por exemplo, que na serobotânica tem-se notado uma marcante tendência ao emprego de estruturas reprodutivas (sementes, pólen etc.)

como antígeno imunizante porque estas são menos sujeitas a variações do que os tecidos somáticos (FAIRBROTHERS, 1968).

5.5.Considerações finais

Embora confídios de todos os isolados de *Exserohilum turcicum* sejam iguais, com excessão dos isolados de capim de *Exserohilum turcicum* com diâmetro diferente, o presente trabalho vem demonstrar através do emprego de outras técnicas mais modernas a diferenciação entre os isolados.

Na patogenicidade foi possível observar que isolado de milho dos Estados Unidos pode ser classificado como *Exserohilum turcicum* f. sp. *zeae*; isolado de sorgo classificado como *Exserohilum turcicum* f. sp. *complexa*; isolado de milho do Brasil patogênico a milho e sorgo e, isolado de capim patogênico a capim.

A análise eletroforética das enzimas esterase e/ou peroxidase através das isoenzimas específicas e ausência de similaridade, propiciaram diferenciação entre os isolados.

Para melhor observação da diferença entre os isolados de milho, capim e sorgo de *Exserohilum turcicum*, procurou-se associar os resultados obtidos na serologia (ELISA) e eletroforese.

Perante a serologia o antissoro do isolado de milho distinguiu isolados de milho do Brasil e dos Estados Unidos resultado este de acordo com o observado na análise eletroforética da esterase pela presença de número de bandas diferentes, mobilidade diferente e, presença de uma banda comum indicando uma pequena similaridade entre eles. Através da eletroforese envolvendo peroxidase, observa-se também número de bandas diferentes envolvendo duas bandas comuns mas com bandas específicas a cada um isolado demonstrando assim, a diferenciação entre eles. Entretanto, o mesmo antissoro distinguiu não só os isolados de milho como também dos isolados de capim, resultado este de acordo com a não similaridade observada na eletroforese-esterase.

Em relação ao antissoro do isolado de capim, este distinguiu os isolados de capim dos isolados de milho, resultado de acordo com a não similaridade em eletroforese-esterase dos isolados de milho do Brasil e capim. Entretanto, perante a mesma eletroforese foi possível observar uma banda com mobilidade semelhante entre isolado de milho dos Estados Unidos e isolados de capim podendo traduzir uma similaridade entre eles o que não foi possível observar no teste serológico.

Os isolados de sorgo perante a serologia com o antissoro de capim, apresentaram valores de absorbância intermediários para com antígenos de isolados de milho e

capim. Isto pode ser associado observando a eletroforese-esterase onde bandas de isolados de sorgo são comuns aos isolados de milho e aos isolados de capim. Já perante o antissoro do isolado de milho, não foi possível observar diferença entre isolados de milho do Brasil e isolados de sorgo, resultados de acordo com a similaridade de bandas na eletroforese-esterase.

Perante a eletroforese-peroxidase é possível diferenciar os isolados mas a associação com a serologia em muitos casos foi de difícil interpretação.

O conjunto de dados aqui apresentados, indica que o emprego de técnicas serológicas e eletroforéticas podem contribuir para o estudo de relações entre microorganismos. Os resultados obtidos abrem possibilidades de novas pesquisas através do estudo de um maior número de isolados e fungos, no sentido de ampliar um conhecimento mais preciso das relações entre as espécies.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho propiciaram as seguintes conclusões:

1. Morfológicamente, os conídios dos isolados de capim foram significativamente maiores do que os dos isolados de milho e sorgo. A esporulação dos isolados de capim foi maior no meio de LCH enquanto que, os isolados de milho e sorgo apresentaram número de conídios maior no meio BDA.

2. Perante a patogenicidade o isolado de milho dos Estados Unidos pode ser classificado como *Exserohilum turcicum* f. sp. *zeae*; isolados de sorgo classificados como *Exserohilum turcicum* f. sp. *complexa*; entretanto isolados de milho do Brasil patogênicos ao milho e ao sorgo e, isolados de capim virulentos ao capim, fracamente virulentos ao milho e avirulentos ao sorgo não puderam ser enquadrados nas formas especiais já descritas.

