

CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *BIPOLARIS* E
EXSEROHILUM EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA

GLEYCE KELLY DE SOUSA RAMOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2021

CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *BIPOLARIS* E
EXSEROHILUM EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA

GLEYCE KELLY DE SOUSA RAMOS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Marcelo Vivas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

R175

Ramos, Gleyce Kelly de Sousa.

CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *BIPOLARIS* E *EXSEROHILUM* EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA / Gleyce Kelly de Sousa Ramos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

84 f.

Bibliografia: 78 - 84.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientador: Marcelo Vivas.

Coorientador: Silvaldo Felipe da Silveira.

1. Caracterização molecular. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Mancha-foliar. 4. Milhos especiais. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

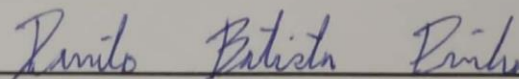
CARACTERIZAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *BIPOLARIS*
E *EXSEROHILUM* EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA

GLEYCE KELLY DE SOUSA RAMOS

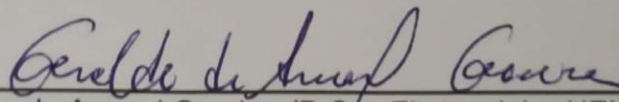
"Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal"

Aprovada em 18 de março de 2021.

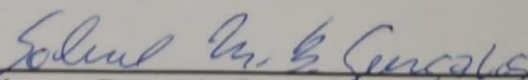
Comissão Examinadora



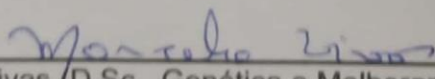
Prof. Danilo Batista Pinho (D.Sc., Fitopatologia) – UnB



Prof. Geraldo de Amaral Gravina (D.Sc., Fitotecnia) – UENF



Gabriel Moreno Bernardo Gonçalves (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF



Prof. Marcelo Vivas (D.Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF
(Orientador)

GKSRam9

Aos meus pais Wanete e Marivaldo Ramos; aos meus irmãos Marcilene, Willamme e Ane Ramos; às minhas sobrinhas Sthefany e Sophia Ramos

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, saúde e pela força concedida para superar as dificuldades. Obrigada por os Teus planos para a minha vida serem sempre maiores do que os meus sonhos;

Aos meus pais Marivaldo Ramos e Wanete Ramos, pela educação, ensinamentos, princípios, dedicação e lições que só me fizeram crescer. Pelo sacrifício em manter meus estudos, pelo incentivo à trajetória acadêmica, confiança e apoio às minhas decisões. É por vocês e para vocês essa conquista. Minha eterno “muito obrigada”;

Aos meus irmãos Marcilene, Willamme e Ane Ramos pelo carinho, confiança, incentivo, pelas “brigas” que sempre terminavam em risadas, pelo apoio e ajuda nas horas difíceis. Às minhas sobrinhas Sthefany e Sophia Ramos pelas alegrias e momentos de descontração mesmo de longe fisicamente;

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Vivas, por me aceitar como orientanda, por toda sua dedicação e paciência, por sempre viabilizar o necessário para o desenvolvimento da pesquisa. A ele uma enorme admiração pelo seu profissionalismo, sem deixar de esquecer a parte humana do processo. À Janieli com quem tive o prazer de conviver, pelas trocas de experiências, sejam elas profissionais ou pessoais;

Ao professor Danilo Pinho pela enorme disposição, contribuição e ajuda nas análises filogenéticas. Ao técnico responsável pela Clínica Fitossanitária, Vicente Dias-Mussi, pelos ensinamentos;

Às amigas de república Deyse e Marlene que tornaram a convivência longe de casa mais leve. Aos meus colegas e amigos que fiz na UENF José, Luana, Juliana, Fernanda, Rafael, Júlio, Marcelo Jr., Ana Beatriz, Derivaldo, Ramon, Cleiton, Edu, e Alex pelo auxílio na condução e contribuição para o andamento desse trabalho;

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realização este curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela concessão das bolsas de estudos e financiamento das pesquisas. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. TRABALHOS	16
3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE <i>BIPOLARIS</i> EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA	16
Resumo.....	16
Abstract.....	17
Introdução	18
Material e Métodos.....	20
Resultados e Discussão.....	31
RESUMO E Conclusões.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOMOLECULAR E PATOLÓGICA DE <i>EXSEROHILUM</i> EM MILHO-pipoca.....	53
Resumo.....	53

Abstract.....	54
Introdução	55
Material e Métodos.....	56
Resultados e Discussão.....	63
RESUMO E Conclusões.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
Resumo e conclusões.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

RAMOS, Gleyce Kelly de Sousa, D. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, março de 2021. Caracterização de diferentes espécies de *Bipolaris* e *Exserohilum* em linhagens de milho-pipoca. Orientador: Prof. Marcelo Vivas.

As manchas-foliares, em espécies cultivadas, são doenças que merecem atenção, pois prejudicam o agronegócio. As doenças podem ser decorrentes da incidência de fungos fitopatogênicos dos gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum*. Neste trabalho, buscou-se identificar quais as espécies de *Bipolaris* e *Exserohilum* estão associados à mancha-foliar do milho por meio da caracterização morfomolecular e da patogenicidade dos isolados em linhagens de milho-pipoca. As folhas de milho com sintomas de mancha-foliar foram coletadas e identificadas de acordo com o hospedeiro e local de coleta. Após o isolamento dos fungos, avaliaram-se as características morfológicas, o posicionamento filogenético dos isolados e a patogenicidade dos isolados em linhagens de milho-pipoca. Em relação ao gênero *Bipolaris*, as análises morfológicas não foram capazes de agrupar os isolados de acordo com a espécie. As análises multigênicas (ITS e GAPDH) foram realizadas via Inferência Bayesiana, por meio da qual, foi possível separar em nível de espécie os isolados. Os isolados de *Bipolaris* foram coletados nos Estados do Alagoas, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro e Tocantins, e identificadas duas espécies infectando o milho no Brasil: *B. maydis* e *B. gossypina*. A espécie *B. maydis* foi amostrada em todos os Estados, enquanto que *B. gossypina* foi coletada apenas no Estado de Mato Grosso. Em campo,

foram selecionadas três linhagens contrastantes L623 (resistente a *B. maydis*), L51 e L692 (suscetíveis à *B. maydis*). Posteriormente, em ambiente controlado, essas linhagens foram usadas para avaliar a patogenicidade dos isolados. Para a inoculação, foram selecionados seis isolados representativos de *B. maydis* CF/UENF 475, CF/UENF 477, CF/UENF 479, CF/UENF 481, CF/UENF 492, CF/UENF 501 e o único isolado de *B. gossypina* (CF/UENF 482). Em relação à patogenicidade, todos os isolados de *B. maydis* e o isolado de *B. gossypina* causaram mancha-foliar e não houve diferença na patogenicidade entre os isolados inoculados. Nas condições estudadas, a linhagem L623 foi menos suscetível a *B. maydis*. Em relação ao gênero *Exserohilum*, duas espécies (*E. rostratum* e *E. turcicum*) foram identificadas a partir de nove isolados coletados nos Estados do Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A espécie *E. turcicum* foi encontrada em todas as áreas amostradas, enquanto *E. rostratum* foi coletada apenas no Estado do Rio de Janeiro. O isolado CF/UENF 500 de *E. rostratum* e quatro isolados (CF/UENF 480, CF/UENF 489, CF/UENF 491, CF/UENF 504) representativos de *E. turcicum* foram utilizados no teste de patogenicidade com a linhagem de milho-pipoca L55. As características morfológicas podem ser utilizadas para separar os gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum*, enquanto a identificação precisa das espécies é feita por análise baseada em dados moleculares. A combinação dos dados morfológicos, moleculares e patológicos pode ser usada para entender quais os patógenos estão associados à mancha-foliar. Os resultados demonstram que diferentes espécies de *Bipolaris* e *Exserohilum* causam a mancha-foliar no milho-pipoca. Esses isolados podem ser utilizados em ensaios de melhoramento genético visando à resistência a esses patógenos.

Palavras-chave: Caracterização molecular. Fungos fitopatogênicos. Mancha-foliar. Milhos especiais

ABSTRACT

RAMOS, Gleyce Kelly de Sousa, D. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, march, 2021. Characterization of different *Bipolaris* and *Exserohilum* specie in popcorn inbred line. Advisor: Prof. Marcelo Vivas

Leaf spots, in cultivated species, are diseases that deserve attention, as they harm agribusiness. The diseases may result from the incidence of phytopathogenic fungi of the *Bipolaris* and *Exserohilum* genera. In this work, we sought to identify which species of *Bipolaris* and *Exserohilum* are associated with corn leaf spot through the morphomolecular characterization and pathogenicity of peas in popcorn-inbred lines. Corn leaves with leaf spot symptoms were collect and identified accord to host and collection location. After the isolation of the fungi, the morphological characteristics, the phylogenetic positioning of the results and the pathogenicity of the results in popcorn lines were evaluat. In relation to the *Bipolaris* genus, the morphological analyzes were not able to group those granted according to species. The multigene analyzes (ITS and GAPDH) were carried out via Bayesian Inference, through which it was possible to separate the level of species preference. *Bipolaris* were collected in the states of Alagoas, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro and Tocantins, and identified two species infecting corn in Brazil: *B. maydis* and *B. gossypina*. The species *B. maydis* was sample in all States, while *B. gossypina* was collect only in the State of Mato Grosso. In the field, three contrasting lines L623 (resistant to *B. maydis*), L51 and L692 (susceptible to *B. maydis*) were select. Later, in a controlled

environment, these strains were used to assess the pathogenicity of the offerings. For one inoculation, six representative choices of *B. maydis* CF / UENF 475, CF / UENF 477, CF / UENF 479, CF / UENF 481, CF / UENF 492, CF / UENF 501 and the only isolate of *B. gossypina* were selected. (CF / UENF 482). Regarding pathogenicity, all *B. maydis* accessions and the *B. gossypina* isolate caused leaf spot and there was no difference in pathogenicity between the inoculated candidates. Under the conditions studied, the L623 strain was less susceptible to *B. maydis*. In relation to the genus *Exserohilum*, two species (*E. rostratum* and *E. turcicum*) were identified from nine collected in the states of Ceara, Espirito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The species of *E. turcicum* was found in all sampled areas, while *E. rostratum* was collected only in the State of Rio de Janeiro. The isolate CF / UENF 500 from *E. rostratum* and four accessions (CF / UENF 480, CF / UENF 489, CF / UENF 491, CF / UENF 504) representative of *E. turcicum* were used in the pathogenicity test with the maize strain - L55 popcorn. The morphological characteristics can be used to separate the genera *Bipolaris* and *Exserohilum*, while the precise identification of the species is done by analysis based on molecular data. The combination of morphological, molecular and pathological data can be used to understand which pathogens are associated with leaf spot. The results demonstrate that different species of *Bipolaris* and *Exserohilum* cause leaf spot in popcorn. Can be used in genetic improvement tests for resistance to these pathogens.

