Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Agressividade de isolados de *Cercospora zae-maydis* em genótipos de milho

Sandra Marisa Mathioni

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba

2006

Sandra Marisa Mathioni

Engenheiro Agrônomo

Agressividade de isolados de *Cercospora zae-maydis* em genótipos de milho

Orientador:

Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Mathioni, Sandra Marisa

Agressividade de isolados de *Cercospora zeae-maydis* em genótipos de milho /
Sandra Marisa Mathioni. - - Piracicaba, 2006.
55 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Cercosporiose 2. Genótipos 3. Melhoramento genético vegetal 4. Milho 5. Resistência
genética vegetal 6. Variação genética em plantas I. Título

CDD 633.15

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais, Salete e Ermindo,
e meus irmãos, Pedro e Claudia,

DEDICO

Ao meu amor André
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação, dedicação e amizade durante esta fase.

Aos meus pais, Salete Uliana e Ermindo Mathioni, e meus irmãos Claudia Mathioni e Pedro Natael Mathioni, pelo incentivo, amor e compreensão.

Ao André Beló pelo amor, paciência e auxílio muito oportuno durante todo o mestrado.

À empresa Dow Agrosciences Ltda pelo apoio para o desenvolvimento do trabalho.

Aos melhoristas Roberto V. de Carvalho e Renato Pereira, pelo auxílio técnico, científico e pela amizade construída neste período.

À Kátia Regiane Brunelli, pela ajuda e contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários da empresa Dow Agrosciences Ltda pelo apoio, principalmente José Donizete e Luciano Rosa.

Ao Professor Isaías Olívio Geraldi pelas contribuições e amizade.

Ao Departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, pelos auxílios prestados, em especial a Léia.

Ao Departamento de Fitopatologia pela acolhida e apoio para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular, Daniel, Ana Carolina, Juliana, Fátima, Osmar, Claudia, Marcelo, Ana, Raphaele, Júlia, Thayne, Reinaldo, Neiva, Mariana e Fernanda pela amizade e contribuição nos trabalhos.

Aos amigos do Departamento de Fitopatologia, Fernanda, Rodolfo, Jéferson, Heloisa e Pedro, pela amizade e contribuições para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos Cristiane, Eliane, Mateus, Alexandre, Éder, Luiz Antônio, Fernando, Edgar, Marco, Jair, Priscila, Márcia, Alderi, Farias, Vanessa, Alessandra, Tassiano e Sidnei, pelas conversas descontraídas e pelos momentos alegres que passamos juntos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão de literatura	11
2.1.1 A cultura do milho (<i>Zea mays</i> L.)	11
2.1.2 <i>Cercospora zeae-maydis</i> e a cercosporiose do milho.....	13
2.1.3 Avaliação da cercosporiose do milho.....	14
2.1.4 Diversidade de <i>Cercospora zeae-maydis</i>	15
2.1.5 Distribuição geográfica dos grupos genéticos de <i>Cercospora zeae-maydis</i>	18
2.1.6 Melhoramento genético visando resistência a <i>Cercospora zeae-maydis</i>	19
2.2 Material e métodos	23
2.2.1 Isolados de <i>Cercospora zeae-maydis</i>	23
2.2.2 Agressividade de isolados de <i>C. zeae-maydis</i> sob condições de casa de vegetação	26
2.2.3 Agressividade de isolados de <i>C. zeae-maydis</i> sob condições de campo	28
2.3 Resultados.....	31
2.3.1 Agressividade de isolados de <i>C. zeae-maydis</i> sob condições de casa de vegetação	31
2.3.2 Agressividade de isolados de <i>C. zeae-maydis</i> sob condições de campo	33
2.4 Discussão	38
2.4.1 Agressividade de isolados de <i>C. zeae-maydis</i> sob condições de casa de vegetação	38
2.4.2 Agressividade de isolados de <i>C. zeae-maydis</i> sob condições de campo	40
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO	52

RESUMO

Agressividade de isolados de *Cercospora zeae-maydis* em genótipos de milho

A cultura do milho (*Zea mays* L.) apresenta grande importância cultural, social e econômica, tanto no Brasil como no mundo. Entre os fatores que contribuem grandemente para a diminuição de sua produtividade estão as doenças. A mancha de cercospora ou cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora zeae-maydis* Tehon & Daniels, é uma das principais doenças da cultura em vários países. Uma vez que o uso de híbridos resistentes é a medida mais eficiente para o seu controle, a caracterização e a discriminação de genótipos de milho quanto ao nível de resistência e de isolados do patógeno quanto ao nível de agressividade é uma etapa fundamental de qualquer programa de melhoramento. Isolados de *C. zeae-maydis* podem ser classificados em dois grupos genéticos, denominados I e II, segundo análise por marcadores AFLP e por restrição da região intergênica espaçadora do rDNA 5.8S. No Brasil, há ocorrência dos dois grupos, mas nos Estados Unidos há uma prevalência do grupo I sobre o grupo II, ao passo que em países do sul da África verifica-se somente a presença de indivíduos do grupo II. Presentemente, não há nenhum relato sistemático sobre diferenças em agressividade entre indivíduos destes grupos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a agressividade de 20 isolados de *C. zeae-maydis* dos grupos genéticos I e II quando inoculados em um híbrido de milho suscetível e também testar o comportamento de 10 linhagens de milho frente a oito isolados em dois ambientes para verificar a possível presença de interação diferencial entre isolado, linhagem e local. Para tanto, os isolados foram cultivados em sementes de sorgo para produção de inóculo. Sementes colonizadas foram depositadas no cartucho das plantas e as avaliações foram realizadas utilizando-se escalas diagramáticas. No experimento em casa de vegetação foi verificada uma variação em agressividade entre os isolados do grupo genético I, do grupo genético II e entre os grupos. Observou-se ainda que isolados pertencentes ao grupo genético II são, em média, mais agressivos que isolados do grupo genético I. Este é o primeiro relato de diferenças em agressividade entre os grupos genéticos. No experimento em campo não foram observadas diferenças significativas quanto à agressividade dos isolados avaliados em Jardinópolis (SP) e Indianópolis (MG). Entretanto, observou-se forte interação entre linhagens e locais, indicando que o ambiente exerce influência na doença. Dessa forma, recomendam-se avaliações em ambientes diferentes e a utilização de isolados mais agressivos e pertencentes aos dois grupos genéticos a fim de otimizar a discriminação de genótipos de milho com relação à resistência a *C. zeae-maydis*.

Palavras-chave: Cercosporiose; Milho; Interação diferencial; Variabilidade genética; Resistência a doenças

ABSTRACT

Aggressiveness of *Cercospora zae-maydis* isolates in maize genotypes

Maize (*Zea mays* L.) is of great social, cultural and economical importance in Brazil and in the world. Maize diseases are the main factors that reduce crop yield. Gray leaf spot, caused by the fungus *Cercospora zae-maydis* Tehon & Daniels, is one of the most important diseases in many countries. Given that the disease can be controlled by the use of resistant maize hybrids, the characterization and discrimination of maize genotypes according to their level of resistance and of pathogen isolates according to their aggressiveness are fundamental steps in any breeding program. Isolates of *C. zae-maydis* can be classified into two genetic groups, named I and II, by analysis with AFLP markers and restriction of the intergenic spacer region of the 5.8S rDNA. In Brazil, both groups occur whereas in the United States isolates from group I prevail and in some South African countries only isolates from group II can be found. Presently, there are no systematic reports on differences in aggressiveness between these groups. Therefore, the objective of this study was to evaluate the aggressiveness of 20 isolates of *C. zae-maydis* from both genetic groups when inoculated in a susceptible maize hybrid and also to test the reaction of 10 maize inbreds to eight *C. zae-maydis* isolates in two environments in order to assess the possible occurrence of differential interaction between isolates, inbreds, and locations. Isolates were cultivated in sorghum seeds for inoculum production. Colonized seeds were placed into the whorl of the plants and the disease reaction was evaluated using a diagrammatic scale. In the greenhouse experiment significant variation in aggressiveness was observed among isolates of group I, group II and between groups. Also, it was observed that isolates from group II were, on average, more aggressive than isolates from group I. This is the first report on differences in aggressiveness between the two genetic groups of *C. zae-maydis*. In the field experiment no significant differences were observed in aggressiveness among isolates evaluated in Jardinópolis (SP) and Indianópolis (MG) for the inbreds tested. However, a strong interaction between reactions of maize inbreds and regions was observed indicating that the environment influences the disease. Thus, evaluations in several locations with aggressive isolates from both groups is recommended in order to optimize the discrimination of maize genotypes regarding their resistance to *C. zae-maydis*.

Key-words: Gray leaf spot; Maize; Differential interaction; Genetic variability; Disease resistance

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) apresenta grande importância cultural, social e econômica, tanto no Brasil como no mundo. O consumo mundial desse cereal passou de 194 milhões de toneladas em 1961, para um valor estimado de 680 milhões de toneladas em 2005 (FAO, 2005; USDA, 2005). Naquele ano, a produção mundial foi de 199 milhões de toneladas e estima-se que para 2005 seja de 675 milhões de toneladas, o que coloca o país na terceira posição mundial entre os maiores produtores do cereal, atrás dos EUA e da China. Entretanto, a produtividade do milho no Brasil está muito aquém daquela observada em outros países. Entre os fatores mais importantes que contribuem para esta baixa produtividade estão as adversidades ambientais, principalmente a restrição hídrica, e as doenças, como ferrugens, helmintosporiose, antracnose e cercosporiose.

A mancha de cercospora ou cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora zeae-maydis*, é uma das principais doenças da cultura do milho em vários países. As perdas causadas pela doença podem variar de 25 a 65%, segundo observações realizadas nos Estados Unidos e África do Sul (DONAHUE; STROMBERG; MYERS, 1991; WARD; NOVELL, 1998; WARD et al., 1999). No Brasil, os dados sobre as reduções na produtividade da cultura são incipientes, mas acredita-se que elas sejam iguais às aquelas já relatadas naqueles países. As estratégias de controle da doença baseiam-se na utilização de produtos químicos em campos de produção de sementes (MUNKVOLD et al. 2001; PINTO; ANGELIS; HABE, 2004) e no plantio de híbridos resistentes.

Muitos híbridos com resistência do tipo poligênica estão disponíveis comercialmente. Entretanto, existem relatos de melhoristas e produtores de que em algumas regiões híbridos resistentes mostram-se suscetíveis. Essa observação sugere a existência de interação entre genótipo e ambiente que pode ser resultado da baixa estabilidade dos híbridos frente às diferentes condições ambientais de cada local ou ainda da ocorrência de diferentes raças fisiológicas do patógeno nestes locais, ou de ambos os fatores.

No melhoramento genético visando à resistência a doenças, a caracterização e discriminação dos genótipos quanto ao nível de resistência é uma etapa fundamental nos programas de melhoramento (FEHR, 1993). Para tanto, existe a necessidade de caracterização da

variabilidade patogênica e genética das populações dos fitopatógenos para identificar os isolados mais agressivos que poderão ser utilizados para otimizar a discriminação dos genótipos.