3. Perante o teste serológico de dupla-difusão em ágar, não foi possível detectar qualquer distinção entre os isolados enquanto que, através do teste DAS-ELISA, foi possível distinguir isolados de capim dos isolados de milho e sorgo. Entretanto, isolados de sorgo aparecem como intermediários aos outros isolados.

4. Análises eletroforéticas isoenzimáticas (peroxidase, esterase) permitiram diferenciar os isolados de capim, milho e sorgo.

5. Pela associação dos resultados do teste de ELISA e eletroforese-esterase foi possível observar que:

-Isolados de milho do Brasil e milho dos Estados Unidos são diferentes.

-Isolados de milho são diferentes dos isolados de capim.

-Isolados de sorgo são isolados intermediários aos isolados de capim e milho.

6. Todos os isolados de *Exserohilum turcicum* apresentaram o mesmo tamanho de DNA.

7. O emprego da serologia (ELISA) e eletroforese mostraram ser promissores como métodos na distinção de *Exserohilum turcicum* isolados de milho, sorgo e capim.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A Compendium of Corn Diseases. Fungal Diseases, University Illinois, Usa, 1976. p. 12-16.

ADASKAVEG, J. E., STANGHELLINI, M. E., GILBERTSON, R. L.
Comparative protein studies of several *Pythium* species
using isoelectric focusing. *Mycologia*, Bronx, N. Y., 80:
665-672, 1988.

AGNIBOTRI, V. P. Some nutritional and environmental factors
affecting growth and production of sclerotia by a strain
of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, Canadá, 15:
835-840, 1969.

ALBA, A. P. C., NAMEKATA, T., MORAES, W. B. C., OLIVEIRA, A. R.,
FIGUEIREDO, M. B. Serological studies on coffee rust. *Arq.
Inst. Biol.*, São Paulo, 40: 227-231, 1973.

ALBA, A. P. C. , MORAES, W. B. C. , FIGUEIREDO, M. B. Estudos serológicos de antígenos externos e internos de esporos de *Ascochyta phaseolorum* Sacc. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 9:13, 1976.

ALBA, A. P. C. , GUZZO, S. D. , MAHLOW, M. F. P. , MORAES, W. B. C. Common antigens in extracts of *Hemileia vastatrix* urediniospores and of *Coffea arabica* leaves and roots. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 8: 473-483, 1983.

ALBA, A. P. C. , BACH, E. E. , MORAES, W. B. C. Detecção de antígenos comuns a cafeeiros e a *Hemiléia vastatrix* através de ELISA indireto, com antissoros produzidos em camundongos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 10: 257, 1985.

ALBA, A. P. C. & DEVAY, J. E. Detection of cross-reactive antigens between *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary and *Solanum* species by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathol. Z.*, Berlin, 112: 97-104, 1985.

ALCORN, J. L. The taxonomy of *Helminthosporium* species. *Ann. Rev. Phytopathol.*, Palo Alto, 26: 37-56, 1988.

ALFENAS, A. C. , JENG, R. , HUBBES, M. Isoenzyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Can. J. Bot.*, Canadá, 62: 1756-1762, 1984.

ALFENAS, A. C. , BRUNE, W. , BROMMONSCHEN EL, S. H. Manual de eletroforese de proteínas e isoenzimas em géis de amido e poliacrilamida. Vicosia, 1987. 74p.

AMOS, R. E. & BURREL, R. G. Serological differentiation in *Ceratocystis*. *Phytopathology*, St. Paul. , 57: 32-34, 1967.

BACH, E. E. , ALBA, A. P. C. , RODRIGUES NETO, J. Detection of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 7: 407-415, 1982.

BACH, E. E. Utilização da eletroforese no estudo de alterações enzimáticas na interação planta-patógeno. I Encontro sobre aplicações da eletroforese na agropecuária, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 1989. p 1-4.