Keywords: Molecular characterization. Phytopathogenic fungi. Leaf spot. Special corns

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos grãos mais cultivados. A cultura tem variedades adaptadas às diversas condições climáticas e regiões de cultivo. Seu uso é versátil, por isso é considerada uma das espécies agrícolas com maior importância mundial. Além do milho comum, existem ainda tipos especiais de milho. Estes pertencem a um nicho de mercado bem definido, como o milho-pipoca, usado na alimentação humana (Morô e Fritsche-Neto, 2017).

O milho-pipoca é um alimento bastante apreciado no Brasil, contudo, seu cultivo no país ainda é restrito aos pequenos produtores e regiões específicas como o Centro Oeste e Sul do Brasil (Ibrafe, 2021). A cultura do milho-pipoca é uma boa alternativa de renda aos produtores, uma vez que, além de diversificar a produção agrícola, pode alcançar preços até três vezes superiores ao milho convencional (Conab, 2020).

A produção deste tipo de grão pode ser reduzida em função da ocorrência de doenças foliares. Dentre tais doenças estão as helmintosporioses, causadas pelos fungos *Exserohilum turcicum* (Pass.) (Leonard e Suggs, 1974) e *Bipolaris maydis* (Nisik e Miyake) (Shoemaker, 1959); a cercosporiose provocada por *Cercospora zea-maydis*; a mancha branca ou mancha de *Phaeosphaeria*, que tem como agente causal *Phaeosphaeria maydis* (Henn.) entre outras.

A mancha-foliar, causada por *B. maydis* é uma doença amplamente distribuída em plantios de milho pelo mundo. Os sintomas causados nas folhas são, geralmente, lesões inicialmente pequenas e ovaladas que se tornam alongadas quando maduras e com coloração palha. O patógeno se desenvolve

em condições de alta umidade e temperatura variando de 20 °C a 32 °C. A doença interfere nos atributos agronômicos, como altura da planta, número de grãos/espiga e rendimento da cultura (Hussain et al., 2016). A espécie *B. gossypina* é pouco explorada, portanto, necessita de mais estudos a respeito do crescimento e esporulação, além de condições ideais para desenvolvimento da lesão.

A mancha-foliar provocada por *E. turcicum* é caracterizada por lesões foliares necróticas alongadas de 2,5 a 15 cm de comprimento, de cor de palha e acinzentada que pode levar à morte do tecido foliar. A doença se desenvolve, especialmente, em regiões de clima tropical e subtropical, com temperatura moderada entre 18 e 24 °C, com um ótimo de 20 °C, alta umidade relativa do ar, com a presença de orvalho nas folhas, no mínimo 5 horas (Nwanosike e Mabagala, 2017).

A esporulação da espécie *E. rostratum*, em condições controladas, é favorecida em temperatura de ± 28 °C. As lesões ocorrem nas margens das folhas, sendo lesões pequenas, elípticas, coloração verde acinzentada e não restritas às nervuras das folhas. Para o desenvolvimento da doença é necessário que o hospedeiro esteja em um ambiente com umidade relativa cerca de 70% (Levy e Pataky, 1992; Sharma et al., 2014).

As espécies *B. maydis* e *E. turcicum* são fungos fitopatogênicos que têm uma gama de hospedeiros e, quando ocorrem em culturas de grande importância agrícola, podem resultar em grandes perdas econômicas (Manamgoda et al., 2014). A severidade a esses patógenos pode variar de acordo com o grau de resistência do material plantado e condições edafoclimáticas (Hussain et al., 2016; Nwanosike e Mabagala, 2017; Turgay et al., 2020).

Em milho-pipoca, pesquisas são desenvolvidas visando melhoramento da cultura para resistência a *B. maydis* e *E. turcicum*, pois a cultura é extremamente suscetível a esses fungos (Kurosawa et al., 2018; Santos et al., 2020). Em relação aos patógenos, as informações ainda são escassas em relação às condições ótimas para seu desenvolvimento. Esse conjunto de informações é necessário para compreender o patossistema e, assim, propor medidas de controle.

Para traçar medidas de controle eficientes é necessário realizar a identificação correta de qual patógeno ocorre na cultura. Para tal, é interessante usar a combinação de dados morfológicos, moleculares e patológicos, pois

podem oferecer mais confiabilidade nos resultados (Wang et al., 2017; Turgay et al., 2020).

Grupos de pesquisa buscam realizar a identificação de espécies, por meio de dados moleculares disponíveis em banco de dados, como o Genbank. para estabelecer um limite e diferenciar espécies/gêneros de fungos morfologicamente semelhantes, bem como, oferecer uma revisão sobre biologia, ecologia e distribuição geográfica desses fungos (Manamgoda et al., 2014; Hernández-Restrepo et al., 2018).

Entre os gêneros estudados podem ser citados o *Bipolaris* e o *Exserohilum*. No Brasil, as informações a respeito da ocorrência e distribuição desses patógenos ainda são escassas, sendo um passo importante e indispensável para estabelecer medidas de controle eficientes. Diante do exposto, torna-se necessário saber quais espécies estão associadas à mancha-foliar em milho no território brasileiro e, por essa razão, foi utilizado o emprego de técnicas moleculares associados às informações morfológicas e patológicas para melhor caracterizar os patógenos no Brasil.

Dessa forma, nesta pesquisa buscou-se verificar quais as espécies de *Bipolaris* e *Exserohilum* estão associadas à mancha-foliar do milho por meio da caracterização morfomolecular e da patogenicidade dos isolados em linhagens de milho-pipoca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais do milho-pipoca

O milho-pipoca (*Z. mays* L. var. *everta*) pertence à família *Poaceae*, sub-família *Panicoideae* e gênero *Zea*. Há algumas teorias a respeito da origem do milho-pipoca. Uma delas é que o mesmo se derivou do teosinto (*Zea mexicana*) por seleção direta do homem. É relatado que a prática de estourar milho era utilizada pelos índios americanos, antes mesmo da chegada dos colonos nas tribos da América Central e do Sul (Gama et al., 1990).

O milho-pipoca possui grãos pequenos, pericarpo duro, hermeticamente fechado e quando aquecidos à temperatura adequada, estouram, expondo o endosperma (Morô e Fritsche-Neto, 2017). A capacidade de expansão do milho-pipoca é o que o diferencia do milho comum e o torna exclusivo ao consumo humano (Sweley et al., 2013; Morô e Fritsche-Neto, 2017).

O milho-pipoca é um alimento bastante apreciado no Brasil, principalmente na Região Sudeste. Dados indicam maior consumo de pipoca no Brasil e, com isso, ocorreu um aumento na área plantada e a produção do milho-pipoca (Ibrafe, 2021). O maior Estado produtor brasileiro é o Mato Grosso, que em 2018 teve área plantada de 60.017 hectares, sendo a maior dos últimos anos, com uma produtividade média de 4.472 kg/ha (Kist, 2019).

A cultura tem um mercado mais estável quando comparado ao de milho comum, devido a um sistema integrado entre indústria e produtor. O mercado está em expansão e é uma boa opção econômica aos produtores (Conab, 2020).

Porém, a limitação de cultivares adaptadas ao Brasil e a falta de material com resistência às principais doenças ainda restringe seu cultivo, por isso, grande parte do grão encontrado no mercado brasileiro é importada (Kist, 2019).

Em relação ao preço, o milho-pipoca geralmente é mais rentável do que o milho comum (Conab, 2020) e tem enorme potencial econômico com possibilidade de expansão (Sousa et al., 2016), porém, assim como outras espécies cultivadas está sujeita aos estresses bióticos e abióticos, que podem reduzir a produção.

2.2. Mancha-foliar

Por muito tempo, manchas foliares causadas por espécies de fungos fitopatogênicos incluídos nos gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum* eram conhecidas apenas como helmintosporioses. Com o avanço dos estudos taxonômicos, baseado em dados morfológicos e moleculares. As espécies de fungos causadores dessas doenças foram (re)classificadas, e hoje *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* e *Exserohilum* são bem separadas (Manamgoda et al., 2014; Hernández-Restrepo et al., 2018).