Alguns trabalhos já foram desenvolvidos com o objetivo de caracterizar a diversidade genética de *C. zea-maydis*. Através da análise de polimorfismos da região espaçadora e codificadora do gene ribossomal 5.8S e de marcadores moleculares AFLP e RFLP de vários isolados, foi possível a distinção de *C. zea-maydis* em dois grupos genéticos, denominados de I e II (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998). Dunkle e Carson (1998) sugeriram que a variabilidade genética do patógeno possivelmente tenha influência no desenvolvimento da doença e que este é um fator que carece de maiores investigações. Além da presença de diversidade genética em *C. zea-maydis*, Bair e Ayers (1986); Dunkle e Carson (1998); Carson; Goodman e Williamson (2002) e Brunelli (2004) também relataram variabilidade quanto à agressividade deste patógeno em cultivares de milho. No entanto, até o momento não existe relato de que variações em agressividade estejam relacionadas aos grupos genéticos, bem como não há relatos da ocorrência de raças fisiológicas. Esta informação é importante, visto que a existência de variabilidade em agressividade entre isolados determina a necessidade de seleção de isolados mais agressivos para avaliação de genótipos resistentes em programas de melhoramento (CARLISLE et al., 2002).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a agressividade de 20 isolados de *C. zea-maydis* pertencentes aos grupos genéticos I e II quando inoculados em um híbrido de milho suscetível e verificar se as diferenças em agressividade estão relacionadas aos grupos genéticos. Também objetivou testar o comportamento de 10 linhagens de milho, sabidamente discrepantes quanto à resistência à doença, frente a oito isolados de *C. zea-maydis* em dois ambientes, para averiguar a presença de interação diferencial nesse patossistema.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 A cultura do milho (*Zea mays* L.)

O milho é um dos cereais que possui maior capacidade de produção. Devido ao fato de ser uma planta C4, é mais eficiente na produção de matéria seca por área e conseqüentemente na produção de grãos. Por essa e outras características, está entre as mais importantes culturas utilizadas na alimentação animal e é indispensável na prática de rotação de culturas no plantio direto, fornecendo uma maior quantidade de palha e matéria orgânica para o sistema (PEIXOTO, 2005). Além dessas e muitas outras aplicações, o milho é utilizado na confecção de peças artesanais, contribuindo para aumentar a fonte de renda de pequenos produtores.

A produção mundial de milho atingiu 720 milhões de toneladas de grãos em 2004 (FAO, 2005). A evolução da produção dos principais países produtores, como Estados Unidos, China, Brasil, México e Argentina, pode ser observada na Figura 1. Esses países contribuem com aproximadamente 70% da produção mundial, dos quais 40% somente pelos Estados Unidos. O Brasil é o terceiro maior produtor e contribui com 6% na produção mundial, sendo a maior parte da produção consumida no país (CONAB, 2006).

Figura 1 - Evolução da produção de milho dos principais países produtores nos últimos 10 anos

No Brasil, foram plantados aproximadamente 12 milhões de hectares e foram colhidas cerca de 47 milhões de toneladas na safra de 2004/2005, com uma produtividade média de cerca de 3.700 kg/ha. Este rendimento é considerado baixo quando comparado aos principais produtores, como Estados Unidos e China, com média de 10.000 e 5.000 kg/ha, respectivamente.

O rendimento do milho pode ser influenciado por fatores como fertilidade do solo, disponibilidade hídrica, sistema de cultivo, potencial produtivo do híbrido e manejo de plantas daninhas, pragas e doenças (FANCELLI; DOURADO-NETO, 2003). Entre as principais doenças no Brasil, destacam-se a helmintosporiose, antracnose, ferrugens e cercosporiose (PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005).

2.1.2 *Cercospora zae-maydis* e a cercosporiose do milho

A mancha de cercospora ou cercosporiose é causada pelo fungo mitospórico *Cercospora zae-maydis* Tehon & Daniels, que produz conídios hialinos em conidióforos do tipo esporodóquio. As dimensões tanto dos conídios como dos conidióforos variam consideravelmente dependendo das condições ambientais, como luminosidade e substrato (LATTERELL; ROSSI, 1983). Os conídios germinam em aproximadamente três horas, sob umidade relativa do ar em torno de 100% e temperatura por volta dos 30°C (PAUL; MUNKVOLD, 2005).

Esta doença foi descrita pela primeira vez por Tehon e Daniels (1925) ocorrendo no sul de Illinois, nos EUA. Desde então, foi observada em vários países como Colômbia, Peru, Brasil, Estados Unidos, México, Venezuela, Moçambique, Zâmbia, Uganda, Camarões e África do Sul (CHUPP, 1953; WARD et al., 1999; DUNKLE; LEVY, 2000). Os maiores danos causados por *C. zae-maydis* foram observados nos Estados Unidos, em alguns países da África do Sul e no Brasil (WARD et al., 1999; FANTIN et al., 2001; CASELA; FERREIRA, 2003).

No Brasil, foi constatada pela primeira vez por Viégas e Krug, em 1934, em Campinas, São Paulo (VIÉGAS, 1945). Somente a partir de 1998, severas epidemias passaram a ocorrer nas principais regiões produtoras, preocupando produtores e melhoristas. A doença causou perdas severas nas principais áreas produtoras na safra de 2000 e 2001. Até então considerada secundária, a doença passou a fazer parte das enfermidades mais importantes da cultura (FANTIN et al., 2001; CASELA; FERREIRA, 2003; PEREIRA; CARVALHO; CAMARGO, 2005).

C. zae-maydis pode causar lesões alongadas que acompanham o sentido das nervuras e também lesões irregulares e sem formato definido. Essas manchas são geralmente de coloração cinza, podendo apresentar bordas amareladas em cultivares resistentes. Em estádios mais avançados da doença ocorre a coalescência das lesões, destruindo grande proporção do tecido foliar. Infecções severas causam a seca e a morte das folhas (CHUPP; SHERF, 1960), diminuindo a área fotossintética e conseqüentemente a produção. Esta espécie de cercospora ataca somente o milho (WARD et al., 1999) e possui baixa capacidade competitiva com outros microrganismos, sendo sua sobrevivência garantida pela colonização do hospedeiro vivo ou dos restos de cultura presentes na superfície do solo (LATTERELL; ROSSI, 1983). Sua disseminação

é feita principalmente através dos esporos que são transportados pelo vento ou pela chuva (LATERELL; ROSSI, 1983; RINGER; GRYBAUSKAS, 1995; WARD et al., 1999).

O aumento na ocorrência e severidade da doença pode estar relacionado a vários fatores, como mudanças no ambiente de cultivo, ocasionadas pela alta umidade relativa do ar proporcionada pela utilização de irrigação com pivô central e pela adoção do plantio direto. Neste sistema de plantio, restos culturais são mantidos no solo entre plantios consecutivos, servindo como substrato para a multiplicação do patógeno. Entretanto, nos municípios de Chapecó (SC) e Ponta Grossa (PR), onde os cultivos não são irrigados e a prática do plantio direto é realizada desde o início da década de 80, a doença só passou a ter real importância após 1998. A mesma situação se verifica nos plantios que utilizam pivô como sistema de irrigação. Áreas situadas nos municípios de Rio Verde (GO), por exemplo, adotaram esse sistema no final da década de 80, ao passo que a doença só atingiu proporção epidêmica no final da década passada (FANTIN et al., 2001). Assim, especula-se que o aumento na incidência de *C. zeae-maydis* nessas regiões seja devido à migração do patógeno para essas áreas e, ainda, que a ocorrência de alterações genéticas na população do patógeno levou à mudanças no comportamento patogênico do fungo, resultando em aumento na severidade da doença.

2.1.3 Avaliação da cercosporiose do milho

O parâmetro severidade é o mais apropriado para quantificar doenças foliares como ferrugens, oídios, míldios e manchas. Entende-se por severidade a porcentagem da área ou do volume de tecido da planta coberta por sintomas. Outra variável que quantifica o grau de manifestação da doença é a incidência, que é a porcentagem de plantas doentes em uma amostra ou população (AMORIM, 1995).

A avaliação da severidade da doença reflete o grau de suscetibilidade do hospedeiro e o de agressividade do patógeno. Pode ser realizada através da utilização de chaves descritivas, de escalas diagramáticas e de análises de imagens com auxílio de programas computacionais específicos. Em avaliação de doenças foliares há predomínio de escalas diagramáticas, que são representações ilustradas de uma série de plantas ou partes de plantas com sintomas em diferentes níveis de severidade. Estas escalas são utilizadas como principal ferramenta de avaliação da

severidade para muitas doenças (AMORIM, 1995), principalmente na seleção de materiais resistentes em programas de melhoramento.

No Brasil, as escalas diagramáticas mais utilizadas para a avaliação da mancha de cercospora foram adaptadas da escala utilizada para a avaliação de *Puccinia polysora*, que foi desenvolvida pela empresa Agrocere (AGROCERES, 1996). Para essa escala são atribuídas notas que vão de um a nove. A nota um é atribuída quando se observam sintomas por toda a planta e o material é considerado altamente suscetível. Na nota nove, onde ocorre pouquíssima ou nenhuma lesão, o material é classificado como altamente resistente. A variação interna da escala considera a porcentagem da planta que apresenta sintomas, sendo estes sintomas originários da infecção natural do patógeno. Entretanto, para experimentos desenvolvidos em casa de vegetação, escalas diagramáticas têm sido desenvolvidas para as condições encontradas nesse tipo de ambiente e para a inoculação artificial do patógeno, como a escala desenvolvida por Brunelli (2004).

2.1.4 Diversidade de *Cercospora zae-maydis*

A identificação das espécies e a taxonomia no gênero *Cercospora* são baseadas nos critérios de morfologia dos conídios e dos conidióforos. Chupp (1953), em sua monografia sobre esse gênero, discorre sobre a confiabilidade de se utilizar as características dos conídios e conidióforos na distinção das espécies. As características do conidióforo são, em geral, menos confiáveis para fins de classificação que as do conídio visto que as primeiras são mais influenciadas pela temperatura e umidade (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998). Desta forma, a caracterização genética para a determinação de possíveis variações entre espécies e também entre isolados se fez necessária e marcadores moleculares são amplamente utilizados para esse fim.

Wang; Levy e Dunkle (1998) utilizaram marcadores AFLP, digestão do rDNA 5.8S e da região ITS com enzimas de restrição e o sequenciamento dessas duas regiões para caracterizar isolados de *C. zae-maydis* coletados em diferentes regiões de cultivo de milho nos Estados Unidos. Os autores analisaram 91 isolados com marcadores AFLP e observaram a existência de dois grupos genéticos distintos, denominados I e II. A distância genética entre os grupos foi de aproximadamente 80% e os coeficientes médios de similaridade entre isolados do mesmo grupo

foram de 93 e 94 %, respectivamente. Para efeitos de comparação, os autores utilizaram isolados de *C. sorghi* (patógeno de sorgo) e *C. kikuchii* (patógeno de soja) e observaram que os 79 isolados de *C. zea-maydis* classificados como grupo genético I foram mais similares a *C. sorghi*, com 29,7 % de similaridade, enquanto os 12 isolados classificados como grupo genético II foram mais similares a *C. kikuchii*, com 36,5 % de similaridade genética. Em adição a isto, os autores também relataram polimorfismos na sequência da região ITS e do rDNA 5.8S entre isolados destes grupos através da análise do padrão de restrição gerado pela digestão dessas regiões com a enzima *TaqI*. Os autores consideram que os dois grupos genéticos podem ser considerados como espécies irmãs (do inglês, “sibling species”) conforme as definições de Mayr (1942, 1970). Da mesma forma, Dunkle e Levy (2000) analisaram 30 isolados africanos de *C. zea-maydis* com marcadores AFLP e digestão do rDNA 5.8S e da região ITS com enzimas de restrição e, para comparação, incluíram isolados dos grupos genéticos I e II, oriundos dos EUA. Os autores verificaram que todos os isolados africanos foram classificados como grupo genético II. Brunelli (2004) também utilizou as mesmas técnicas moleculares para caracterizar 64 isolados brasileiros de *C. zea-maydis*, oriundos de diferentes regiões de cultivo, e observou a presença dos mesmos grupos genéticos descritos por Wang; Levy e Dunkle (1998).