BALMER, E. Doenças do milho - manchas foliares causadas por espécies de *Helminthosporium*. IN: Melhoramento e produção do milho no Brasil. Fundação Cargill, ESALQ, Piracicaba, 1978. p.490-493.

BERGQUIST, R.R. & MASIAS, O.R. Physiologic specialization in *Trichometasphaeria turcica* f.sp. *zeae* and *T. turcica* f.sp. *sorghii* in Hawaii. *Phytopathology*, St. Paul., 64: 645-649, 1974.

BHOWMIK, T.P. & PRASADA, R. Physiologic specialization in *Helminthosporium turcicum* Pass. from India. *Phytopathology* Z., Berlin, 60: 84-87, 1970.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, Weinheim, Verlag, 8: 93-99, 1987.

BOSLAND, P. & WILLIAMS, P.H. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographic origin. *Can. J. Bot.*, Canada, 65: 2067-2073, 1987.

BOWEN, L. & PEDERSEN, W.L. Effects of northern leaf blight and detasseling on yields and yield components of corn inbreds. *Plant Disease*, St. Paul., 72: 952-956, 1988.

BROWN, T. A. Gene cloning - an introduction. Van Nostrand Reinhold, Berkshire, England, 1986.

BROWN, J. K. M., O'DELL, M., SIMPSON, C. G., WOLFE, M. S. The use of DNA polymorphisms to test hypotheses about a population of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Plant Pathology, London, 39: 391-401, 1990.

BURDON, J. J. & MARSHALL, D. R. Isozyme variation between species and formas speciales of the genus *Puccinia*. Can. J. Bot., Canadá, 59: 2628-2634, 1981.

BURDON, J. J., MARSHALL, D. R., LUIG, N. H. Isozyme characterization of somatic hybrids between stem rust pathogens of wheat and rye. Nature, London, 293: 565-566, 1981.

BURDON, J. J., MARSHALL, D. R., LUIG, N. H., GOW, D. J. S. Isozyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Australia. Aust. J. Biol. Sci., Austrália, 35: 231-238, 1982.

BURDON, J. J., LUIG, N. H., MARSHALL, D. R. Isozyme uniformity and virulence variation in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *P. recondita* f. sp. *tritici* in Australia. Aust. J. Biol. Sci., Austrália, 36: 403-410, 1983.

BUXTON, E. W., CULBRETH, W., ESPOSITO, R. G. Serological separation of forms and physiologic races of pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, St. Paul., 51:575, 1961.

CASPER, R. & MENDGEN, K. Quantitative serological estimation of a hyperparasite: detection of *Verticillium lecanii* in yellow rust infected wheat leaves by ELISA. *Phytopathology Z.*, Berlim, 94:89-91, 1979.

CASTRO, C. Eletroforese de DNA em estudos de fitopatógenos. II Encontro sobre aplicações em eletroforese na agropecuária. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, p.1-13, 1990.

CENTURION, M. A. P. C. Compatibilidade sexual e caracterização serológica e patogênica de *Fusarium moniliforme* Sheldon. Piracicaba, 1985 (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

CHANG, L. O., SRB, A. M., STEWARD, F. C. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. *Nature*, London, 193:756-759, 1962.

- CHANG, H. S. & FAN, K. C. Comparative studies on some biology and pathology of corn and broom corn isolates of *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs. Bot. Bull. Academia Sinica, China. 27: 209-218, 1986.
- CHIANG, MOU-YEN, DYKE, G. G. VAN., LEONARD, K. J. Evaluation of endemic foliar fungi for potencial biological control of Johnsongrass (*Sorghum halepense*): Screening and host range tests. Plant Disease, St. Paul., 73: 459-464, 1989.
- CLARE, B. G. & ZENTMEYER, G. A. Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. Phytopathology, St. Paul., 56: 1334-1335, 1966.
- CLARK, M. F. & ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol., Virginia, 34: 475-483, 1977.
- COOPER, T. G. Biochemische Arbeitsmethoden. Ed. W. Gruyter, Berlin, 1981. 415p.