O gênero *Helminthosporium* foi estabelecido em 1809 e *H. velutinum* Link: S. F. Gray, como a espécie tipo. Posteriormente, esse foi dividido em dois subgêneros: *Cilindro-Helminthosporium* (espécies com conídios cilíndricos que germinavam por um ou mais tubos germinativos em qualquer célula) e *Eu-Helminthosporium* (espécies com conídios fusiformes, retos ou curvas que germinavam por um tubo germinativo nas células terminais) (Nisikado, 1929).

O subgênero *Cilindro-Helminthosporium* foi reclassificado como gênero *Drechslera*, incluindo-se neste novo gênero fungos com conídio cilíndrico e não curvado. O gênero *Drechslera* pode ser diferenciado por sua capacidade de desenvolver um tubo germinativo a partir de qualquer uma das células nos conídios.

O subgênero *Eu-Helminthosporium* foi classificado como *Bipolaris* e caracterizado por apresentar conídio curvado, germinação bipolar e a fase teleomórfica associada ao *Cochliobolus* (Shoemaker, 1959). *Cochliobolus* é a forma sexual tanto de *Bipolaris* quanto de *Curvularia*. O gênero *Curvularia* foi

criado tendo como característica a presença de um conídio fortemente curvado e células centrais mais curtas e escuras do que as demais células dos conídios.

No entanto, foi observado que o gênero *Bipolaris* ainda não estava bem definido, pois algumas espécies tinham um hilo protuberante, e outras não. Assim, Leonard e Suggs (1974) propuseram a criação de um novo gênero, o qual passou a se chamar *Exserohilum*. Este estudo também forneceu informações adicionais sobre o grupo conhecido, até então, como *Bipolaris* spp.

Os gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum* são fungos fitopatogênicos, causadores de mancha-foliar em culturas de importância agrícola, como o milho. Já foram relatados em vários países e possui uma variedade de hospedeiro associados a mais de 60 gêneros de plantas. A delimitação morfológica entre as espécies de ambos os gêneros é difícil devido à similaridade entre eles (Berbee et al., 1999; Manamgoda et al., 2012; Farr e Rossman, 2020).

2.2.1. Mancha de *Bipolaris*

Em 1970, uma nova raça, conhecida na época como *Cochliobolus heterostrophus* (syn. *Helminthosporium maydis* ou *B. maydis*), provoca a doença conhecida como macha de *Bipolaris*, helmintosporiose *maydis* ou *Southern leaf blight of corn* (SLBC). O patógeno foi detectado inicialmente na Flórida, o qual era capaz de infectar híbridos de milho portadores do citoplasma macho-estéril e, nessa época, a maioria dos híbridos produzidos tinham esterilidade masculina, portanto, eram suscetíveis ao patógeno (Bergamin Filho et al., 2018).

A disseminação nos EUA foi rápida e devastadora e, em dois meses, o patógeno já estava disseminado nos grandes estados produtores, causando prejuízos econômicos, uma perda próxima a 20 milhões de toneladas. Foi a partir de então que a mancha de *Bipolaris* ganhou importância (Bergamin Filho et al., 2018).

Os sintomas dependem do genótipo, das raças do fungo e, geralmente, são lesões pequenas marrons com formato elíptico no início (Manamgoda et al., 2014). A mancha de *Bipolaris*, cujo patógeno é o fungo *B. maydis*, está associada às doenças foliares com diferentes sintomas os quais dependem da raça e a ocorrência das raças em lavouras pode estar relacionada com a variedade de milho plantada (Wang et al., 2017).

As raças fisiológicas “C”, “O” e “T” já foram relatadas na cultura. As raças T (Texas) e C (Charruá) são patogênicas somente aos genótipos de milho com citoplasma macho-estéril T e C, respectivamente. “O” é a mais antiga e menos devastadora, causa lesões foliares em genótipos com qualquer tipo de citoplasma, inclusive o citoplasma macho-estéril. A raça “T” foi responsável pelo aumento da importância da doença, devido aos prejuízos nos EUA, em 1970 (Pereira, 2005; Bergamin Filho et al., 2018).

A doença é altamente destrutiva, principalmente em genótipos suscetíveis, e melhor se desenvolve em regiões de clima tropical e/ou temperado, quentes e úmidos (Camargo, 2018). É recomendado o controle genético para a doença e, além do mais, é necessário realizar um manejo adequado para minimizar os efeitos da doença (Gama et al., 1990; Kurosawa et al., 2018; Sharma et al., 2020).

2.2.2. Mancha de *Exserohilum*

Em 1972, nos Estados Unidos da América, foram identificados e isolados fungos em sementes de milho importados da Guatemala. Na ocasião, foi relatado que o fungo era semelhante à espécie conhecida como *B. rostratum*. Outras espécies foram isoladas de sementes e folhas de milho no Mississípi. Os novos isolados eram semelhantes, morfológicamente, à *Bipolaris*, entretanto, tinham um hilo proeminente. Essa é a característica que distingue isolados de *Exserohilum* de *Curvularia* ou *Bipolaris*. Foi então que o novo gênero e as novas espécies de *Exserohilum* foram propostas (Leonard e Suggs, 1974).

Na período, as seguintes novas espécies foram propostas: *Exserohilum rostratum* (Drechs), *E. holmii* (Luttrell), *E. pedicellatum* (Henry), *E. monoceras* (Drechs.), *E. frumentaceum* (Mitra), *E. turcicum*. Em 1974, então, *Exserohilum* passou a ser conhecido como um novo gênero de patógeno de plantas, e incluiu espécies que antes eram conhecidas como *Bipolaris spp.* A forma sexual *setosphaeria* está relacionada às diferentes espécies de *Exserohilum* (Leonard e Suggs, 1974, Hernández-Restrepo et al., 2020).

O patógeno *E. turcicum* provoca a doença conhecida como *northern leaf blight of corn* (NLBC), helmintosporiose comum ou macha de turcicum a qual prevalece e se desenvolve em ambientes de clima úmido com temperatura

moderada de ± 20 °C, com período de orvalho de no mínimo 5 horas (Nwanosike e Mabagala, 2017).

A espécie consegue sobreviver em restos culturais, principalmente da soja, e por isso pode se tornar uma fonte de inóculo em plantios posteriores (Montemarani et al., 2018). Os sintomas da doença são facilmente identificados nas folhas, as quais deixam o tecido infectado necrosado de coloração marrom. As lesões têm formato elíptico e alongado, no entanto, esses sintomas podem variar de acordo com o grau de resistência do hospedeiro (Nwanosike e Mabagala, 2017; Sharma et al., 2020).

Considerando que existam diferentes raças de *E. turcicum*, é indicado que o controle da doença ocorra por meio de resistência genética. Os genótipos escolhidos devem ser indicados para a região de cultivo e devem ter preferência ao uso de produtos químicos, pois o uso de produtos químicos pode favorecer o desenvolvimento de novas cepas resistentes na natureza. Isso se torna uma preocupação tanto para a saúde pública quanto para o meio ambiente (Sharma et al., 2020; Turgay et al., 2020).

2.3. Identificação e caracterização de fungos

Historicamente, a identificação das espécies fúngicas se sucedeu por meio da comparação de características morfológicas como a cor, forma e dimensão, porém, a instabilidade morfológica e a sobreposição de caracteres entre as diferentes espécies são pontos que dificultam a taxonomia morfológica (Pinho et al., 2016).

A identificação e caracterização de fungos fitopatogênicos com base apenas na morfologia gera equívoco na nomenclatura de alguns patógenos. Os gêneros *Bipolaris*, *Curvularia* e *Exserohilum* compartilham alguns caracteres em comum. Por isso, distingui-los baseando-se apenas na morfologia, podem ocasionar problemas e gerar resultados duvidosos. Dessa forma, para a identificação precisa da espécie, é necessária a combinação de análises morfológicas e moleculares (Manamgoda et al., 2014; Hernández-Restrepo et al., 2018).

Os fungos fitopatogênicos fazem parte de um grupo de organismos bem diversificado, tanto na morfologia quanto ao seu posicionamento filogenético

(Massola Júnior e Krugner, 2018). Para suprir as dificuldades encontradas nas análises taxonômicas por métodos tradicionais, surge a filogenia molecular, a qual permitiu resolver conflitos taxonômicos (Marin-Felix et al., 2017; Marin-Felix et al., 2019).

Técnica de eletroforese com base na separação de enzimas e isoenzimas foi, por muito tempo, a mais utilizada para identificação de algumas espécies de fungos (Leuchtmann et al., 1992; Zervakis et al., 1994). Porém, em razão das limitações da técnica, estudos para identificação de espécies são realizados por meio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que usam como marcadores ácidos nucleicos (Pinho et al., 2016; Marin-Felix et al., 2019).

2.4. Filogenia

A reconstrução da história evolutiva dos organismos é o foco de alguns pesquisadores desde os tempos de Darwin, quando o mesmo propôs o conceito de ancestralidade e relações filogenéticas. O pesquisador alemão Willi Hennig fundou a escola cladística, também conhecida como sistemática filogenética, a qual infere as relações evolutivas por meio de estudos morfológicos e genéticos dos organismos que compartilham alguma característica e é ilustrada por meio de uma árvore filogenética (Nei e Kumar, 2000; Ridley, 2006).

Por muito tempo, a filogenia foi baseada em caracteres morfológicos e em fósseis. Contudo, com o advento das técnicas biotecnológicas, passaram a ser baseados em dados moleculares, como as sequências ácidos nucleicos e aminoácidos. Dessa forma, é possível estudar com mais precisão as relações evolutivas dos organismos (Russo, 2001; Ridley, 2006).