Além de diferenças genéticas, observam-se também variações na morfologia e nas características de crescimento em meio de cultura entre isolados de *C. zea-maydis*. Wang; Levy e Dunkle (1998) relataram a existência de variação no crescimento de isolados de *C. zea-maydis*, em que alguns isolados apresentaram um crescimento mais lento enquanto outros cresceram mais rapidamente. Dunkle e Levy (2000) relataram que isolados africanos pertencentes ao grupo genético II apresentaram um crescimento mais lento quando comparados a um isolado do grupo genético I, oriundo dos EUA. Porém, aqueles isolados cresceram na mesma velocidade quando comparados com alguns isolados, também oriundos dos EUA, pertencentes ao grupo genético II, sugerindo que as diferenças não se devem aos locais de coleta, mas possivelmente aos grupos aos quais os isolados pertencem. Além disso, Brunelli (2004) verificou a presença de diferenças significativas no comprimento de conídios entre isolados dos grupos genéticos, sendo que o grupo I apresentou conídios mais longos que o grupo II. No mesmo estudo, Brunelli (2004) verificou também que alguns isolados do grupo genético I produziram microconídios, enquanto que em nenhum isolado do grupo genético II esta característica foi observada. A conidiação microcíclica, definida como a formação de esporos secundários a partir da germinação de um

conídio sem fase vegetativa intermediária segundo Hanlin (1994) e Smith et al. (1981), foi observada pela primeira vez em *C. zea-maydis* por Lapaire e Dunkle (2003) após terem submetido conídios a estresse nutricional. Lapaire e Dunkle (2003) e Brunelli (2004) sugeriram que essa estratégia do fungo em produzir microconídios seja utilizada para aumentar o tempo de sua sobrevivência durante períodos de estresse físico e nutricional que ocorrem em momentos que antecedem a germinação. Ainda, Lapaire e Dunkle (2003) relataram intensa produção de microconídios quando inocularam esporos em tricomas de soja. A partir disso, Brunelli (2004) especulou que através da rotação de culturas, que é muito utilizada no Brasil, a soja e também as plantas invasoras são uma alternativa de permanência do inóculo na área, mesmo sem a presença de seu hospedeiro.

A fitotoxina cercosporina é uma das poucas toxinas fúngicas bem caracterizadas e é produzida por várias espécies do gênero *Cercospora*. Shim e Dunkle (2002) identificaram oito genes em *C. zea-maydis* relacionados ao metabolismo de ácidos graxos e ao metabolismo secundário e que possivelmente estejam envolvidos na síntese de cercosporina. Em um estudo em *Cercospora nicotianae*, Ehrenshaft et al. (1999) caracterizaram a funcionalidade do gene *SOR 1* e observaram que este gene é altamente requerido para a proteção do fungo contra a própria toxina, demonstrando ainda que o produto deste gene está envolvido na degradação da cercosporina. Carson; Goodman e Williamson (2002) observaram que alguns isolados de *C. zea-maydis* produziram a fitotoxina enquanto outros isolados não produziram ou a produziram em pequena quantidade, quando cultivados em meio BDA. Brunelli (2004), corroborando os dados obtidos por Carson; Goodman e Williamson (2002), também verificou que alguns isolados brasileiros produziram a fitotoxina e outros não. Entretanto, esta autora observou que 26 dos 41 isolados pertencentes ao grupo genético I produziram uma quantidade considerável da fitotoxina, enquanto nenhum dos 28 isolados do grupo genético II a produziu. No entanto, os mecanismos de biossíntese e as rotas de ação desta toxina na planta durante o estabelecimento da doença são pouco conhecidos (DAUB; EHRENSHAFT, 2000).

Alguns poucos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de verificar variações na agressividade entre isolados de *C. zea-maydis*. Bair e Ayers (1986) avaliaram 15 isolados e quatro híbridos de milho suscetíveis, em casa de vegetação e em campo, utilizando as variáveis comprimento de lesão e severidade da doença, referida como o número de lesões ocasionadas por uma quantidade conhecida de inóculo. Os autores verificaram que houve variação significativa no

comprimento das lesões e na severidade da doença entre isolados, o que os levou a sugerir que há diferenças em agressividade entre os isolados de *C. zeae-maydis* e que seja utilizado mais de um isolado na seleção de genótipos resistentes. Dunkle e Carson (1998) avaliaram a agressividade de quatro isolados do grupo genético I e três isolados do grupo genético II em quatro híbridos, sob condições de campo, com o objetivo de determinar se a interação genótipo e ambiente é influenciada pela diferença em agressividade dos isolados. Os autores observaram uma variação significativa em agressividade dentro de cada grupo genético, mas não entre os grupos e verificaram também uma pequena, mas significativa interação entre isolado e híbrido. Os autores sugeriram que a maior parte da interação entre híbrido e ambiente seja resultado do desenvolvimento inadequado da doença devido a condições não favoráveis para o seu desenvolvimento. Observaram ainda que os isolados mais agressivos foram mais eficientes em detectar diferenças significativas entre os híbridos do que os isolados menos agressivos. Essa variação em agressividade também foi observada por Carson; Goodman e Williamson (2002) ao analisarem 10 híbridos e seis isolados de *C. zeae-maydis* em experimento sob condições de campo. Dessa forma, os autores sugerem a utilização de isolados mais agressivos para maximizar a discriminação dos genótipos de milho quanto à resistência a cercosporiose.

Até o presente, no entanto, nenhum estudo sistemático foi realizado para verificar se há diferenças em agressividade entre isolados dos grupos genéticos I e II. O desenvolvimento de estudos de agressividade e a associação destes com os grupos genéticos fornecem informações que podem contribuir na investigação da biologia do patógeno e revelar a importância da seleção dos isolados para uma avaliação mais eficiente da resistência de genótipos em programas de melhoramento (CARLISLE et al., 2002).

2.1.5 Distribuição geográfica dos grupos genéticos de *Cercospora zeae-maydis*

C. zeae-maydis ocorre em muitos países (CHUPP, 1953; WANG; LEVY; DUNKLE, 1998; WARD et al., 1999; DUNKLE; LEVY, 2000). Wang; Levy e Dunkle (1998) coletaram e analisaram 91 isolados americanos de *C. zeae-maydis* e verificaram que o patógeno tem uma ampla distribuição nos Estados Unidos. Entretanto, a ocorrência do grupo genético I prevalece sobre o grupo genético II, sendo que este grupo está restrito às regiões de cultivo do Leste do

país, enquanto aquele tem sido observado em praticamente todas as regiões. Os autores observaram ainda que o patógeno continua sendo disseminado para locais onde a doença não havia sido verificada anteriormente. Já Dunkle e Levy (2000), ao analisarem 30 isolados africanos de *C. zeae-maydis* observaram que todos pertenciam ao grupo genético II e, assim, sugeriram que seja provável que na África ocorra somente isolados deste grupo. Essa informação levou os autores a especular que o local do surgimento do grupo genético II seja a África e que a migração ocorreu desse continente para os Estados Unidos. Wang; Levy e Dunkle (1998) especulam que o local do surgimento do grupo genético I seja nos Estados Unidos e que, devido à grande distância genética entre os grupos, um dos grupos não seja o ancestral imediato do outro. Brunelli (2004) verificou a presença dos dois grupos genéticos de *C. zeae-maydis* em todos os locais de coleta da região centro-sul do Brasil, o que levou a autora a especular que a origem do grupo genético II possa ser o Brasil e que os isolados desse grupo podem ter sido levados do Brasil para a África, e lá ter encontrado condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Portanto, há um consenso entre os pesquisadores (WANG; LEVY; DUNKLE, 1998; DUNKLE; LEVY, 2000; BRUNELLI, 2004) de que a origem do grupo genético I tenha sido no continente Americano, mas a origem do grupo genético II permanece sob especulação.

2.1.6 Melhoramento genético visando resistência a *Cercospora zeae-maydis*

A resistência a doenças constitui um dos principais objetivos dos programas de melhoramento vegetal. Os sucessos obtidos nesta área têm sido de grande importância para a estabilização do rendimento das culturas em cada safra (BORÉM, 2001) e para a diminuição do uso de defensivos agrícolas.

A resistência a doenças, do ponto de vista genético, pode ser classificada em monogênica ou poligênica e, do ponto de vista epidemiológico, em vertical ou horizontal. A classificação genética está relacionada ao número de genes que estão envolvidos na resistência. A resistência monogênica é verificada quando um único gene confere a resistência e a poligênica quando vários genes estão envolvidos (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995). De acordo com Falconer (1989), se o efeito de um gene pode ser isolado de outras fontes de variação, considera-se resistência monogênica. Na literatura, é comum o emprego do termo gene de efeito principal

(do inglês, “major gene”) em referência a este fenômeno. Contudo, existem genes cujo efeito não é grande o suficiente para que possa ser isolado de outras fontes de variação e, então, não podem ser estudados individualmente, sendo referidos na literatura como genes de efeito secundário (do inglês, “minor gene”). Assim, quando a resistência for devida à presença de um conjunto de genes de efeito secundário é dita poligênica. A resistência monogênica também pode ser dita qualitativa, devido à diferença entre plantas suscetíveis e resistentes ser de fácil visualização, inexistindo reações intermediárias na ausência de outras fontes de variação que não a genética, o que gera uma distribuição fenotípica descontínua. Já a resistência poligênica pode ser dita quantitativa devido à presença de uma variação contínua de graus de resistência, indo desde de extrema suscetibilidade até extrema resistência, fazendo-se necessário quantificar a doença para que seja possível distinguir genótipos resistentes de suscetíveis. O conhecimento do número de genes que estão envolvidos na resistência é extremamente importante na decisão das estratégias que serão adotadas nos programas de melhoramento. Por exemplo, em doenças com herança monogênica, o método mais utilizado é o retrocruzamento (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995; YORINORI; KIIHL, 2001).

A classificação epidemiológica da resistência, proposta por Vanderplank em 1963, baseia-se na presença ou ausência de interação diferencial entre genótipos do patógeno e do hospedeiro e propõe os termos resistência vertical ou horizontal (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995; VANDERPLANK, 1968). A interação diferencial é observada quando genótipos do hospedeiro se comportam de maneira diferenciada quando inoculados com isolados do patógeno. Por exemplo, o isolado A é mais virulento no genótipo A do que no genótipo B do hospedeiro, ao passo que o isolado B é mais virulento no genótipo B do que no genótipo A do hospedeiro. Quando há presença de interação diferencial, como neste caso, dizemos que há especialização do patógeno em relação ao hospedeiro e, neste caso, os isolados podem ser considerados como raças e a resistência é dita vertical. Quando não ocorre interação diferencial, dizemos que os isolados diferem em agressividade e a resistência é dita horizontal. Segundo Kulkarni e Chopra (1982), a detecção da interação diferencial é extremamente importante para determinar a natureza da resistência do hospedeiro. Kulkarni e Chopra (1982) sugerem ainda que a verdadeira interação diferencial implica que a variação genética no hospedeiro e no patógeno estejam correlacionadas e, assim, a durabilidade da resistência do hospedeiro é função da presença ou ausência de uma correlação entre a variação na resistência e na virulência.