DURBIN, R.D. Comparative gel electrophoretic investigations of the protein patterns of *Septoria* species. *Nature*, London, 210:1186-1187, 1966.

ELLIOTT, E.S. The effect of the sugar concentration on conidial size of some species of *Helminthosporium*. *Phytopathology*, St. Paul., 39:953-958, 1949.

FAIRBROTHERS, D.E. Chemosystematics with emphasis on systematic serology. IN: Heywood, V.H., *Modern method in plant taxonomy*, London, 1968. p.1500-173.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patogênicos em plantas. *Biológico*, São Paulo, 33:9-13, 1967.

FIGUEIREDO, M.B. Estudos fisiológicos e sorológicos sobre o fungo *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e sobre a doença por ele causada em beringela (*Solanum melongena* L.) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, 1972, 130p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FIGUEIREDO, M.B. & NAMEKATA, T. *Ascochyta phaseolorum* Sacc. e outros fungos do gênero *Ascochyta*. I-Sorologia e sua aplicação na sistemática. *Ann. Inst. Biol.*, São Paulo, 41:67-93, 1974.

FIGUEIREDO, M. B. & PIMENTEL, C. P. V. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 1: 209-302, 1975.

FIGUEIREDO, M. B., ALBA, A. P. C., OLIVEIRA, A. R. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatogênicos. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 3: 233-259, 1977.

FROSI, J. F. & BALMER, E. Reações de linhagens de milho a *Helminthosporium turcicum* Pass em casa de vegetação. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 5: 229-238, 1980a.

FROSI, J. F. & BALMER, E. Reações de linhagens de milho a *Helminthosporium turcicum* Pass em condições de campo. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 5: 239-244, 1980b.

GARRAWAY, M. O. & EVANS, R. C. Growth of fungi. In: GARRAWAY, M. O. & EVANS, R. C., ed. Fungal nutrition and physiology. USA, John Wiley e Sons Inc., 1984, p. 231-263.

GEVERS, H. O. A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize. Plant Dis. Rptr., St. Paul., 59: 296-299, 1975.

- GERALDI, M. A. P. & KIMATI, H. Caracterização patogênica e serológica de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (sensu Arx. 1957) do trigo (*Triticum aestivum* L.) *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 8:16-28, 1982.
- GHINI, R. & KIMATI, H. Caracterização morfológica, serológica e patogênica de espécies de *Botrytis* que ocorrem na cultura da cebola (*Allium cepa* L.). *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 11:127-139, 1985.
- GILL, H. S. & POWELL, D. Polyacrilamide gel (disc) electrophoresis of physiologic races A-1 to A-8 of *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology*, St. Paul., 58:722-723, 1968.
- GILL, H. S. & ZENTMEYER, G. A. Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology*, St. Paul., 68:163-167, 1978.
- GLYNN, A. N. & REID, J. Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus *Fusarium*. *Can. J. Bot.*, Canadá, 47:1823-1831, 1969.

GOBBI, E. , WANG, Y. , MARTIN, R. M. , POWELL, W. A. , VAN ALFEN, N. K. Mitochondrial DNA of *Cryphonectria parasitica*: Lack of migration between vegetatively compatible strains. Molec. Plant-Microbe interactions, USA, 3: 66-71, 1990.

GOODING JR. , G. V. Preparation of macromolecular antigens from *Fomes annosus*. Phytopathology, St. Paul. , 56:1310-1311, 1966.

HAMID, ALI H. & ARAGAKI, M. Inheritance of pathogenicity in *Setosphaeria turcica*. Phytopathology, St. Paul. , 65:280-283, 1975.

HARRISON, J. G. , BARKER, H. , LOWE, R. , REES, E. A. Estimation of amounts of *Phytophthora infestans* mycelium in leaf tissue by enzyme-linked immunosorbent assay. Plant Path., London, 39: 274-277, 1990.