Ao analisarmos as duas espécies com um caractere semelhante para entender sua história evolutiva, é preciso retroceder ao ancestral comum mais recente de ambas as espécies. Se esse ancestral tem o mesmo caráter, então o caráter das duas espécies descendentes é uma homologia, sendo semelhante por ascendência evolutiva. Se o ancestral não tem o referido caráter, é uma homoplasia, ou seja, o caráter evoluiu independentemente nas duas espécies (Ridley, 2006).

Em análise filogenética é considerada a similaridade entre os organismos estudados, assumindo que são homólogos, ou seja, compartilham um ancestral

comum. É importante destacar a diferença entre o termo homologia e similaridade. Homologia se trata de um dado qualitativo, já a similaridade pode ser quantificada. Assim, um determinado caráter é homólogo ou não. Por isso, expressão como 95% de homologia é incorreta, então, deve-se usar o conceito de 95% de similaridade (Lemey et al., 2009; Russo, 2001).

Em caracteres morfológicos, a causa principal da homoplasia é a evolução convergente, quando a mesma pressão seletiva atua em duas linhagens. Hennig (1966) relata que as semelhanças não podem ser usadas como evidências filogenéticas, pois essas semelhanças podem ser herdadas de forma não parental. A filogenia molecular estuda as relações evolutivas entre os organismos, porém, é baseada em dados moleculares – como sequências de DNA (Ridley, 2006).

Com a obtenção de uma grande quantidade de dados moleculares, surgem novas possibilidades para entender os processos evolucionários que os organismos sofreram (Caldart et al., 2016). Nesse aspecto, as sequências de DNA são usadas com frequência para identificar e delimitar quais os limites filogenéticos entre espécies e/ou gêneros (Marin-Felix et al., 2017).

2.5. Alinhamento de sequências

De uma perspectiva biológica, um alinhamento de sequências é uma hipótese sobre a homologia das sequências de nucleotídeos, assumindo que os resíduos alinhados divergiram de um estado ancestral comum (Lemey et al., 2009). Este é o primeiro e mais importante passo para a realização das análises filogenéticas, portanto, é essencial a comparação de regiões homólogas de boa qualidade. O alinhamento busca a homologia posicional entre bases para, posteriormente, possibilitar as análises de variações genéticas e estudo de suas relações evolutivas (Caldart et al., 2016).

As sequências se diferem apenas na porção correspondente à base nitrogenada (A – adenina; C – citosina, G – guanina T – timina), pois o açúcar e o grupo fosfato são os mesmos. Nessas moléculas, as mutações podem ocorrer ao acaso, e são limitadas às quatro bases nitrogenadas. Teoricamente, cada sítio evolui independente de qualquer outro sítio (Ridley, 2006).

O uso de um programa computacional é necessário para fazer o alinhamento e testar o maior número de possibilidades para, então, escolher aquela mais parcimoniosa, ou seja, aquela que requer o menor número de substituições entre as sequências. Existem algoritmos que realizam o processo de alinhamento múltiplo de sequências, dentre os quais temos o *Muscle (Multiple Sequence Alignment)*.

Os algoritmos realizam o alinhamento par-a-par das sequências, começando pelas mais similares até que todas estejam alinhadas (Caldart et al., 2016; Pinho et al., 2016). Um bom alinhamento é essencial para uma boa análise filogenética. Dessa forma, se o alinhamento não é confiável, a homologia encontrada também não será e dificilmente a filogenia produzida estará correta (Russo, 2001; Caldart et al., 2016).

2.6. Distância genética e modelo de substituição nucleotídica

O cálculo da distância genética é o primeiro passo nas análises das sequências de nucleotídeos. As sequências de DNA mudam no decorrer do tempo, em virtude de forças evolutivas que atuam sobre elas. Cada sequência pode evoluir independentemente, mesmo quando são oriundas de um ancestral comum (Lemey et al., 2009).

Os mecanismos de variabilidade genética - as mutações, duplicação de genes e recombinação - são responsáveis pelo polimorfismo existente e usados para inferir as relações filogenéticas (Caldart et al., 2016). As mutações podem ser por substituição, remoção, inserção e inversão. Em nível molecular, a mutação é uma mudança na sequência de nucleotídeos no DNA e corresponde a uma fonte primária da mudança evolutiva, pois novos alelos podem ser produzidos por mutação e transmitidos às sucessivas gerações (Nei e Kumar, 2000).

Para a construção da filogenia de um táxon através da sequência de nucleotídeos, é necessário construir uma matriz de dados baseados em modelos de substituição nucleotídica ou modelos evolutivos (Posada, 2009). Modelos de evolução são conjuntos de suposições sobre o processo de substituição de nucleotídeos.

O objetivo desses modelos é corrigir as distâncias observadas pela estimativa da quantidade de mudanças evolutivas. São descritas as diferentes probabilidades de mudança de um nucleotídeo para outro, ao longo do tempo, para assegurar na escolha entre diferentes hipóteses filogenéticas que melhor se adequam aos dados.

Existem diversos modelos desde os mais simples aos mais complexos, sendo a complexidade dada pelo aumento do número de parâmetros considerados nas análises. Dentre os modelos estão a “distância p”; o modelo Jukes Cantor; Kimura 2-parâmetros; o Tajima-Nei; HKY; e o modelo GTR. O modelo de substituição de “distância p” é o mais simples e representa a proporção de posições em que as duas sequências diferem. O modelo GTR é o mais complexo e admite seis diferentes parâmetros, ele considera as desigualdades na composição de nucleotídeos entre as sequências. Os parâmetros são as seis possibilidades de substituição entre as bases $A \leftrightarrow G$; $A \leftrightarrow C$; $A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$; $G \leftrightarrow T$; $C \leftrightarrow T$ (Caldart et al., 2016).

2.7. Métodos de reconstrução filogenia molecular

Após a escolha do modelo evolutivo, é necessário escolher um método de reconstrução filogenética que melhor se adequa aos dados disponíveis. Os métodos usados em análises filogenéticas são baseados em algoritmos, que buscam entre as suposições aquela que melhor representa o processo evolutivo dos organismos e descrevem as diferentes possibilidades de mudança de um nucleotídeo para o outro (Caldart et al., 2016; Pinho et al., 2016).

Os métodos podem ser baseados em matriz de distância que buscam reconstruir a topologia da árvore que melhor representa a matriz de distâncias entre os pares de táxons. Outro método é baseado em caracteres que são usados quando os nucleotídeos são analisados sítio a sítio (Nei e Kumar, 2000; Brocchieri, 2001).

Os métodos baseados em caracteres são: máxima parcimônia, máxima verossimilhança (*maximum likelihood*) e inferência bayesiana. A máxima parcimônia busca entre todas as árvores aquela que apresenta o menor número de mudanças ou passos evolutivos; a máxima verossimilhança calcula a probabilidade (verossimilhança) de observar os dados de sequências em todas as

topologias possíveis, então, aquela que apresentar a maior verossimilhança é considerada a melhor para estimar a história evolutiva daqueles organismos em estudo, por apresentarem menos erros de amostragem (Lemey et al., 2009). A inferência bayesiana, assim como a máxima verossimilhança, é um método probabilístico, que usa os dados da verossimilhança no cálculo da chamada probabilidade posteriori. A probabilidade posteriori ($\text{Prob}(H/D)$) compreende a probabilidade a priori de um modelo ($\text{Prob}(H)$) multiplicado pela verossimilhança dos dados sob este modelo ($\text{Prob}(D/H)$), dividido pelo somatório de todas as verossimilhanças de todos os modelos possíveis ($\text{Prob}(D)$), e o resultado permite a escolha da árvore com maior chance de estar correta (Huelsenbeck et al., 2001; Lemey et al., 2009). Desta forma, a árvore com maior probabilidade posteriori pode ser escolhida como a melhor estimativa de filogenia (Huelsenbeck et al., 2001).

O cálculo da ($\text{Prob}(D)$) era um empecilho para a utilização dessa metodologia, por demandar uma eficiência computacional impossível de alcançar devido ao número muito grande de dados, uma vez que leva em consideração todos os somatórios de todos os tamanhos de ramos e valores dos parâmetros para cada modelo evolutivo e suas combinações. A solução encontrada foi a utilização do método de amostragem Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) (Lemey et al., 2009)

Em sistemática filogenética, começou-se a pensar no uso da inferência bayesiana na década de 1990. Esse método é um conjunto de alterações realizadas no modelo, em que sua ideia central é realizar pequenas modificações (de topologia, tamanho dos ramos) de ordem aleatória e depois aceitá-las ou rejeitá-las, de acordo com a probabilidade. Se a probabilidade aumentar após as alterações, um novo estado é aceito, até que não ocorram mais alterações significativas (Lemey et al., 2009).

2.8 Filogenia do gênero *Bipolaris*

Para os gêneros *Bipolaris* e *Curvularia*, embora as morfologias assexuadas se agrupem em dois grupos bem definidos com base em dados moleculares e morfológicos, suas morfologias sexuais são semelhantes, sugerindo, então, que os estados assexuados evoluíram e se diferenciaram mais rápido do que as

morfologias sexuais (Manamgoda et al., 2012). No gênero *Bipolaris*, a fase assexual é frequentemente encontrada na natureza, por isso há uma tendência em usar o nome *Bipolaris* em detrimento de *Cochliobolus* (Rossman et al., 2013).

Berbee et al. (1999) analisaram as relações filogenéticas de espécies altamente virulentas em campo, relacionadas à *Cochliobolus*, baseados nas regiões de ITS (*internal transcribed spacers*) e GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*).