Segundo Camargo e Bergamin Filho (1995), a classificação epidemiológica da resistência permite prever as conseqüências dos tipos de resistência no progresso da doença, fornecendo subsídios aos melhoristas e fitopatologistas nas escolhas das fontes de resistência que serão usadas nos programas de melhoramento. Por exemplo, a resistência vertical é efetiva apenas contra algumas raças do patógeno e, assim, age no sentido de reduzir a quantidade efetiva de inóculo inicial, fazendo com que o início da epidemia seja atrasado. Ao contrário da resistência vertical, que geralmente manifesta-se conferindo imunidade ou hipersensibilidade contra determinadas raças do patógeno (efeito qualitativo), a resistência horizontal, apesar de ser efetiva contra todas as raças, diminui o tamanho das lesões produzidas pelo patógeno, aumenta seu período latente e, ainda, diminui o número de esporos produzidos por lesão. Dessa forma, os efeitos da resistência horizontal são parciais e quantitativos, fazendo com que em cultivares com esse tipo de resistência a eficiência da infecção seja menor do que em uma cultivar suscetível, o desenvolvimento das lesões sejam mais lentos, e a produção de esporos seja mais tardia e em menor quantidade. Assim, somando-se todos esses efeitos, observar-se-á uma redução na taxa de desenvolvimento da doença.

Estudos de herança da resistência a *C. zea-maydis* indicaram presença de resistência poligênica (THOMPSON et al., 1987; BUBECK et al., 1993; COATES; WHITE, 1994; SAGHAI MARROF et al., 1996; LEHMENSIEK et al., 2001). Em adição a isso, um gene conferindo herança qualitativa foi descrito em material cultivado na África do Sul (GEVERS; LAKE; HOHLS, 1994). Efeitos aditivos parecem ser os mais comuns entre os diferentes genes associados à resistência (HUFF; AYERS; HILL, 1988; ELWINGER et al., 1990; DONAHUE; STROMBERG; MYERS, 1991). Segundo Wisser; Balint-Kurti e Nelson (2006), em milho a maior parte da resistência a doenças introduzida nos materiais elites é quantitativa.

Grande parte dos estudos envolvendo este patossistema foi realizada em campo e com incidência natural do patógeno. Isso ocorreu devido, em grande parte, à dificuldade de cultivo e esporulação deste fungo em meio de cultura. Entretanto, recentes trabalhos de cultivo *in vitro* de *C. zea-maydis* contribuíram para contornar essa dificuldade ao estabelecer o meio de cultura e determinar as condições de temperatura e umidade ideais para o seu crescimento e esporulação (RUPE; SIEGEL; HARTMAN, 1982; THORSON; MARTINSON, 1993; BHATIA; MUNKVOLD, 2002; BRUNELLI et al, 2006; PAUL; MUNKVOLD, 2005; ASEA et al., 2005).

Beckman e Payne (1983) ressaltaram a importância do controle da temperatura dentro da casa de vegetação, que deve ser mantida entre 22 e 28°C, e da manutenção da umidade relativa em, aproximadamente, 100%, com auxílio de nebulizações noturnas durante os cinco primeiros dias após a inoculação. Nestas condições, estes autores conseguiram produzir lesões idênticas às aquelas observadas em campo. Estudos em ambientes controlados são úteis quando se deseja fazer medidas precisas de doenças, como no caso de estudos epidemiológicos ou em trabalhos de variabilidade patogênica. A manipulação do ambiente permite reproduzir as condições ambientais ideais para o pleno desenvolvimento da doença, além de possibilitar o controle mais eficiente de outras doenças e/ou insetos que venham a interferir nas avaliações.

Através de um estudo com o objetivo de identificar a interação entre os elementos que determinam a presença da doença, ambiente – patógeno – hospedeiro, nas epidemias de *C. zeae-maydis* no Leste da África, Okori et al. (2004) observaram que as diferenças na severidade da cercosporiose, observadas em campo, podem ser atribuídas à variação em agressividade dos isolados, à suscetibilidade dos genótipos utilizados e a uma nutrição mineral deficiente. Também observaram que a severidade da doença é maior em alguns locais do que em outros e sugeriram que isto provavelmente seja resultado da interação dos fatores citados anteriormente.

No Brasil, não existem trabalhos voltados para a determinação de diferenças de agressividade e relações diferenciais entre isolados coletados em diferentes regiões produtoras de milho. No entanto, há indicativos de variação no comportamento de híbridos comerciais quanto à resistência, apresentando-se como resistente num local e moderadamente resistente e, às vezes, suscetível em outro, o que pressupõe a presença de interação diferencial entre os híbridos e o ambiente, ou entre os híbridos e isolados do patógeno.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Isolados de *Cercospora zeae-maydis*

Os isolados de *C. zeae-maydis* utilizados neste estudo fazem parte de uma coleção de 67 isolados coletados em diferentes regiões brasileiras de plantio experimental e comercial de milho e que foram previamente caracterizados como pertencentes ao grupo genético I ou II por Brunelli (2004). Dos 67 isolados, foram selecionados 20 que apresentaram maior divergência genética segundo Brunelli (2004) (Tabela 1; Figura 2). Os isolados estavam armazenados em água deionizada estéril a 4°C no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola.

Tabela 1 – Denominação, grupo genético e local de origem dos 20 isolados de *C. zea-maydis*

Isolado	Grupo Genético	Local de Origem
CD 3.1	I	Cachoeira Dourada – MG
GUA 5	I	Guaíra – SP
I 7.1	I	Indianópolis – MG
JA 3.1	I	Jardinópolis – SP
LEM	I	Luis Eduardo Magalhães - BA
PIRA 4	I	Piracicaba – SP
PIRA 7.1	I	Piracicaba – SP
U 1.2	I	Unaí – MG
U 2.3	I	Unaí – MG
CASTRO	II	Castro – PR
CRIS A	II	Cristalina – GO
I 10	II	Indianópolis – MG
I 9.2	II	Indianópolis – MG
IRAI 4.1	II	Iraí de Minas – MG
MIG 1.1	II	Miguelópolis – SP
MIG F	II	Miguelópolis – SP
PER	II	Perolândia – GO
UBER 2	II	Uberlândia – MG
UBER 3	II	Uberlândia – MG
UBER 9	II	Uberlândia – MG

Figura 2 – Distribuição dos isolados de *C. zeae-maydis* de acordo com a região de coleta e grupo genético. Os isolados do grupo genético I estão indicados por nomes e quadrados brancos e os isolados do grupo genético II por nomes em negrito e triângulos pretos. Isolados coletados num mesmo local estão separados por barras

Para o crescimento, os isolados foram transferidos para meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA - 200 g/L de batata, 20 g/L de dextrose, 14 g/L de ágar) em placas de Petri Pyrex[®], no qual permaneceram por aproximadamente sete dias sob temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12h em luz ambiente e 12h no escuro. Em seguida, para a indução da esporulação, os isolados foram repicados para meio de cultura Suco de Tomate Temperado (STT - 200 mL de suco de tomate temperado - Superbom[®], 3 g de CaCO_3 , 14 g de ágar e 800 mL de água destilada) em placas de Petri Pyrex[®], permanecendo sob temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12h em luz ambiente e 12h no escuro, durante aproximadamente 15 dias.

2.2.2 Agressividade de isolados de *C. zea-maydis* sob condições de casa de vegetação

Neste estudo foram utilizados os 20 isolados listados na Tabela 1. O inóculo foi preparado transferindo-se cinco discos do meio de cultura STT colonizados pelo fungo e contendo esporulação visível para erlenmeyers de 125 mL contendo 20 g de sementes de sorgo previamente umedecidas com 16 mL de água e esterilizadas duas vezes por meio de autoclavagem durante 20 min a 1 atm. As culturas foram mantidas a 25 °C em fotoperíodo de 12h em luz ambiente e 12h no escuro durante 15 dias para a colonização e esporulação do patógeno nas sementes de sorgo.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no campo experimental do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP. O delineamento experimental utilizado foi composto por quatro blocos inteiramente casualizados, sendo cada parcela formada por um vaso (30 cm de diâmetro x 20 cm de altura) contendo três plantas do híbrido suscetível DAS-8392 (Dow AgroSciences). Os experimentos foram conduzidos em duas épocas distintas, sendo o primeiro de setembro a outubro de 2004 e o segundo, de março a abril de 2005.

As plantas foram inoculadas no período correspondente ao estágio vegetativo V3, com três a quatro folhas desenvolvidas (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993), por meio do depósito de 10 sementes de sorgo colonizadas pelo patógeno no cartucho de cada planta (Figura 3). Nos primeiros quatro dias após a inoculação, os vasos foram mantidos sob câmara úmida por 16 horas diárias. O experimento foi conduzido sob alta umidade ($\pm 95\%$) através de irrigações diárias e manutenção da umidade na superfície do solo na casa de vegetação.

Figura 3 – Experimento em casa de vegetação para avaliar a agressividade de isolados de *C. zeae-maydis*. A) Híbrido de milho suscetível DAS-8392; B) Detalhe da câmara úmida para cada vaso; C) Inóculo depositado no cartucho; D) Esporulação do patógeno nos grãos de sorgo

Os sintomas foram avaliados 30 dias após a inoculação, quando as lesões já eram facilmente visualizadas. Para tanto, foi utilizada uma escala diagramática de quatro notas baseadas no número de lesões por folha e desenvolvida para experimentos em casa de vegetação por Brunelli (2004). Segundo esta escala (Figura 4), a nota 1 corresponde a folhas sem sintoma, 2 a folhas com menos de 10 pontuações cloróticas, 3 a folhas com mais de 10 lesões cloróticas e estriadas, algumas com pontos de esporulação e a nota 4 a folhas com mais de 20 lesões cloróticas e estriadas, algumas com esporulação. Foram avaliadas duas folhas por planta. A nota média de cada parcela transformada através da função $\sqrt{(Y+1)}$ foi utilizada para a análise de variância e teste de comparação múltipla de médias (Tukey) com o auxílio do programa estatístico SAS (versão 8.1 – SAS Institute, Cary, NC; SHESKIN, 2004).

Figura 4 – Escala diagramática de notas utilizada para a avaliação da agressividade dos isolados de *C. zeae-maydis*. A nota 1 corresponde a folhas sem sintoma, 2 a folhas com menos de 10 pontuações cloróticas, 3 a folhas com mais de 10 lesões cloróticas e estriadas, algumas com pontos de esporulação e a nota 4 a folhas com mais de 20 lesões cloróticas e estriadas, algumas esporulantes [Modificada de Brunelli (2004)]

2.2.3 Agressividade de isolados de *C. zeae-maydis* sob condições de campo

Os experimentos foram conduzidos nos campos experimentais da empresa Dow AgroSciences Ltda em Jardinópolis (SP), no período de 10 de março a 10 de junho de 2005, e em Indianópolis (MG), no período de 12 de março a quatro de julho de 2005. A área experimental de Jardinópolis está localizada a 20°54'58'' de latitude Sul, 47°53'42'' de longitude Oeste e 560 m de altitude, e a de Indianópolis está a 18°55'31'' de latitude Sul, 47°51'12'' de longitude Oeste e 975 m de altitude.