HENNESEY, G. G. , MILLIANO, W. A. J. , MCLAREN, C. G. Influence of primary weather variables on sorghum leaf blight severity in southern Africa. Phytopathology, St. Paul. 80: 943-945, 1990.

HILU, H. M. & HOOKER, A. L. Localized infection by *Helminthosporium turcicum* on corn leaves. Phytopathology, St. Paul. , 55:189-192, 1965.

- HO, Y.W., VARGHESE, G., TAYLOR, G.S. Protein and esterase patterns of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *elacidis* and *Fusarium oxysporum* var. *mediolens* from Africa and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* from Malaysia. *Phytopathology* Z., Berlin, 114:301-311, 1985.
- HUGHES, S. J. Conidiophores, conidia and classification. *Can. J. Bot.*, Canadá, 31:577-659, 1953.
- HUGHES, S. J. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus rejiciendis. *Can. J. Bot.*, Canadá, 36:727-836, 1958.
- HULBERT, S. H. & MICHELMORE, R. W. DNA restriction fragment lenght polymorphism and somatic variation in the lettuce downy mildew fungus, *Brevia lactucae*. *Molec. Plant-microbe interact.*, USA, 1:17-24, 1988.
- IGARASHI, S. Sensibilidade a fungicidas e caracterização morfológica, patogênica e serológica de *Colletotrichum* spp. do morango (*Fragaria* spp.). Piracicaba, 1984 (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- ISSA, E. Controle químico de *Helminthosporium turcicum* Pass. em milho pipoca, *Zea mays* L. *Biológico*, São Paulo, 49:41-44, 1983.

JUNQUEIRA, N. ., ALFENAS, A. C. , CHAVES, G. M. ; ZAMBOLIM, L. ,
 GASPAROTTO, L. Variabilidade isoenzimática de isolados
 de *Microcyclus ulmi* com diferentes níveis de virulência. *Revista*
Fitopatologia Brasileira, Brasília, 12: 208-214, 1987.

JVO, P. S. & STOTZKY, G. Electrophoretic analysis of isozymes
 from seeds of *Pinus abies* and *Pseudotsuga*. *Can. J. Bot.*,
 Canadá, 51: 2201-2205, 1973.

KAFI, A. & TARR, S. A. J. Growth, sporulation and conidial
 characteristics of five graminicolous species of
Helminthosporium. I. Effect of nutrients. *Trans. Br.*
Mycol. Soc., Inglaterra, 49: 327-337, 1966.

KIMATI, H. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de
~~*Colletotrichum graminicola*~~ *Colletotrichum graminicola* (Ces. Des.) Willk. (sensu
 Arx, 1957). Piracicaba, 1975. 103p. (Livre-docência-
 Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.

LEATH, S. & PEDERSEN, W. L. An inoculation technique to
 detect the HtN gene in inbred lines of corn under
 greenhouse conditions. *Plant Disease*, St. Paul., 67: 520-
 522, 1983.

LEFEBVRE, C. L. & SHERWIN, H. S. Races of *Helminthosporium*
turcicum. *Phytopathology*, St. Paul., 35: 487, 1945.

LEONARD, K. J. & SUGGS, E. G. Reaction of corn hybrids to *Exserohilum prolatum*. Plant Disease Reporter, St. Paul., 58: 612-615, 1974.

LEONARD, K. J., THAKUR, R. P., & LEATH, S. Incidence of *Bipolaris* and *Exserohilum* species in corn leaves in north Carolina. Plant Disease, St. Paul., 72: 1034-1038, 1988.

LEONARD, K. J., LEVY, Y., SMITH, D. R. Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. Plant Disease, St. Paul., 73: 76-777, 1989.

LEONG, S. A. & HOLDEN, D. W. Molecular genetic approaches to the study of fungal pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 27: 463-481, 1989.

LEUNG, H. & WILLIAMS, P. H. Enzyme polymorphism and genetic differentiation among geographic isolates of the rice blast fungus. Phytopathology, St. Paul., 76: 778-783, 1986.

LINDBERG, G. D. Bacterial reservoir of an agent infectious to fungi. Phytopathology, St. Paul., 73: 850-854, 1983.