As relações entre *Cochliobolus*, *Bipolaris* e *Curvularia* foram verificadas por meio de análises filogenéticas. Nesse trabalho, houve a separação em dois grupos. O grupo 1 incluiu espécies de *Cochliobolus* e *Bipolaris*, as quais são altamente patogênicas em plantas, incluindo *C. heterostrophus*. No grupo 2, estavam algumas espécies de *Cochliobolus* que foram transferidas para o gênero *Pseudocochliobolus*. Neste segundo grupo havia espécies de *Curvularia* e *Bipolaris* sem estados sexuais conhecidos. Análises filogenéticas de hospedeiros e patógenos permitiram inferir se houve uma coevolução dos fungos, resultando em fungos que infectam diversas plantas ou grupo de plantas hospedeiras (Berbee et al., 1999).

Manamgoda et al., (2012) também estudaram o complexo *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia*, e as espécies ficaram também divididas em dois grupos. No grupo 1, ficaram agrupados *Bipolaris* e *Cochliobolus* juntamente com suas espécies tipos, sendo que essas espécies exibiram características morfológicas semelhantes à *B. maydis*, e todas as espécies identificadas neste grupo foram altamente patogênicas em culturas de valor econômico, como em milho e arroz infectados principalmente por *B. maydis* e *B. oryza*, respectivamente. No grupo 2, ficaram classificadas as espécies de *Curvularia* semelhantes morfológicamente à *Curvularia lunata*. Neste grupo, estão algumas espécies anteriormente denominadas *Bipolaris*, *Cochliobolus* e *Curvularia*. Como resultados deste trabalho, algumas espécies que eram classificadas como *Bipolaris* foram transferidas para *Curvularia*. A exemplo: *B. australiensis*, *B. coicis*, *B. ellisii*, *B. graminicola*, *B. hawaiiensis*, *B. ovariicola*, *B. ravenelii*, *B. spicifera*, *B. perotidis* e *B. tripogonis*.

Manamgoda et al. (2014) reconstruíram a filogenia molecular do gênero *Bipolaris* por meio de sequências dos genes ITS, LSU e GPDH, e indicaram que GPDH é o melhor marcador filogenético para este gênero. Os autores mostraram,

ainda, a importância dos dados moleculares e como são essenciais para uma identificação precisa das espécies dentro desse gênero. Por meio deste estudo, é fornecido à comunidade científica um recurso para identificação de espécies e sua distribuição geográfica.

Marin-Felix et al. (2017), por sua vez, analisaram 21 gêneros de fungos fitopatogênicos. Os autores fornecem uma ferramenta para a taxonomia de alguns gêneros de fungos fitopatogênicos, entre os quais estão *Bipolaris*. Para cada gênero é fornecida a descrição morfológica, patologia, distribuição, hospedeiro e sintomatologia de doença.

2.9. Filogenia do gênero *Exserohilum*

O gênero *Exserohilum* é um importante grupo de fungos patogênicos em plantas, principalmente as monocotiledôneas. Apesar disso, a filogenia do gênero foi revisada apenas há pouco tempo (Hernández-Restrepo et al., 2018). As espécies em *Exserohilum* são morfológicamente muito variáveis, por isso a análise molecular é necessária para uma correta identificação das espécies (Marin-Felix, et al., 2019).

Para esse gênero, assim como para outras espécies de fungos, o uso de análise filogenética multilocus é altamente recomendado (Marin-Felix et al., 2019). A filogenia do gênero foi revisada por Hernández-Restrepo et al. (2018) com base em nove *loci*: ITS, LSU, act, tub2, cam, gapdh, his, tef1 and rpb2 combinados com dados morfológicos e, assim, os autores conseguiram definir limites para os gêneros: *Exserohilum*, *Pyrenophora*, *Porocercospora*, *Bipolaris* e *Curvularia*, reagrupando algumas espécies quando necessárias. O estudo definiu onze espécies conhecidas para o gênero *E. monoceras*, *E. oryzicola*, *E. pedicellatum*, *E. turcicum*, *E. corniculatum*, *E. holmii*, *E. khartoumensis*, *E. minor*, *E. neoregeliae*, *E. protrudens* e *E. rostratum*.

A região GAPDH conseguiu resolver a maioria dos conflitos filogenéticos existentes, mas como o estudo com esse enfoque ainda é recente, a filogenia ainda não foi bem resolvida. Por isso, é recomendada uma amostragem maior de espécies, assim como a inclusão de dados adicionais como compostos químicos, ecologia e gama de hospedeiros para as espécies (Hernández-Restrepo et al., 2018).

3. TRABALHOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E PATOGÊNICA DE *BIPOLARIS* EM LINHAGENS DE MILHO-PIPOCA

RESUMO

O gênero *Bipolaris* é conhecido por provocar doenças em culturas de importância agrícola e a espécie *B. maydis* é agente causal da mancha de *Bipolaris*. Neste trabalho, objetivou-se estudar a diversidade e a patogenicidade de espécies de *Bipolaris* associados à mancha-foliar no Brasil. Para tal, foram isolados e identificados fungos presentes em lavouras de milho em seis Estados brasileiros; realizada a caracterização morfológica e molecular dos isolados; estimado o potencial de linhagens de milho-pipoca quanto à resistência ao patógeno, e a caracterização patológica dos isolados em diferentes linhagens de milho-pipoca. Amostras de folhas com sintomas de *Bipolaris* foram coletadas para o isolamento direto do patógeno. As características morfológicas avaliadas foram o crescimento micelial, coloração da colônia e dimensões dos conídios. A caracterização molecular foi baseada nas análises multigênicas (ITS e GAPDH) via inferência bayesiana. Em campo, sob condições de inoculação natural, foram avaliadas 35 linhagens de milho-pipoca quanto à resistência à mancha de *Bipolaris*. Em condições controladas, a caracterização patológica dos isolados foi avaliada em linhagens de milho-pipoca, previamente caracterizadas como resistente e suscetível. Onze isolados de *Bipolaris* foram identificados em lavouras de milho

no Brasil. As análises morfológicas não foram capazes de agrupar os isolados de acordo com a espécie ou local de coleta. Baseado em análises moleculares, duas espécies de *Bipolaris* foram identificadas infectando o milho. A espécie *B. maydis* foi coletada em cultivos de milho nos Estados de Alagoas, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro e Tocantins. Já *B. gossypina* foi isolada apenas no Estado do Mato Grosso. Houve diferença na performance das linhagens em relação ao progresso da doença, onde, de 35 linhagens avaliadas em campo, três delas foram selecionadas como contrastantes: a linhagem L623 como fonte de resistência e, as linhagens L51 e L692, suscetíveis à doença. Em condições controladas, não foram observadas diferenças patológicas entre os isolados inoculados. Nas condições estudadas, a linhagem L623 é a mais resistente. A espécie *B. maydis* está presente em lavouras pelo Brasil. Em condições controladas, todos os isolados testados causaram doença nas linhagens de milho-pipoca avaliadas. O fungo *B. gossypina* foi coletado apenas no Estado do Mato Grosso. Este é o primeiro relato da espécie em milho no Brasil. A combinação de dados morfológicos, moleculares e patológicos são essenciais e podem ser usados para determinar os patógenos encontrados em cada região.

Palavras-chave: Caracterização molecular; Fungos fitopatogênicos; Mancha-foliar.

ABSTRACT

The genus *Bipolaris* are known to cause diseases in crops of agricultural importance and one species *B. maydis* is the causal agent of Bipolaris spot. This work aimed to study the diversity and pathogenicity of *Bipolaris* species associated with leaf spot in Brazil. For this purpose, fungi present in maize crops in six Brazilian states were marked and identified; performed the morphological and molecular characterization of the candidates; estimated the potential of popcorn lines for resistance to the pathogen, and the pathological characterization of concessions in different popcorn lines. Leaf samples with symptoms of Bipolaris were collected for direct isolation of the pathogen. The morphological characteristics evaluated were mycelial growth, colony color and conidia dimensions. Molecular characterization was based on multigene analyzes (ITS and GAPDH) via Bayesian inference. In the field, under natural inoculation conditions, 35 popcorn lines were

evaluat for resistance to *Bipolaris* spot. Under controlled conditions, the pathological characterization of the concessions was evaluate in popcorn lines, previously characterized as resistant and susceptible. Eleven coverings of *Bipolaris* were identify in maize crops in Brazil. Morphological analyzes were not able to group them according to species or place of collection. Based on molecular analysis, two species of *Bipolaris* were identify infecting corn. The species *B. maydis* was collect from maize crops in the states of Alagoas, Espirito Santo, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro and Tocantins. *B. gossypina* was isolated only in the State of Mato Grosso. There was a difference in the performance of the strains in relation to the progress of the disease, where, of 35 strains evaluated in the field, three of them were select as contrasting: the strain L623 as a source of resistance and the strains L51 and L692 susceptible to the disease. Under certain conditions, no pathological differences were observ between the inoculated grantees. Under the conditions studied, the L623 strain is the most resistant. A *B. maydis* species is present in crops throughout Brazil. Under controlled conditions, all tested participants caused the disease in the popcorn-inbred lines evaluated. The fungus *B. gossypina* was collect only in the State of Mato Grosso. This is the first report of the species in corn in Brazil. The combination of morphological, molecular and pathological data is essential and can used to determine the pathogens found in each region.

Keywords: Molecular characterization; Phytopathogenic fungi; Leaf spot.

INTRODUÇÃO

O milho-pipoca (*Zea mays var. everta* (Sturtev.) L.H. Bailey) é um tipo especial de milho cujas características são grãos pequenos, duros, de cores variadas e, quando aquecidos, têm capacidade de estourar e expandir, transformando-o em pipoca (Sweley et al., 2013). O consumo é bem apreciado no Brasil, mas as informações a respeito da cadeia produtiva no país ainda são escassas. Os Estados brasileiros que se destacam como produtores são o Mato grosso e o Rio Grande do Sul (Kist, 2019).