Neste estudo foram analisados oito isolados de *C. zeae-maydis*, sendo quatro do grupo genético I e quatro do grupo genético II (Tabela 2), que haviam sido utilizados em estudos anteriores desenvolvidos por Brunelli (2004).

Tabela 2 – Isolados de *C. zea-maydis* utilizados no estudo de agressividade de isolados em campo e o grupo genético a que pertencem

Grupo Genético I	Grupo Genético II
GUA 5	CRIS A
I 7.1	I 10
JA 3.1	UBER 3
U 2.3	MIG 1.1

Foram utilizadas 10 linhagens de milho que fazem parte dos programas de melhoramento da Universidade Federal de Lavras (UFLA), da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e da Empresa Dow Agrosiences Ltda (Tabela 3).

Tabela 3 – Denominação, base genética e nível de resistência das linhagens utilizadas no estudo de agressividade de isolados em campo

Linhagem	Base Genética	Resistência *	Linhagem	Base Genética	Resistência *
GNS-66	Temperado	MS	ESALQ-38	Tropical	MS
GNS-69	Tropical	S	ESALQ-42	Tropical	S
GNS-75	Tropical	MS	DAS-4	Tropical	R
GNS-82	Tropical/subtropical	MS	DAS-5	Tropical	MR
ESALQ-18	Tropical	S	DAS-11	Tropical	MS

* Nível da resistência das linhagens: R - resistente; MR - moderadamente resistente; MS - moderadamente suscetível; S - suscetível.

O delineamento experimental utilizado foi composto por parcelas subdividas com três repetições, sendo a parcela principal composta por um isolado de *C. zea-maydis* e a sub-parcela por uma linhagem de milho plantada em uma linha de 3 m contendo aproximadamente 15 plantas. Um híbrido suscetível foi utilizado para separação das repetições, para isolar a área experimental e também para monitorar a incidência natural da cercosporiose.

Cinco discos de meio de cultura STT colonizados pelo fungo foram transferidos para erlenmeyers de 2 L contendo 500 g de sementes de sorgo, previamente umedecidas com 400 mL

de água e esterilizadas duas vezes em autoclave durante 20 min a 1 atm. As culturas foram mantidas a 25 °C em fotoperíodo de 12h em luz ambiente e 12h no escuro durante 20 dias para a completa colonização e esporulação do patógeno nas sementes de sorgo. Foram adicionadas aproximadamente 10 sementes de sorgo colonizadas pelo patógeno no cartucho de cada planta de milho no estágio vegetativo V3 de desenvolvimento (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993). O experimento foi mantido sob freqüente irrigação nos primeiros quatro dias após a inoculação para garantir condições ideais de umidade durante a germinação dos esporos e penetração do fungo na planta (BECKMAN; PAYNE, 1983). O acompanhamento diário foi feito através de caminhadas dentro do experimento para verificação do possível surgimento natural desta e de outras doenças e também dos primeiros sintomas da doença com vistas à determinação do momento ideal da avaliação.

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, quando as lesões já podiam ser facilmente visualizadas. Para a avaliação, utilizou-se uma escala diagramática de notas desenvolvida para o experimento, e foram observados os sintomas das folhas inoculadas em todas as plantas contidas na linha. A nota média de cada sub-parcela transformada através da função $\sqrt{(Y + 1)}$ foi usada para análise de variância e teste de comparação múltipla de médias (Tukey) em 5% de probabilidade com o auxílio do programa estatístico SAS (versão 8.1 – SAS Institute, Cary, NC; SHESKIN, 2004).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Agressividade de isolados de *C. zea-maydis* sob condições de casa de vegetação

Os primeiros sintomas característicos de cercosporiose foram observados na terceira semana após a inoculação. Não foram observados sintomas de outras doenças foliares que pudessem dificultar a avaliação. As temperaturas médias observadas no primeiro e segundo experimento foram de 27 °C e 29 °C, respectivamente.

Tanto no primeiro como no segundo experimento, a análise de variância detectou diferenças entre isolados dentro dos grupos genéticos I e II bem como entre os grupos (Tabela 4). Os coeficientes de variação (CV) foram de 5,78 e 5,38 %, respectivamente (Tabela 4). A análise de variância conjunta para os dois experimentos (Tabela 5) indicou não haver diferenças entre experimentos. Entretanto, houve interação significativa entre isolado e experimento.

Tabela 4 – Resumo da análise de variância da severidade média ocasionada pelos isolados de *C. zea-maydis* no híbrido DAS-8392 para o primeiro e segundo experimentos

Fonte de Variação	1º Experimento ¹			2º Experimento ¹	
	GL	QM	P > F ²	QM	P > F ²
Repetição	3	0,0906	-	0,0036	-
Isolado	19	0,0579	<0,001***	0,1499	<0,001***
GI	8	0,0794	<0,001***	0,0623	<0,001***
GII	10	0,0397	<0,001***	0,0611	<0,001***
GI vs. GII	1	0,0687	<0,001***	1,7411	<0,001***
Resíduo	57	0,0125		0,0109	
Total	79				
Média		1,93		1,96	
CV (%)		5,78		5,38	

¹ Valores calculados com médias transformadas para $\sqrt{(Y + 1)}$

² Valores significativos com probabilidade menor que * 0,05, ** 0,01, *** 0,001 e ^{NS} não significativo.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância conjunta da severidade média ocasionada pelos isolados de *C. zeae-maydis* no híbrido DAS-8392

Fonte de Variação	GL	QM ¹	P > F ²
Bloco/Experimento	6	0,0471	-
Isolado (I)	19	0,1444	<0,001***
GI	8	0,1155	<0,001***
GII	10	0,0382	<0,001***
GI vs. GII	1	1,4374	<0,001***
Experimento (E)	1	0,0200	0,193 ^{NS}
I x E	19	0,0558	<0,001***
Resíduo	114	0,0117	
Total	159		
Média ¹	1,94		
CV (%) ¹	6,85		

¹ Valores calculados com médias transformadas para $\sqrt{(Y + 1)}$

² Valores significativos com probabilidade menor que * 0,05, ** 0,01, *** 0,001 e ^{NS} não significativo.

A severidade média dos sintomas ocasionados por isolados do grupo I no primeiro e no segundo experimento foi de 2,42 e 2,19, respectivamente, em contraste a 2,86 e 3,42 para isolados do grupo II. Estatisticamente, estes valores diferem entre si (Anexo A). Observou-se uma variação em severidade dos sintomas também entre isolados dentro de grupos. Porém, a severidade média dos sintomas ocasionados por isolados do grupo II foi significativamente maior que a severidade média dos isolados do grupo I em ambos experimentos. Observou-se ainda uma variação de isolados entre experimentos, com exceção de I 7.1, LEM e U 2.3, (Figura 5). Uma vez que todos os isolados foram inoculados em um mesmo genótipo de milho, as variações em severidade aqui relatadas refletem variações entre isolados com relação à sua agressividade.

Figura 5 – Severidade média de sintomas ocasionados por isolados de *C. zeae maydis* inoculados no híbrido de milho DAS-8392 sob condições de casa de vegetação, no primeiro (barras cinzas) e segundo (barras brancas) experimentos. As barras de erro representam as médias $\pm$ erro-padrão. Presença de asterisco no nome do isolado indica que são pertencentes ao grupo genético I e os demais, são pertencentes ao grupo genético II

2.3.2 Agressividade de isolados de *C. zeae-maydis* sob condições de campo

No momento da inoculação, 30 dias após o plantio, as plantas estavam com quatro a cinco folhas desenvolvidas, o que corresponde ao esperado (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993) e que indica que as condições ambientais foram propícias ao desenvolvimento das plantas em ambos locais, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 – Vista lateral do experimento sob condições de campo em Indianópolis (MG) para avaliação da agressividade de isolados de *C. zea-maydis* em linhagens de milho

Os valores máximos e mínimos de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) registrados durante a condução dos experimentos também foram adequados para o desenvolvimento da doença (Tabela 7).

Tabela 6 – Dados de temperatura e umidade relativa do ar durante a condução dos experimentos para Jardinópolis (SP) e Indianópolis (MG)

	Temperatura (°C)		Umidade relativa do ar (%)	
	Jardinópolis (SP)	Indianópolis (MG)	Jardinópolis (SP)	Indianópolis (MG)
Mínima*	17,4	16,3	51,6	49,9
Máxima*	29,6	28,0	99,5	98,1

* Valores médios para o período de condução dos experimentos.

Sintomas característicos de cercosporiose foram observados 30 dias após a inoculação. Uma escala diagramática para a avaliação da severidade foi desenvolvida com base na amplitude dos sintomas verificada nos dois experimentos. A escala é baseada no tipo de lesão e compreende 5 notas: nota 1 corresponde a folhas sem sintomas, 2 a folhas com lesões cloróticas e ausência de esporulação, 3 a folhas com lesões cloróticas e necróticas, estreitas e curtas e com esporulação, 4 a folhas com lesões necróticas retangulares, com restrição no comprimento e esporulação presente, e 5 a folhas com lesões necróticas retangulares grandes (típicas de alta suscetibilidade à cercosporiose) e com esporulação (Figura 7).

Figura 7 – Escala diagramática de cinco notas baseadas no tipo de lesão e desenvolvida para avaliação da severidade de cercosporiose

A análise de variância individual para os experimentos detectou diferenças significativas em severidade entre linhagens nos dois experimentos, mas não entre isolados. Também não foi detectada interação entre isolados e linhagens (Tabela 7). Os coeficientes de variação (CV) observados no experimento de Jardinópolis (SP) e Indianópolis (MG) foram de 11,67 e 9,80 %, respectivamente.

A análise de variância conjunta também detectou diferenças significativas em severidade entre linhagens e foi detectada interação entre linhagens e locais. No entanto, não houve interação entre isolados e locais (Tabela 8).

Tabela 7 – Resumo da análise de variância da severidade média ocasionada por isolados de *C. zeae-maydis* em linhagens de milho nos experimento de Jardinópolis (SP) e Indianópolis (MG)

Fonte de Variação	Jardinópolis (SP) ¹			Indianópolis (MG) ¹	
	GL	QM	P > F ²	QM	P > F ²
Bloco	2	0,1494	-	0,1230	-
Isolado (I)	7	0,0427	0,4240 ^{NS}	0,0519	0,1516 ^{NS}
Resíduo (a)	14	0,0397		0,0278	
Linhagem (L)	9	2,4834	<0,0001 ***	2,9224	<0,0001 ***
I x L	63	0,0620	0,3751 ^{NS}	0,0266	0,9761 ^{NS}
Resíduo (b)	144	0,0583		0,0415	
Total	239	0,2885		0,3050	
CV (%)		11,67		9,80	

¹ Valores calculados com médias transformadas para $\sqrt{(Y + 1)}$.² Valores significativos com probabilidade menor que * 0,05, ** 0,01, *** 0,001 e ^{NS} não significativo.Tabela 8 – Resumo da análise de variância conjunta da severidade média ocasionada por isolados de *C. zeae-maydis* em linhagens de milho avaliada nos experimentos de Jardinópolis (SP) e Indianópolis (MG)

Fonte de Variação	GL	QM ¹	P > F ²
Local (E)	1	0,0091	0,7774 ^{NS}
Resíduo (a)	4	0,0996	
Isolado (I)	7	0,0506	0,1162 ^{NS}
I x E	7	0,0237	0,5419 ^{NS}
Resíduo (b)	36	0,0273	
Linhagem (L)	9	6,0432	<0,0001 ***
I x L	63	0,0355	0,4109 ^{NS}
L x E	9	0,1794	<0,0001 ***
Resíduo (c)	63	0,0336	
Total	479		
CV (%)	8,94		

¹ Valores calculados com médias transformadas para $\sqrt{(Y + 1)}$.² Valores significativos com probabilidade menor que * 0,05, ** 0,01, *** 0,001 e ^{NS} não significativo.