LOWRY, O. H. , ROSENBROUGH, N. J. , FARR, A. L. , RANDALL, R. J. .

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., Baltimore, 193:265-275, 1951.

LU, T. H. & GEOTH, J. U. Isozyme detection and variation in

Uromyces appendiculatus. Can. J. Bot., Canada, 66:885-

890, 1987.

LUTTRELL, E. S. Leptosphaeria (Metasphaeria) perfect stages

for *Helminthosporium turcicum* and *Helminthosporium*

rostratum. Phytopathology, St. Paul, 47:313, 1957.

LUTTRELL, E. S. The imperfect stage of *Helminthosporium*

turcicum. Phytopathology, St. Paul, 48:281-286, 1958.

MACKO, V. , NOVACHY, A. , STAHMANN, M. A. Protein and enzyme

patterns from uredospores of *Puccinia graminis* var.

tritici. Phytopathology Zeitschrift, Berlin, 58:122-127,

1967.

MADHOSINGH, C. A serological comparison of three *Fusarium*

species. Can. J. Bot., Canada, 42:1143-1146, 1964.

MADHOSINGH, C. & WALLEN, V. R. Serological differentiation of the *Ascochyta* species on peas. *Can. J. Microbiol.*, Canada, 14: 449-451, 1967.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982. 545p.

MANICOM, B. Q., BAR-JOSEPH, M., ROSNER, A., VIGODSKY-HAAS, H., KOTZE, J. M. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the *Fusaria*. *Phytopathology*, St. Paul., 77: 669-672, 1987.

MARTENSSON, A. M., GUSTAFSSON, J. G., LJUNGGREN, H. D. A modified, highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Rhizobium meliloti* strain identification. *J. of General Microb.*, Inglaterra, 130: 247-253, 1984.

MASIAS, O. R. & BERGQUIST, R. R. Host-specific forms of *Trichometasphaeria turcica* in relation to homokaryons and heterokaryons in nature. *Phytopathology*, St. Paul., 64: 436-438, 1974.

MEYER, J. A. & RENARD, J. L. Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, St. Paul., 59:1409-1411, 1969.

MITRA, M. *Helminthosporium* spp. on cereals and sugarcane in India. Part I. Diseases of *Zea mays* and *Sorghum vulgare* caused by species of *Helminthosporium*. Mem. Dept. Agric. India. Bot. Ser., India, 11:219-242, 1923.

MOHAN, S. B. Cross-reactivity of antiserum raised against *Phytophthora fragariae* with other *Phytophthora* species and its evaluation as a genus - detecting antiserum. *Plant-Path.*, London, 38:352-363, 1989.

MORTON, D. J. & DUKES, P. D. Serological differentiation of race 1 from race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Dis. Rep.*, St. Paul., 50:444-445, 1966.

MUCHOVEJ, J. J., MUCHOVEJ, R. M. C., RIBEIRO-NEBIO, M. L. Taxonomia de *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, 13:211-223, 1988.

NADOLNY, L. & SEQUEIRA, L. Increases in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. *Phys. Plant Path.*, London, 16: 1-8, 1980.

NELSON, R. R. Evidence of gene pools for pathogenicity in species of *Helminthosporium*. *Phytopathology*, St. Paul., 51: 736-737, 1961.

O'DELL, M., WOLFE, M. S., ELAVELL, R. D., SIMPSON, C. G., SUMMERS, R. W. Molecular variation in populations of *Erysiphe graminis* on barley, oats and rye. *Plant Path.*, London, 38: 340-351, 1989.

OGASAWARA, N., HONMA, N., ISHIWARA, K., TANAKA, H., TAMARI, R. K. Biochemical changes during formation of conidia. Morphological and Biochemical events in plant-parasite interaction. In: AKAI, S. & OUCHI, S., ed. *Phytopathol. Society of Japan*. Tokyo, 1971. p. 129-152.

OLIVEIRA, A. R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1: 61-64, 1975.