A cultura do milho-pipoca é acometida pelas mesmas doenças que ocorrem no milho comum, apresentando alta suscetibilidade, principalmente às

doenças foliares. As principais doenças foliares na cultura são ferrugem, mancha de *Bipolaris* e mancha de *Turcicum* que afetam o rendimento e a qualidade do grão (Arnhold, 2008; Santos et al., 2020). Dentre essas, a mancha de *Bipolaris*, ocasionada por *Bipolaris maydis* (Nisik e Miyake) tem sido alvo de estudos visando ao melhoramento da cultura para a resistência ao patógeno (Saluci et al., 2020).

O patógeno se desenvolve em condições de alta umidade e temperaturas variando de 20 °C a 32 °C. A espécie *B. maydis* é relatada, principalmente, nas Américas e Ásia (Bruns, 2017; Farr e Rossman, 2020). No Brasil, a ocorrência da distribuição do patógeno não é conhecida e as pesquisas com essa abordagem são escassas.

Os sintomas da mancha de *Bipolaris* são geralmente lesões marrons, às vezes, com coloração arroxeadada e margem marrom-avermelhada, que ocasionalmente coalescem e se tornam cinzas, formato elíptico no início e depois alongado longitudinalmente com tamanhos variados, sendo que os sintomas dependem do genótipo, das raças do patógeno e da resistência no hospedeiro (Sun et al., 2020).

A doença interfere nos atributos agronômicos da planta, como altura, número de grãos/espiga e rendimento da cultura. Os prejuízos causados pela ocorrência de *B. maydis* em milho comum podem chegar a até 80%. O dano oscila em função do grau de resistência, estádios fisiológicos do hospedeiro, patogenicidade e/ou condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Altaf et al., 2016; Hussain et al., 2016). Em milho-pipoca não há informações dos prejuízos causados. Sabe-se que a cultura é extremamente suscetível à *B. maydis*, o que compromete a produção e prejudica o potencial do agronegócio vinculado à cultura.

Existem outras espécies do gênero que causam doença na cultura no milho, como *B. zea* e *B. zeicola* (Shoemaker, 1959). Por isso é necessário realizar a identificação correta das espécies de *Bipolaris* para estabelecer medidas de controle eficientes e realizar o manejo correto da doença. Para o gênero *Bipolaris* é interessante a combinação dos resultados morfológicos e moleculares para identificar espécies (Berbee et al., 1999; Manamgoda et al., 2014). É interessante, também, realizar pesquisas relacionadas à patogenicidade e à distribuição geográfica, além de estudos que busquem tanto a caracterização

do patógeno quanto a do hospedeiro, para fornecer um suporte aos programas de melhoramento que visem resistência à doença.

Diante do exposto, neste trabalho, objetivou-se estudar a diversidade e a patogenicidade de espécies de *Bipolaris* associadas à mancha-foliar no Brasil. Para tal, foram isolados e identificados fungos presentes em lavouras de milho em seis Estados brasileiros; realizada a caracterização morfológica e molecular dos isolados; estimado o potencial de linhagens de milho-pipoca quanto à resistência ao patógeno e a caracterização patológica dos isolados em diferentes linhagens de milho-pipoca.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e manutenção dos isolados

Amostras de folhas com sintomas de *Bipolaris* foram coletadas em lavouras de milho nos Estados de Alagoas, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro e Tocantins, e identificadas de acordo com a procedência e hospedeiro. O material vegetal foi encaminhado à Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF para isolamento do patógeno, caracterização, manutenção das culturas e armazenamento.

O isolamento dos fungos foi realizado pelo método direto, como descrito por Alfenas et al. (2016), que consiste em focalizar, com auxílio de um microscópio estereoscópico, as estruturas do patógeno em amostras de folhas com sintomas, e transferir conídios e/ou conidióforos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Posteriormente, com as colônias em crescimento, foram obtidas culturas puras a partir de repicagem de pontas de hifas. As placas foram mantidas em câmara de germinação tipo “BOD”, em temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h de luz até o crescimento e/ou esporulação. Cada isolado foi armazenado em água destilada esterilizada (Castellani, 1939) e em freezer a - 18 °C.

Caracterização morfológica dos isolados

Para a caracterização morfológica dos isolados de *Bipolaris*, discos de 6 mm de diâmetro das colônias purificadas foram depositados no centro da placa de Petri, contendo o meio de cultura BDA, e incubados em BOD a ± 25 °C, em regime 12h luz.

Após os 14 dias de incubação, cada colônia foi avaliada quanto à coloração predominante, ao aspecto do micélio e à forma da borda. O crescimento micelial foi obtido diariamente pela medição do diâmetro das colônias em duas direções ortogonais, obtendo-se a média de quatro repetições por isolado. O crescimento foi avaliado até o momento em que um dos isolados alcançou a borda da placa. Foram feitas quatro repetições/isolado, considerando cada placa de Petri (diâmetro de 90 mm) uma repetição, com delineamento inteiramente casualizado (DIC).

O índice de velocidade média de crescimento do fungo – IVCM (cm/dia) foi determinado conforme a fórmula:

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

Sendo: D: o diâmetro médio da colônia no dia da medição; Da: o diâmetro médio da colônia no dia anterior; e, N: número de dias após a incubação.

As características micromorfológicas dos conídios (comprimento, largura e número de septos) foram mensuradas a partir da medição aleatória de 30 conídios/isolado sob microscópio Nikon E-400 equipado com uma câmera digital.

Os dados foram testados quanto à normalidade de resíduos pelo teste Shapiro-Wilk, e homogeneidade de variâncias através do teste de Oneill e Mathews ($p < 0,05$). As variáveis que não atenderam aos pressupostos para análise de variância foram transformadas via aplicação da equação de Box e Cox (Box e Cox, 1964). Posteriormente, após as pressuposições serem atendidas, os dados foram submetidos novamente à análise de variância e as médias agrupadas pelo algoritmo de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2014) do programa R (R Core Team, 2016).

Caracterização molecular:

Extração de DNA e sequenciamento

O DNA genômico dos fungos foi obtido de acordo com o protocolo de extração descrito por Pinho et al. (2013), utilizando o kit comercial da Promega (*WizardGenomic DNA Purification Kit*). A quantificação ocorreu utilizando fluorimetria (Qubit®) de acordo com recomendações do fabricante. Após a extração e quantificação, o DNA permaneceu armazenado a -18°C até sua utilização.

A PCR (*polymerase chain reaction*) das regiões espaçador interno transcrito (*internal transcribed spacers - ITS*) e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase - GPDH*) foram amplificadas usando *primer* e condições já estabelecidas para o gênero (Manamgoda et al., 2012).

Os *primers* usados para região de ITS foram ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Glass e Donaldson, 1995). O termociclador foi programado para desnaturação inicial por três minutos a 95°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C - desnaturação, 30 segundos a 55°C - anelamento; um minuto a 72°C - extensão; e a extensão final por período de 10 minutos a 72°C.

Para a região GPDH utilizaram-se os *primers* GPD1 5'-CAA CGGCTTCGGTCGCATTG-3' e GPDH2 5' – GCCAAGCAGTTG GTTGTG C –3' (Berbee et al., 1999), nas condições: desnaturação inicial por dois minutos a 96°C; 30 ciclos de um minuto a 94°C – desnaturação, um minuto a 52°C – anelamento, 45 segundos a 72°C – extensão; e a extensão final por período de dez minutos a 72°C.

Os fragmentos de DNA foram amplificados no termociclador (Veriti® *Thermal Cycler*). Cada reação continha: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1.0 U de Taq polimerase, 0,2 µM de *primers*, 0.2 mM de cada dNTP, 1.0 mM de MgCl₂, com o volume final de 25 µl. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA *Ladder*, RTU modelo K9-100 L.

Os produtos da PCR ficaram incubados em um termobloco por duas horas a 60°C até a completa secagem, e então, encaminhada para a empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil), onde se realizou a purificação e o sequenciamento.

As sequências de nucleotídeos foram editadas e corrigidas manualmente, quando necessárias, com auxílio do *software* DNA *Dragon* (Hepperle, 2011). O arranjo dos nucleotídeos, em posições ambíguas, também foi corrigido utilizando as sequências dos *primers* no sentido 5'-3' e 3'-5'. Para identificação dos isolados, foram obtidas sequências das regiões de ITS e GAPDH, oriundos de artigos científicos e depositados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As análises aqui conduzidas foram baseadas em trabalhos anteriores para o gênero *Bipolaris* (Tabela 1).

Filogenia molecular

As sequências consenso dos isolados foram comparadas com as obtidas no banco de dados do GenBank, para fazer uma primeira identificação molecular por meio da ferramenta de pesquisa e alinhamento BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al., 1990). Posteriormente, foram adicionadas ao conjunto de sequências obtidas no Genbank e exportadas para o *software* MEGA v. 7 (Nei e Kumar, 2000), onde foram alinhadas por meio da ferramenta MUSCLE® (Edgar, 2004).