As severidades médias de cada linhagem frente aos oito isolados de *C. zea-maydis* estão listadas nos Anexos B e C, respectivamente para Jardinópolis (SP) e Indianópolis (SP). As linhagens ESALQ-38 e DAS-11 foram as responsáveis pela significância da interação linhagem x local (Figura 8). Em Jardinópolis (SP), a linhagem ESALQ-38 foi mais suscetível que em Indianópolis (MG), ao passo que a linhagem DAS-11 apresentou comportamento inverso. A linhagem com maior nível de resistência nos dois locais foi a DAS-4.

Figura 8 – Severidade média de sintomas ocasionada pelos isolados de *C. zea maydis* inoculados nas linhagens de milho em Jardinópolis (SP; barras cinzas) e Indianópolis (MG; barras brancas). As barras de erro representam as médias $\pm$ erro-padrão

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Agressividade de isolados de *C. zea-maydis* sob condições de casa de vegetação

Paul e Munkvold (2005) observaram que as condições que favorecem a expressão de sintomas de cercosporiose são temperaturas entre 25 e 30 °C e umidade relativa do ar acima de 95%. Dessa forma, as condições ambientais observadas nos dois experimentos podem ser consideradas adequadas para o desenvolvimento da doença. A manutenção da umidade na superfície do solo na casa de vegetação e a realização da câmara úmida nos primeiros quatro dias após a inoculação contribuíram para a manutenção da umidade, necessária para a sobrevivência dos esporos e conseqüente germinação e penetração na planta, conforme sugerido por Beckman e Payne (1982); Thorson e Martinson (1993) e Asea et al. (2005). Os primeiros sintomas característicos de cercosporiose foram observados após um período que corresponde ao tempo necessário para o aparecimento dos sintomas em campo. Segundo Latterell e Rossi (1983), o período latente, período que vai da inoculação até o aparecimento das estruturas reprodutivas do patógeno, de *C. zea-maydis* é de 14 a 28 dias.

O coeficiente de variação observado nos experimentos pode ser considerado baixo segundo Pimentel-Gomes e Garcia (2002), sugerindo uma boa precisão experimental. Os autores relatam ainda que experimentos em condições bem controladas, como os de laboratório ou casa de vegetação, geralmente fornecem coeficientes de variação bem baixos, até inferiores a 5%.

Alguns trabalhos semelhantes a este foram desenvolvidos por Bair e Ayers (1986); Dunkle e Carson (1998) e Carson; Goodman e Williamson (2002). Os primeiros autores desenvolveram um estudo com 15 isolados e quatro híbridos de milho suscetíveis, em casa de vegetação e em campo. Os autores verificaram variação significativa no comprimento das lesões e na severidade da doença entre isolados, o que os levou a sugerir que há diferenças em agressividade entre os isolados de *C. zea-maydis*. Entretanto, naquela época ainda não se tinha a informação da existência dos grupos genéticos em *C. zea-maydis*, o que não permitiu inferências sobre diferenças em agressividade entre isolados de grupos distintos. Dunkle e Carson (1998) desenvolveram um estudo de agressividade em campo, utilizando quatro híbridos de milho e sete isolados de *C. zea-maydis*, sendo quatro isolados do grupo genético I e três do grupo II. Os

autores observaram uma ampla variação em agressividade dentro dos grupos genéticos, mas não entre os grupos e sugerem que provavelmente esse resultado seja devido ao pequeno número de isolados de cada grupo. Carson; Goodman e Williamson (2002) desenvolveram um estudo de agressividade em campo, utilizando 10 híbridos e seis isolados, sendo apenas um isolado do grupo genético II. Os autores também relataram uma variação em agressividade dos isolados, mas não a relacionaram com os grupos genéticos devido ao uso de um único isolado representante do grupo II. Okori et al. (2004), ao analisarem 27 isolados africanos de *C. zae-maydis*, pertencentes somente ao grupo genético II, relataram a presença de diferenças significativas em agressividade entre os isolados daquele grupo e sugerem que essa variabilidade em agressividade seja um dos fatores que influenciam na alta severidade das epidemias. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que, apesar de alguns isolados do grupo I serem mais agressivos que alguns isolados do grupo II, a agressividade média dos isolados deste último grupo foi maior, a julgar pelos maiores valores médios de severidade. Apesar de já existirem relatos de variação em agressividade entre isolados de *C. zae-maydis*, este é o primeiro relato de variação em agressividade entre os grupos genéticos, com isolados do grupo II sendo, em média, mais agressivos do que os do grupo I.

Dunkle e Carson (1998) relatam que os isolados do grupo II crescem mais devagar e não produzem ou produzem em menor quantidade a fitotoxina cercosporina do que isolados do grupo I. Especula-se que possam existir outras fitotoxinas produzidas pelo grupo II ou ainda que, pelo fato de não produzirem cercosporina, não sejam facilmente reconhecidos pela planta durante a infecção resultando em maior severidade. O agrupamento das informações bioquímicas, patogênicas e epidemiológicas, os quais carecem de um número maior de estudos, é importante para confirmar as especulações de que os grupos genéticos estejam evoluindo para se tornarem espécies diferentes.

Os isolados I 10 e I 9.2 pertencentes ao grupo genético II, e I 7.1 pertencente ao grupo genético I, coletados no mesmo local, Indianópolis, apresentaram diferenças significativas em agressividade, sugerindo que existe heterogeneidade em relação à agressividade entre indivíduos de uma população de *C. zae-maydis* de uma mesma localidade. Esta observação sugere que a agressividade seja uma característica intrínseca do indivíduo e não do local de origem de onde os isolados se originaram. No entanto, os resultados diferem do relatado por Carson; Goodman e Williamson (2002), que analisaram seis isolados oriundos de quatro locais e observaram

variações em agressividade entre isolados coletados de diferentes locais. Esta discrepância, no entanto, pode ser devida ao número reduzido de isolados analisados por estes autores. Assim, a elucidação desta questão reside numa análise pautada em vários isolados de vários locais.

Em estudos para averiguar a agressividade de isolados de *C. zea-maydis*, Carson; Goodman e Williamson (2002) verificaram que os isolados menos agressivos foram menos eficientes em discriminar os níveis de resistências dos híbridos utilizados em seus estudos e, assim, sugeriram que uma abordagem para maximizar o ganho na seleção para resistência a cercosporiose nos programas de melhoramento seria a utilização de isolados mais agressivos. Dessa forma, as informações obtidas são úteis no sentido de otimizar os programas de melhoramento através da utilização dos isolados mais agressivos e pertencentes aos dois grupos genéticos para a discriminação dos genótipos de milho visando à resistência a *C. zea-maydis*.

2.4.2 Agressividade de isolados de *C. zea-maydis* sob condições de campo

O coeficiente de variação observado nos experimentos pode ser considerado baixo segundo Pimentel-Gomes e Garcia (2002), sugerindo uma boa precisão experimental. Segundo os autores, para experimentos de campo, um coeficiente de variação abaixo de 10% é considerado baixo, entre 10 a 20% é médio, entre 20 a 30% é alto e acima de 30% é muito alto.

Durante a condução dos experimentos foi observada a ocorrência de outras doenças foliares como mancha de *Phaeosphaeria* e ferrugens. Essas doenças, no entanto, não dificultaram a avaliação dos sintomas de *C. zea-maydis*, visto que no momento da avaliação os sintomas característicos da cercosporiose puderam ser discriminados com relativa facilidade. Paul e Munkvold (2005) observaram que a expansão da lesão e a esporulação de *C. zea-maydis* foram maiores nas temperaturas de 25 e 30 °C e com uma umidade relativa acima de 95%. Dessa forma, as temperaturas médias e a umidade relativa do ar nos dois locais durante o período de condução dos experimentos podem ser consideradas adequadas para o desenvolvimento da doença.

Bair e Ayers (1986), sem terem a informação da existência de dois grupos genéticos em *C. zea-maydis*, desenvolveram um estudo com 15 isolados e quatro híbridos de milho suscetíveis, em casa de vegetação e em campo. Os autores verificaram que houve variação significativa no comprimento das lesões e na severidade da doença entre os isolados, o que os

levou a sugerir que há diferenças em agressividade entre os isolados de *C. zea-maydis*. Dunkle e Carson (1998) desenvolveram um estudo de agressividade em campo, utilizando híbridos de milho e sete isolados de *C. zea-maydis* pertencentes aos dois grupos genéticos e observaram uma ampla variação em agressividade dentro dos grupos genéticos, mas não entre os grupos e uma pequena, mas significativa interação isolado e híbrido, e sugeriram que provavelmente esse resultado seja devido ao pequeno número de isolados de cada grupo. Carson; Goodman e Williamson (2002) desenvolveram um estudo de agressividade em campo, utilizando 10 híbridos e seis isolados, sendo apenas um isolado do grupo genético II. Os autores também relatam uma variação em agressividade dos isolados, mas não a relacionam com os grupos genéticos. Entretanto, no presente estudo, utilizando-se a variável nota, não foi possível detectar diferenças significativas em agressividade entre isolados de *C. zea-maydis* nas 10 linhagens de milho. Especula-se que existam outros fatores que possam ter influenciado na agressividade e não ter permitido uma melhor distinção entre os isolados. Um deles foi o período de condução dos experimentos, que para Jardinópolis (SP) foi de 10 de março a 10 de junho de 2005, e para Indianópolis (MG), de 12 de março a quatro de julho de 2005. O período mais utilizado para a condução dos experimentos pelas empresas de melhoramento com o objetivo de avaliar a severidade de várias doenças, inclusive da cercosporiose, é de outubro a março. Os meses de outubro e novembro apresentam maior distribuição da umidade durante o dia e a noite, quando comparado com o mês de março, quando foi realizada a inoculação nos experimentos. Ainda, segundo Fantin et al. (2001), a doença é favorecida por períodos com presença de orvalho e neblina, os quais ocorrem com maior frequência nos meses de outubro e novembro. O desenvolvimento dos experimentos no período indicado não foi possível devido à contaminação no primeiro cultivo dos isolados de *C. zea-maydis* que seriam utilizados para a inoculação dos experimentos.

A não detecção de variação em agressividade sob condições de campo também pode ser função do grupo de isolados e linhagens utilizados, visto que, como relatado anteriormente, Bair e Ayers (1986) e Dunkle e Carson (1998) observaram variação em agressividade entre isolados de *C. zea-maydis*.