PONTECORVO, G. Minimal medium for fungi. *Advances in Genetic, Inglaterra*, 5: 141-283, 1953.

RAEDER, U. & BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters of Applied Microbiology, Inglaterra*, 1: 17-20, 1985.

REDDY, S.M. & BILGRAMI, K.S. Studies on some species of *Helminthosporium*. *Indian Phytopathol.*, India, 22: 429-437, 1969.

ROBERT, A.L. Physiologic specialization in *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology, St. Paul.*, 50: 217-220, 1960.

ROBLES, L.H. The pathogenicity of species of *Helminthosporium* on corn. *Phytopathology, St. Paul.*, 39: 1020-1027, 1949.

RODRIGUEZ, A.E. & ULLSTRUP, A.J. Pathogenicity of monoascosporic progenies of *Trichometasphaeria turcica*. *Phytopathology, St. Paul.*, 52: 599-601, 1962.

SHIPTON, W.A. & MCDONALD, W.C. The electrophoretic patterns of proteins extracted from spores and mycelium of two *Drechslera* species. *Can. J. Bot., Canada*, 48: 1000-1002, 1970.

SHOEMAKER, R. A. Nomenclature of Drechslera and Bipolaris, grass parasites segregate from Helminthosporium. Can. J. Bot., Canada, 37: 879-887, 1959.

SHREE, M. P. & REDDY, C. N. Effect of Helminthosporiose infection on certain biochemical constituents in the resistant and susceptible varieties of sorghum. Indian J. Plant Path., India, 4: 46-52, 1986.

SMITH, D. R. & KINSEY, J. G. Further morphologic specialization in Helminthosporium turcicum. Plant Dis., St. Paul., 64: 779-781, 1980.

STEGEMANN, H. & BURGERMEISTER, W. Gel-elektrophorese und Isoelektrische-fokussierung. BBA- Braunschweig, 1987.

SZECSI, A. & TOTH, S. Comparison of isolates in the Chaetomium aureum species group by esterase isoenzyme analysis. Can. J. Bot., Canada, 65: 198-201, 1987.

TEMPEL, A. Serological studies on Fusarium oxysporum Schl. emend Sn. et H. Nature, Nova York, 180: 1483, 1957.

- TERANISHI, J. , FIGUEIREDO, M. B. , CARDOSO, R. M. G. ; NAMEKATA, T. The value of serological techniques for the differentiation between *Verticillium albo-atrum* Rein e Berth and *V. dahliae* leb. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 40: 45-51, 1973.
- THAKUR, R. P. , LEONARD, K. J. , JONES, R. K. Characterization of a new race of *Exserohilum turcicum* virulent on corn with resistance gene HtN. Plant Dis., St. Paul., 73: 151-155, 1989a.
- THAKUR, R. P. , LEONARD, K. J. , LEATH, S. Effects of temperature and light on virulence of *Exserohilum turcicum* on corn. Phytopathology, St. Paul., 79: 631-635, 1989b.
- TUITE, J. Media and nutrient solutions. In: TUITE, J. , ed. Plant Pathological Methods. Mineápolis, Burgess Publishing Company, 1969. p. 40 e p. 143.
- TUSKAN, G. A. & WALLA, J. A. Isozyme characterization of *Peridermium harknessii* and *Cronartium quercuum* f. sp. *banksianae* with starch gel electrophoresis. Phytopathology, St. Paul., 79: 444-448, 1989.

VOLLER, A. , BIDWELL, D.E. , BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World Health Organ., Europa, Flowline Publications. 53:55-56, 1976.

WALLEVIK, K. & JENSENIUS, J.C. A simple and reliable method for the drying of polyacrylamide slab gels. J. Biochem. Biophys. Meth., USA, Elsevier Biomedical Press, 6:17-21, 1982.

ZHU, H. , HIGGINBOTHAM, K.O. , DANCE, B.P. , NAURATIL, S. Intraspecific genetic variability of isozymes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus*. Can. J. Bot., Canada, 66:588-594, 1988.