Tabela 1. Números de acesso do GenBank de sequências de DNA das espécies de *Bipolaris*

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Local	ITS	GPDH	Referencia
<i>B. austrostipae</i>	BRIP 12490*	<i>Austrostipa verticillata</i>	Australia	KX452442	KX452408	Tan et al. (2016)
<i>B. axonopicola</i>	BRIP 11740*	<i>Axonopus fissifolius</i>	Australia	KX452443	KX452409	Tan et al. (2016)
<i>B. bamagaensis</i>	BRIP 15934	<i>Dactyloctenium aegyptium</i>	Australia	KX452447	KX452413	Tan et al. (2016)
<i>B. bamagaensis</i>	BRIP 13577*	<i>Brachiaria subquadripa</i>	Australia	KX452445	KX452411	Tan et al. (2016)
<i>B. bicolor</i>	CPC 28811	<i>Eleusine indica</i>	Tailândia	MF490804	MF490826	Marin-Felix, Y. et al. (2017)
	CBS 690.96	-	-	KJ909762	KM042893	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. chloridis</i>	CBS 242.77	<i>Chloris gayana</i>	Australia	JN192372	JN600961	Manamgoda et al. (2011)
	BRIP 10965*	<i>Chloris gayana</i>	Australia	KJ415523	KJ415423	Tan et al. (2014)
<i>B. clavata</i>	BRIP 12530*	<i>Dactyloctenium radulan</i>	Australia	KJ415524	KJ415422	Tan et al. (2014)
<i>B. coffeana</i>	M 1130	<i>Buchloe dactyloides</i>	EUA	KM230387	KM034835	Manamgoda et al. (2014)
	BRIP 14845*	<i>Coffea arábica</i>	Quênia	KJ415525	KJ415421	Tan et al. (2014)
<i>B. cynodontis</i>	CBS 109894	<i>Cynodon dactylon</i>	Hungria	KJ909767	KM034838	Manamgoda et al. (2014)
	ICMP 6128	<i>Cynodon dactylon</i>	Nova Zelândia	JX256412	JX276427	Manamgoda et al. (2012)
<i>B. gossypina</i>	BRIP 14840*	<i>Gossypium sp.</i>	Quênia	KJ415528	KJ415418	Tan et al. (2014)
<i>B. gossypina</i>	CF/UENF 482	<i>Zea mays</i>	Centro-oeste (BR)	MZ452610	MZ556951	Este estudo
<i>B. heliconiae</i>	BRIP 17189	<i>Heliconia chartacea</i>	Australia	KJ415529	KJ415416	Tan et al. (2014)
	BRIP 17186*	<i>Heliconia psittacorum</i>	Australia	KJ415530	KJ415417	Tan et al. (2014)
<i>B. heveae</i>	CBS 241.92	<i>Hevea sp.</i>	Nigeria	KJ909763	KM034843	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. luttrellii</i>	14643-1*	<i>Dactyloctenium aegyptium</i>	EUA	AF071350	AF081402	Berbee et al. (1999)
<i>B. maydis</i>	M 1122/ C4	<i>Zea mays</i>	EUA	KM230389	KM034847	Manamgoda et al. (2014)
	CBS 137271/ C5*	<i>Zea mays</i>	Nova Iorque	AF071325	AF081380	Berbee et al. (1999)
	AR 5182	<i>Sorghum bicolor</i>	Japão	KM230388	KM034844	Manamgoda et al. (2014)
	AR 5183	<i>Sorghum bicolor</i>	Japão	KM230390	KM034848	Manamgoda et al. (2014)
	CBS 13629.2	<i>Zea mays</i>	Japão	HF934926	HG779086	Tan et al. (2014)
	CBS 307.64	<i>Zea mays</i>	EUA	HF934925	HG779085	Amaradasa et al., 2014
	CBS 136291	<i>Zea mays</i>	Japão	KJ909769	KM034845	Manamgoda et al. (2014)
	CPC 28823	<i>Saccharum officinarum</i>	Tailândia	MF490808	MF490830	Marin-Felix, Y. et al. (2017)
	CF/UENF 475	<i>Zea mays</i>	Tocantins (BR)	MZ452606	MZ556947	Este estudo
	CF/UENF 477	<i>Zea mays</i>	Pará (BR)	MZ452607	MZ556948	Este estudo
	CF/UENF 479	<i>Zea mays</i>	Alagoas (BR)	MZ452608	MZ556949	Este estudo
	CF/UENF 481	<i>Zea mays</i>	Mato Grosso (BR)	MZ452609	MZ556950	Este estudo
	CF/UENF 492	<i>Zea mays</i>	Espírito Santo (BR)	MZ452611	MZ556952	Este estudo
	CF/UENF 496	<i>Zea mays</i>	Espírito Santo (BR)	MZ452612	MZ556953	Este estudo
	CF/UENF 501	<i>Zea mays</i>	Rio de Janeiro (BR)	MZ452613	MZ556954	Este estudo

	CF/UENF 502	<i>Zea mays</i>	Rio de Janeiro (BR)	MZ452614	MZ556955	Este estudo
	CF/UENF 503	<i>Zea mays</i>	Rio de Janeiro (BR)	MZ452615	MZ556956	Este estudo
	CF/UENF 508	<i>Zea mays</i>	Rio de Janeiro (BR)	MZ452616	MZ556957	Este estudo
<i>B. microlaenae</i>	CBS 28091*	<i>Microlaena stipoides</i>	Australia	JN601032	JN600974	Manamgoda et al. (2011)
<i>B. microstegii</i>	CBS 132550	<i>Microstegium vimineum</i>	EUA	JX089579	JX089575	Crous et al., 2012
<i>B. oryzae</i>	MFLUCC100715*	<i>Oryza sativa</i>	Tailândia	JX256416	JX276430	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. panici-miliacei</i>	BRIP 12282	<i>Panicum miliaceum</i>	Japão	KJ415531	KJ415415	Tan et al. (2014)
	CBS 199.29*	<i>Panicum miliaceum</i>	Japão	KJ909773	KM042896	Manamgoda et al. (2012)
<i>B. peregianensis</i>	BRIP 12970*	<i>Cynodon dactylon</i>	Australia	JN601034	JN600977	Manamgoda et al. (2014)
	DAOM 221998	<i>Cynodon dactylon</i>	Australia	KJ922393	KM034849	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. sacchari</i>	ICMP 6227	<i>Oplismenus undulatifolius</i>	N Zelândia	KJ922386	KM034842	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. saccharicola</i>	CBS 325.64	-	-	KY905675	KY905687	Marin-Felix, Y. et al. (2017)
	CBS 155.26*	-	-	KY905674	KY905686	Marin-Felix, Y. et al. (2017)
<i>B. secalis</i>	BRIP 14453	<i>Secale cereale</i>	Argentina	KJ415537	KJ415409	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. setariae</i>	CPC 28802	<i>Imperata cylindrica</i>	Tailândia	MF490811	MF490833	Marin-Felix, Y. et al. (2017)
	CBS 141.31	-	-	EF452444	EF513206	Andrie et al., 2007
<i>B. shoemakeri</i>	BRIP 15929*	<i>Ischaemum rugosum</i>	Australia	KX452453	KX452419	Manamgoda et al. (2014)
	BRIP 15806	<i>Ischaemum rugosum</i>	Australia	KX452452	KX452418	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. simmondsii</i>	BRIP 12030*	<i>Zoysia macranta</i>	Australia	KX452454	KX452420	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. sivanesianiana</i>	BRIP 15822	<i>Paspalidium distans</i>	Australia	KX452456	KX452422	Manamgoda et al. (2014)
	BRIP 15847*	<i>Paspalidium distans</i>	Australia	KX452455	KX452421	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. subramanianii</i>	BRIP 16226*	<i>Setaria sphacelata</i>	Australia	KX452457	KX452423	Tan et al. (2016)
<i>B. variabilis</i>	CBS 127736	<i>Pennisetum clandestinum</i>	Brasil	KY905677	KY905689	Marin-Felix et al. (2017)
	CBS 127716*	<i>Pennisetum clandestinum</i>	Argentina	KY905676	KY905688	Marin-Felix et al. (2017)
<i>B. victoriae</i>	CBS 327.64*	<i>Avena sativa</i>	EUA	KJ909778	KM034811	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. woodii</i>	BRIP 12239*	<i>Paspalidium caespitosum</i>	Australia	KX452458	KX452424	Tan et al. (2016)
<i>B. yamadae</i>	CBS 127087	<i>Euphorbia sp</i>	Brasil	KY905673	KY905685	Manamgoda et al. (2014)
	CBS 202.29*	<i>Panicum miliaceum</i>	Japão	KJ909779	KM034830	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. zeae</i>	BRIP 11512*	<i>Zea mays</i>	Australia	KJ415538	KJ415408	Tan et al. (2016)
	DAOM 211267	<i>Triticum sp.</i>	Canada	KJ909787	KM034818	Manamgoda et al. (2014)
<i>B. zeicola</i>	AR 5166	<i>Sorghum sp.</i>	EUA	KJ909788	KM034813	Manamgoda et al. (2014)
	FIP 532*	<i>Zea mays</i>	EUA	KM230398	KM034815	Manamgoda et al. (2014)

ITS = internal transcribed spacer; GPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito. CF/UENF = Coleção da Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. *espécie tipo

Os modelos de substituição nucleotídica para a análise filogenética foram calculados independentemente para cada região e também para a concatenada (ITS, GAPDH e ITS+GAPDH), usando o *MrModeltest* (Posada e Buckley, 2004) e selecionados de acordo com *Akaike Information Criterion* (AIC) implementado no PAUP v. 4.0b10.

A análise filogenética para cada gene e a concatenada foi gerada por meio da inferência bayesiana, usando o método de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). Duas análises simultâneas, cada uma composta por quatro cadeias MCMC, foram conduzidas iniciando as árvores aleatoriamente até 10^7 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações, resultando em 10.000 árvores e descartadas da análise as primeiras 2500. O valor de probabilidade posteriori (Rannala e Yang, 1996) da árvore consenso foi calculado baseado nas 7500 árvores restantes.