A escala diagramática utilizada se mostrou adequada para avaliação das linhagens, possibilitando a fácil distinção no nível de resistência entre elas. Para o desenvolvimento de uma escala diagramática são levadas em conta características relacionadas ao patógeno e a lesão. As

características adotadas nas escalas desenvolvidas para experimentos de campo devem ser facilmente mensuráveis, como as que foram adotadas neste estudo: largura e comprimento das lesões, presença de halo clorótico e de esporulação. Entretanto, devido à praticidade e um rigoroso controle ambiental, algumas características são avaliadas em casa de vegetação, como no trabalho de Parlevliet (1975). O autor desenvolveu um estudo em casa de vegetação com cultivares de cevada e isolados de *Puccinia hordei* para avaliar as relações planta-patógeno com base no período latente e na taxa de esporulação. Segundo o autor, essas características podem variar dependendo do cultivar avaliada e ainda, uma das características pode apresentar uma amplitude de variação maior enquanto na outra, essa amplitude é mais sutil. Desta forma, pode-se sugerir que na avaliação de uma delas, os isolados poderiam apresentar diferenças em agressividade mais facilmente detectáveis enquanto que para a outra, essa diferença não seria tão definida entre os isolados.

Conforme foi observado no experimento desenvolvido em casa de vegetação (item 2.4.1), os 20 isolados de *C. zeae-maydis*, incluindo os oito isolados que foram testados em campo, apresentaram diferenças significativas em agressividade ao serem inoculados em um híbrido suscetível. Essa informação dá respaldo à sugestão de que existem diferenças em agressividade entre os isolados, mas que estas variações não puderam ser detectadas sob as condições experimentais dos ensaios de campo. Para a inoculação no experimento em campo não foi possível utilizar os oito isolados que apresentaram maior agressividade nos experimentos em casa de vegetação, pois esta informação não estava disponível no momento de instalação do ensaio.

Através deste estudo foi possível detectar forte interação entre linhagem e ambiente, indicando que o ambiente fornece forte influência na doença. Dunkle e Carson (1998) relataram que em experimentos desenvolvidos em quatro locais com híbridos que apresentam níveis intermediários de resistência à doença, alguns destes híbridos se comportaram iguais ao híbrido comercial mais resistente quando testado em dois locais, sendo que ao serem testados em outros dois locais, o comportamento passou a ser de alta suscetibilidade. Assim, a exemplo do verificado em nosso experimento, os autores concluíram que os genótipos de milho apresentam forte interação com o ambiente. Essa oscilação no comportamento de genótipos de milho também tem sido observada em algumas regiões de plantio no Brasil (BRUNELLI, 2004; FANTIN et al., 2001), o que certamente representa um efeito complicador para programas de melhoramento visando à resistência.

Os estudos de herança da resistência a *C. zea-maydis* indicaram a presença de resistência do tipo poligênica (THOMPSON et al., 1987; BUBECK et al., 1993; COATES; WHITE, 1994; SAGHAI MARROF et al., 1996; LEHMENSIEK et al., 2001). Esse tipo de resistência pode ser facilmente visualizado em campo, mas a discriminação dos genótipos não é tão evidente como no caso da resistência monogênica, por apresentar uma variação contínua de graus de resistência. No presente estudo observou-se essa variação contínua da resistência entre as linhagens com diferentes níveis de resistência. A presença de variação em agressividade de isolados de *C. zea-maydis* (item 2.4.1) e a ausência de interação entre isolado e linhagem no experimento em campo forneceu subsídios para especular que a resistência, do ponto de vista genético, seja realmente oligo ou poligênica e, do ponto de vista epidemiológico, seja horizontal, já que para a resistência do tipo vertical a interação isolado e linhagem deverá ser significativa. As implicações de tais informações podem ser observadas na durabilidade da resistência e na epidemia da doença. No caso da resistência oligo ou poligênica, diz-se que ela está além da capacidade microevolutiva do patógeno em ser vencida, ou de outra maneira, que sistemas poligênicos de resistência possuem maior capacidade de resistir a mudanças genéticas no patógeno do que sistemas monogênicos (CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995). Estas argumentações assumem que tanto sistemas poligênicos como monogênicos seguem a hipótese gene-a-gene de Flor, em que para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a virulência. Segundo Vanderplank (1968), a resistência horizontal reduz a taxa de infecção através de um aumento no período latente e diminuição do tamanho das lesões e também no número de esporos produzidos pelo patógeno. Portanto, a utilização de genótipos de milho com um maior número de genes de resistência contribuirá na diminuição dos danos no ciclo atual da cultura, bem como na produção de inóculo para o próximo ciclo.

Para um estudo mais detalhado para averiguar variações em agressividade de isolados de *C. zea-maydis* sugere-se a utilização de um número maior de isolados, utilizar mais genótipos contrastantes, tanto linhagens quanto híbridos, em diversos ambientes, e ainda, avaliar outras variáveis como período latente e taxa de desenvolvimento da lesão, visto que muitos autores têm (PARLEVLIET, 1975; SUASSUNA; MAFFIA; MIZUBUTI, 2004; RIMÉ et al., 2005) utilizado essas características para caracterizar o nível de resistência de genótipos de várias espécies de importância econômica. Outro aspecto interessante seria o desenvolvimento desses experimentos sob condições controladas, como em casa de vegetação, onde determinados fatores ambientais

podem ser rigorosamente controlados, como temperatura e umidade relativa do ar. Mais especificamente para *C. zea-maydis*, estudos poderiam ser desenvolvidos no sentido de averiguar se outros fatores, como a luminosidade, influenciam no desenvolvimento e na agressividade. Contudo, Fehr (1993) sugere que no melhoramento genético visando à resistência a doenças, as informações acerca da agressividade, como a utilização dos isolados mais agressivos, são de fundamental importância ao passo que contribuem para direcionar e conseqüentemente diminuir o tempo requerido nos programas de melhoramento para obtenção de cultivares resistentes.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agressividade dos isolados de *C. zea-maydis* pertencentes ao grupo genético II foi em média maior que a dos isolados do grupo genético I, quando avaliados sob condições de casa de vegetação.

Não foram observadas diferenças significativas em agressividade entre isolados de *C. zea-maydis* avaliados em Jardinópolis (SP) e Indianópolis (MG) nas linhagens e no período em que foram conduzidos os experimentos.

Foi observada interação significativa entre linhagens e locais, sugerindo que o ambiente fornece forte influência sobre as linhagens quanto ao nível de resistência a *C. zea-maydis*.

REFERÊNCIAS

AGROCERES. **Guia Agroceres de sanidade**. São Paulo: Sementes Agroceres, 1996. 72 p.

AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 32, v.1, p.647-671.

ASEA, G.; LIPPS, P.E.; PRATT, R.C.; GORDON, S.G.; ADIPALA, E. Development of greenhouse inoculation procedures for evaluation of partial resistance to *Cercospora zea-maydis* in maize inbreds. **Journal of Phytopathology**. Verlag, v.153, p.647-653, 2005.

BAIR, W.; AYERS, J.E. Variability in isolates of *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**. Saint Paul, v.76, p.129-132, 1986.

BATHIA, A.; MUNKVOLD, G.P. Relationships of environmental and cultural factors with severity of gray leaf spot in maize. **Plant Disease**. Saint Paul, v.86, p.1127-1133, 2002.

BECKMAN, P.M.; PAYNE, G.A. External growth, penetration, and development of *Cercospora zea-maydis* in corn leaves. **Phytopathology**. Saint Paul, v.72, p.810-815, 1982.

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

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2001. 500 p.

BRUNELLI, K.R. *Cercospora zea-maydis*: Esporulação, Diversidade Morfo-Genética e Reação de Linhagens de Milho. 2004. 105p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

BUBECK, D.M.; GOODMAN, M.M.; BEAVIS, W.D.; GRANT, D. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**. Madison, v.33, p.838-847, 1993.

CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 37, v.1, p.729-760.

CARLISLE, D.J.; COOKE, L.R.; WATSON, S.; BROWN, A.E. Foliar aggressiveness of northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* on detached leaflets of three potato cultivars. **Plant Pathology**. London, v.51, p.424-434, 2002.

CARSON, M.L.; GOODMAN, M.M.; WILLIAMSON, S.M. Variation in aggressiveness among isolates of *Cercospora* from maize as a potential cause of genotype-environment interaction in gray leaf spot trials. **Plant Disease**. Saint Paul, v.86, p.1089-1093, 2002.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. **A cercosporiose na cultura do milho**. Brasília: EMBRAPA, 2003. 5 p. (Circular Técnica 24).

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

CHUPP, C.; SHERF, A.F. **Vegetable disease and their control**. New York: The Ronald Press, 1960. 232 p.

COATES, S.T.; WHITE, D.G. Sources of resistance to gray leaf spot of corn. **Plant Disease**. Saint Paul, v.78, p.1153-1155, 1994.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/indicadores/0301-Oferta-e-demanda-brasileira.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2006.

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

DONAHUE, P.J.; STROMBERG, E.L.; MYERS, S.L. Inheritance of gray leaf spot in a diallel cross of 14 maize inbreds. **Crop Science**. Madison, v.31, p.926-931, 1991.

DUNKLE, L.D.; CARSON, M.L. Genetic variation in *Cercospora* and the potential impact on selecting for resistance to gray leaf spot of corn. **Proceedings of the 53rd Annual Corn and Sorghum Research Conference**. Chicago, n.53, p.334-347, 1998.

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

EHRENSHAFT, M.; CHUNG, K.R.; JENNS, A.E.; DAUB, M.E. Functional characterization of *SOR 1*, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotianae*. **Current Genetics**. Verlag, v.34, p.478-485, 1999.

ELWINGER, G.F.; JOHNSON, M.W.; HILL, R.R.; AYERS, J.E. Inheritance of resistance to gray leaf spot of corn. **Crop Science**. Madison, v.30, p.350-358, 1990.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. Longman: Essex, 1989. 438 p.

- FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Milho**: estratégias de manejo para a alta produtividade. Piracicaba. ESALQ/USP, 2003. 208 p.
- FANTIN, G.M.; BRUNELLI, K.R.; RESENDE, I.C.; DUARTE, A. **A mancha de cercospora do milho**. Campinas:IAC, 2001. 20 p. (Boletim técnico IAC, 192).
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United States**. Disponível em: http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp. Acesso em: 20 set. 2005.
- FEHR, W.R. **Principles of cultivar development**. New York: Macmillan, 1993. 536 p.
- GEVERS, H.O.; LAKE, J.K.; HOHLS, T. Diallel cross analysis of resistance to gray leaf spot in maize. **Plant Disease**. Saint Paul, v.78, p.379-383, 1994.
- HANLIN, R.T. Microcycle conidiation – a review. **Mycoscience**. Tokyo, v.35, p.113-123, 1994.
- HUFF, C.A.; AYERS, J.E.; HILL, R.R. Inheritance of resistance in corn (*Zea mays*) to gray leaf spot. **Phytopathology**. Saint Paul, v.78, p.790-794, 1988.
- KULKARNI, R.N.; CHOPRA, V.L. Environment as the cause of differential interaction between host cultivars and pathogenic races. **Phytopathology**. Saint Paul, v.72, p.1384-1386, 1982.
- LAPAIRE, C.L.; DUNKLE, L.D. Microcycle conidiation in *Cercospora zeae-maydis*. **Phytopathology**. Saint Paul, v.93, p.193-199, 2003.
- LATTERELL, F.M.; ROSSI, A. Gray leaf spot of corn: a disease on the move. **Plant Disease**. Saint Paul, v.67, p.842-847, 1983.
- LEHMENSIEK, A.; ESTERHUIZEN, A.M.; van STADEN, D.; NELSON, S.W.; RETIEF, A.E. Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. **Theoretical and Applied Genetics**. New york, v.103, p.797-803, 2001.
- MAYR, E. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia University Press, 1942. 384 p.
- MAYR, E. **Populations, species, and evolution**: an abridgment of animal species and evolution. Cambridge: Belknap Press, 1970. 453 p.
- MUNKVOLD, G.P.; MARTINSON, C.A.; SHRIVER, J.M.; DIXON, P.M. Probabilities for profitable fungicide use against gray leaf spot in hybrid maize. **Phytopathology**. Saint Paul, v.91, p.477-484, 2001.
- OKORI, P.; RUBAIHAYO, P.R.; ADIPALA, E.; DIXELIUS, C. Interactive effects of host, pathogen and mineral nutrition on gray leaf spot epidemics in Uganda. **European Journal Of Plant Pathology**. Dordrecht, v.110, p.119-128, 2004.

PAUL, P.A.; MUNKVOLD, G.P. Influence of temperature and relative humidity on sporulation of *Cercospora zae-maydis* and expansion of gray leaf spot lesions on maize leaves. **Plant Disease**. Saint Paul, v.89, p.624-630, 2005.

PARLEVLIET, J.E. Evaluation of the concept of horizontal resistance in the barley / *Puccinia hordei* host-pathogen relationship. **Phytopathology**. Saint Paul, v.66, p.494-497, 1975.

PEIXOTO, C.M. **O milho: o rei dos cereais** – da sua descoberta há 8.000 anos até as plantas transgênicas. Disponível em: <http://www.seednews.inf.br/portugues/seed62/milho62.shtml>. Acesso em: 20 set. 2005.

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

PIMENTEL-GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309 p.

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

RIMÉ, D.; ROBERT, C.; GOYEAU, H.; LANNOU, C. Effect of host genotype on leaf (*Puccinia triticina*) lesion development and urediniospore production in wheat seedlings. **Plant Pathology**. Dordrecht, v. 54, p.287-298, 2005.

RINGER, C.E.; GRYBAUSKAS, A.P. Infection cycle components and disease progress of gray leaf spot on field corn. **Plant Disease**. Saint Paul, v.79, p.24-28, 1995.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **How a corn plant develops**. Iowa: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 20 p. (Special Report, 48).

RUPE, J.C.; SIEGEL, M.R.; HARTMAN, J.R. Influence of environment and plant maturity on gray leaf spot of corn caused by *Cercospora zae-maydis*. **Phytopathology**. Saint Paul, v.72, p.1587-1591, 1982.

SAS Institute Inc, 2000. SAS/STAT User's Guide. Release 8.1. Cary, NC.

SAGHAI MARROF, M.A.; ZUE, Y.G.; XIANG, Z.X.; STROMBERG, E.L.; RUFENER, G.K. Identification of quantitative trait loci controlling resistance gray leaf spot disease in maize. **Theoretical and Applied Genetics**. New York, v.93, p.539-546, 1996.

- SHEKIN, D.J. **Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures**. 3rd ed. Florida: Chapman & Hall/CRC, 2004. 1193 p.
- SHIM, W.B.; DUNKLE, L.D. Identification of genes expressed during cercosporin biosynthesis in *Cercospora zea-maydis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v.61, p.237-248, 2002.
- SHIM, W.B.; DUNKLE, L.D. CZK3, a MAP kinase kinase kinase homolog in *Cercospora zea-maydis*, regulates cercosporin biosynthesis, fungal development, and pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. Saint Paul, v.16, p.760-768, 2003.
- SMITH, J.E.; ANDERSON, J.G.; KRISTIANSEN, B.; ALRAWI, A.; YAHYA, A.G. Microcycle conidiation. In: TURIAN, G.; HOLH, H.R. (Ed.) **The fungal spore: morphogenetic controls**. London: Academic Press, 1981. p.627-650.
- SUASSUNA, N.D.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Aggressiveness and host specificity of brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. **Plant Pathology**. Dordrecht, v.53, p.405-413, 2004.
- TEHON, L.R.; DANIELS, E. Notes on parasitic fungi of Illinois. **Mycologia**. Lancaster, v.17, p.240-249, 1925.
- THOMPSON, R.B.; BERGQUIST, G.A.; PAYNE, G.A.; BOWMAN, D.T.; GOODMAN, M.M. Inheritance of resistance to gray leaf spot in maize. **Crop Science**. Madison, v.27, p.243-346, 1987.
- THORSON, P.R.; MARTINSON, C.A. Development and survival of *Cercospora zea-maydis* germplings in different relative-humidity environments. **Phytopathology**. Saint Paul, v.83, p.153-157, 1993.
- USDA. **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome>. Acesso em: 20 set. 2005.
- VANDERPLANK, J.E. **Disease resistance in plants**. Orlando: Academic Press, 1968. 194 p.
- VIÉGAS, A.P. **Alguns fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Agronomia, 1945. (Boletim, 8).
- WANG, J.; LEVY, M.; DUNKLE, L.D. Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize. **Phytopathology**. Saint Paul, v.88, p.1269-1275, 1998.
- WARD, J.M.J.; NOWELL, D.C. Integrated management for the control in maize gray leaf spot. **Integrated Pest Management Reviews**. Dordrecht, v.3, p.1-12, 1998.
- WARD, J.M.J.; STROMBERG, E.L.; NOWELL, D.C.; NUTTER JR, F.W. Gray leaf spot – A disease of global importance in maize production. **Plant Disease**. Saint Paul, v.83, p.884-895, 1999.

WISSER, R.J.; BALINT-KURTI, P.J.; NELSON, R.J. The genetic architecture of disease resistance in maize: a synthesis of published studies. **Phytopathology**. Saint Paul, v.96, p.120-129, 2006.

YORINORI, J.T.; KIIHL, R.A.S. Melhoramento de plantas visando resistência a doenças. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p.715-735.

ANEXOS

ANEXO A – Contraste de médias para severidade de sintomas de isolados de *C. zeae maydis* inoculados no híbrido de milho DAS-8392 sob condições de casa de vegetação

1º Experimento				2º Experimento			
Isolado	Grupo Genético		Média*	Isolado	Grupo Genético		Média*
CASTRO	II	a	3,71	MIG 1.1	II	a	3,75
JA 3.1	I	ab	3,50	I 10	II	a	3,71
MIG F	II	abc	3,13	UBER 3	II	a	3,71
CRIS A	II	abc	3,08	UBER 9	II	ab	3,54
I 10	II	abc	3,08	UBER 2	II	ab	3,50
LEM	I	abc	3,00	MIG F	II	ab	3,50
GUA 5	I	abc	3,00	CRIS A	II	ab	3,50
PIRA 7.1	I	abc	3,00	I 9.2	II	ab	3,46
MIG 1.1	II	abc	2,96	IRAI 4.1	II	abc	3,00
UBER 9	II	abc	2,83	CASTRO	II	abc	3,00
U 1.2	I	abc	2,79	LEM	I	abc	2,96
UBER 2	II	abc	2,71	PER	II	abc	2,96
I 9.2	II	abc	2,66	PIRA 7.1	I	abc	2,71
UBER 3	II	abc	2,54	JA 3.1	I	bcd	2,50
PER	II	abc	2,50	U 2.3	I	cd	2,04
PIRA 4	I	abc	2,46	I 7.1	I	cd	2,00
IRAI 4.1	II	bc	2,25	PIRA 4	I	cd	2,00
CD 3.1	I	c	2,04	U 1.2	I	cd	2,00
U 2.3	I	c	2,00	GUA 5	I	cd	2,00
I 7.1	I	c	2,00	CD 3.1	I	d	1,50
GG I **		B	2,64			B	2,19
GG II **		A	2,86			A	3,42

* Médias na vertical seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade (Tukey).

** GG I e GG II referem-se ao grupo genético I e II, respectivamente.

ANEXO B – Severidade média ocasionada pelos isolados de *C. zea-maydis* inoculados nas linhagens de milho para Jardinópolis (SP)

Linhagem	Isolado								Média ¹
	GUA 5	I 7.1	JA 3.1	U 2.3	CRIS A	I 10	UBER 3	MIG 1.1	
GNS-69	4,00	5,00	4,00	4,33	3,67	4,00	4,00	4,33	4,17 a
ESALQ-42	4,00	4,00	4,33	4,33	4,33	4,33	3,67	4,00	4,13 ab
GNS-82	3,33	3,33	4,00	4,00	3,67	4,00	4,67	4,33	3,92 abc
GNS-66	3,67	4,00	4,00	4,00	3,33	3,33	3,33	4,00	3,71 abc
ESALQ-18	4,00	3,67	4,33	4,33	4,67	3,67	3,33	4,33	4,04 abc
ESALQ-38	4,00	4,33	3,67	3,67	3,33	3,67	4,00	3,33	3,75 abc
GNS-75	3,67	3,67	3,33	4,00	3,67	3,33	4,00	4,67	3,79 abc
DAS-11	3,00	3,67	3,00	3,67	3,33	2,67	3,00	3,33	3,21 bc
DAS-5	3,00	3,67	3,33	4,33	3,67	3,33	3,33	3,67	3,54 c
DAS-4	1,00	1,00	1,00	1,00	2,33	1,00	1,67	1,00	1,25 d
Média	3,37 A	3,63 A	3,50 A	3,77 A	3,60 A	3,33 A	3,50 A	3,70 A	3,55

¹ Médias na linha e na coluna, seguidas da mesma letra, maiúscula e minúscula, respectivamente, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade (Tukey).

ANEXO C – Severidade média ocasionada pelos isolados de *C. zeae-maydis* inoculados nas linhagens de milho para Indianópolis (MG)

Linhagem	Isolado								Média ¹
	GUA 5	I 7.1	JA 3.1	U 2.3	CRIS A	I 10	UBER 3	MIG 1.1	
ESALQ-18	4,33	4,33	4,33	4,67	4,33	4,33	4,33	5,00	4,45 a
GNS-75	4,33	4,33	4,33	3,67	4,00	4,67	4,67	4,67	4,33 a
ESALQ-42	3,67	4,00	3,67	3,67	4,00	4,33	4,33	4,67	4,04 ab
DAS-11	4,00	4,33	4,33	4,00	4,33	4,00	4,00	4,67	4,21 ab
GNS-69	4,00	4,33	3,67	4,33	4,00	4,33	4,00	4,33	4,12 ab
GNS-82	3,67	4,00	3,33	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	3,87 b
GNS-66	3,00	3,00	3,33	3,33	3,00	3,00	3,33	3,33	3,16 c
ESALQ-38	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,33	3,04 c
DAS-5	3,33	3,00	3,00	3,67	3,33	3,67	3,33	3,67	3,37 c
DAS-4	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00 d
Média	3,43 A	3,53 A	3,40 A	3,53 A	3,50 A	3,63 A	3,60 A	3,87 A	3,56

¹ Médias na linha e na coluna, seguidas da mesma letra, maiúscula e minúscula, respectivamente, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade (Tukey).