A convergência dos logs de verossimilhança foi analisada com o *software* TRACER v. 1.4.1 (Rambaut e Drummond 2013). A árvore foi visualizada no *software* FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2009) e exportada para um programa editor de imagem. A espécie *Curvularia lunata* CBS 730.96 foi utilizada como grupo externo (*outgroup*) nas análises. A análise final concatenada da inferência bayesiana para o gênero *Bipolaris* foi gerada na plataforma CIPRES *Science Gateway* (Miller et al., 2010).

Caracterização patológica

Ensaio de campo para selecionar os contrastes de linhagens de milho-pipoca

O experimento foi instalado em dezembro de 2018 na área experimental do Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes, situado na Região Norte do Estado do Rio de Janeiro, a 21° 45' latitude 41° 20' longitude e altitude de 11 m. Foram avaliadas 35 linhagens endogâmicas de milho-pipoca, em geração S₇, de diferentes genealogias adaptadas ao clima tropical e temperado (Tabela 2).

Tabela 2. Linhagens endogâmicas de milho-pipoca avaliadas para selecionar as linhagens contrastantes.

Linhagens	População de Origem	Adaptação climática	Instituição de Origem
L203	IAC 125	Temperado/ Tropical	IAC
L204	IAC 125	Temperado/ Tropical	IAC
L261	PARA 172	Temperado	CIMMYT
L262	PARA 172	Temperado	CIMMYT
L263	PARA 172	Temperado	CIMMYT
L265	PARA 172	Temperado	CIMMYT
L266	PARA 172	Temperado	CIMMYT
L270	PARA 172	Temperado	CIMMYT
L292	URUG 298	Temperado	CIMMYT
L293	URUG 298	Temperado	CIMMYT
L294	URUG 298	Temperado	CIMMYT
L363	PR 023	Tropical	UEM
L476	SE 013	Tropical	UEM
L477	SE 013	Tropical	UEM
L509	PA 170 Roxo	Temperado/ Tropical	CIMMYT
L51	Beija-flor	Temperado/ Tropical	UFV
L55	Beija-flor	Temperado/ Tropical	UFV
L623	PA 091	Temperado/ Tropical	UEM
L624	PA 091	Temperado/ Tropical	UEM
L682	UENF 14	Tropical	UENF
L683	UENF 14	Tropical	UENF
L685	UENF 14	Tropical	UENF
L686	UENF 14	Tropical	UENF
L688	UENF 14	Tropical	UENF
L689	UENF 14	Tropical	UENF
L691	UENF 14	Tropical	UENF
L692	UENF 14	Tropical	UENF
L693	UENF 14	Tropical	UENF
L695	UENF 14	Tropical	UENF
L70	BRS-Angela	Tropical	EMBRAPA
L71	BRS-Angela	Tropical	EMBRAPA
L76	Viçosa	Temperado/ Tropical	UFV
P2	Composto CMS-42	Temperado/ Tropical	EMBRAPA
P3	Composto CMS-42	Temperado/ Tropical	EMBRAPA
P4	Raças Sul-americanas	Temperado/ Tropical	IAC - Brasil

A temperatura média do ar no período do experimento foi de 27°C e a umidade relativa média de 72%. O solo foi preparado mecanicamente com gradagem seguida de sulcagem. Os tratos culturais como adubação, irrigação e controle do mato foram realizados na área. A adubação foi realizada baseada na análise prévia do solo. A adubação de plantio com 80g/m de NPK (04-14-08); aos 30 dias ocorreu a adubação de cobertura com 30 g/m de NPK (20-00-20) e aos 40 dias 20 g/m de Ureia (45-00-00); a irrigação foi por aspersão, a cada dois dias; o controle de plantas daninhas foi realizado com capina manual, aos 25 dias após o plantio e, posteriormente, ocorreu o controle do mato com roçadeira.

A semeadura foi realizada manualmente com espaçamento de 0,2 m entre plantas e 0,90 m entre fileiras, resultando em densidade aproximada de 55.555 plantas/hectare. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições. Cada unidade experimental foi constituída por três fileiras de 2 m de comprimento cada.

A doença se manifestou através de infecção natural, uma vez que a área possui histórico de plantios sucessíveis de milho e ocorrência da doença em questão (Kurosawa et al., 2018). O desempenho das linhagens quanto à resistência a *B. maydis* foi avaliado monitorando-se a incidência e a severidade da doença nas plantas. As avaliações foram no décimo quinto e no trigésimo dia após o início do florescimento – período no qual a ocorrência da doença é favorecida. Para a área útil para essa avaliação foram consideradas as cinco plantas centrais de cada unidade experimental.

A incidência de *B. maydis* na planta (IBP), representada pelo número de folhas com sintomas, foi obtida por meio da expressão:

$$\frac{n. \text{ de folhas com sintomas}}{n. \text{ de folhas totais}} \times 100$$

A severidade de *B. maydis* na folha (SBF) foi representada pela área lesionada na folha anexa à primeira espiga. A SBF foi avaliada visualmente, com auxílio da escala diagramática (Figura 1), onde o intervalo de severidade é expresso em 0%; 1%; 5%; 25% e 50% de área foliar lesionada (James, 1971).



Figura 1. Representação diagramática para avaliação de severidade de *Bipolaris maydis* em folhas de milho. Fonte: James, 1971.

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias pelo teste Shapiro-Wilk, e homogeneidade pelo teste Oneill e Mathews ($p < 0,05$). Atendidos os pressupostos, realizou-se a análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p < 0,05$).

Para a análise de variância foi considerado o modelo em parcelas subdivididas no tempo (genótipos na parcela e tempo de avaliação na subparcela). Quando identificada a existência de diferenças significativas pelo teste F, as médias foram agrupadas pelo algoritmo de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote *ExpDes.pt* (Ferreira et al., 2014) do programa R (R Core Team, 2016). O modelo matemático empregado foi:

$$Y_{ijk} = m + A_i + e_{aik} + B_j + (AB)_{ij} + B_k + e_{bjk},$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado no i -ésimo tratamento, k -ésimo bloco e j -ésima subparcela; m é uma constante; A_i é o efeito do i -ésimo fator A; e_{aik} o resíduo (a) da parcela; B_j é o efeito do j -ésimo fator B; B_k é o efeito do k -ésimo bloco; $(AB)_{ij}$ é a interação entre o i -ésimo fator A e o j -ésimo fator B; e e_{bjk} é o resíduo (b) da subparcela.

Avaliação patológica dos isolados em condições controladas

A suspensão contendo esporos de cada isolado foi inoculada nas linhagens de milho-pipoca, previamente caracterizadas como resistentes e suscetíveis ao patógeno. A suspensão foi ajustada, com auxílio de um hemacitômetro, na concentração de 10^4 conídios/mL. Seis isolados de *B. maydis* e o isolado de *B. gossypina* foram selecionados.

As plantas foram cultivadas em vasos plásticos contendo 3 L de substrato contendo solo, areia e esterco bovino, na proporção 2:1:1. Após germinação das sementes, permaneceram duas plântulas por vaso, as quais ficaram na casa de vegetação até atingirem o estágio fenológico V4 (quarta folha expandida, apresentando colar, lígula e aurículas visíveis). Posteriormente, as plantas foram alocadas em câmeras de crescimento para um melhor controle ambiental (umidade relativa do ar \pm 90%, temperatura \pm 25°C e regime de luz 12h.), ocasião em que foram inoculadas com a suspensão de esporos até o ponto de escorrimento (Saluci et al., 2020).

A severidade nas plantas inoculadas com os isolados de *B. maydis* foi obtida com auxílio da escala diagramática, a mesma utilizada no ensaio de campo (Figura 1). Após a inoculação foram realizadas quatro avaliações, o que permitiu calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A incidência de *Bipolaris* na planta (IBP) foi avaliada apenas na primeira avaliação, ou seja, três dias após a inoculação. A IBP é expressa em porcentagem. Ambas as avaliações foram realizadas na quarta folha expandida. O patógeno foi (re)isolado nas linhagens testadas, a fim de confirmar a patogenicidade.

O delineamento foi em blocos casualizados em múltiplos ambientes com três repetições, sendo cada vaso considerado uma unidade experimental, com duas plantas em cada.

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias pelo teste Shapiro-Wilk, e homogeneidade via teste Oneill e Mathews ($p < 0,05$). Atendidos os pressupostos, realizou-se a análise de variância (ANOVA) pelo teste F ($p < 0,05$). O modelo matemático empregado foi:

$$Y_{ijk} = m + B/A_{jk} + G_i + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Em que Y_{ijk} é o valor observado na parcela correspondente ao i -ésimo genótipo alocado no j -ésimo ambiente (isolado) no k -ésimo bloco; m é a constante geral; B/A_{jk} é o efeito do k -ésimo bloco no j -ésimo ambiente; G_i é o efeito do i -ésimo genótipo; A_j é o efeito do j -ésimo ambiente; GA_{ij} é o efeito da interação entre o i -ésimo genótipo com o j -ésimo ambiente e; E_{ijk} é o erro aleatório associado à observação Y_{ijk} .

Os dados foram submetidos às análises de variâncias conjunta e individual e, quando constatado efeito significativo, efetuou-se o teste de média Tukey utilizando o *software* estatístico Genes (Cruz, 2013). Além disso, construíram-se gráficos de *boxplot* para cada variável, agrupando os valores estimados em cada unidade experimental das linhagens dentro de cada isolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção dos isolados e características morfológicas

Nas áreas analisadas, onze isolados de *Bipolaris* foram obtidos e identificados em lavouras de milho. Os isolados foram coletados nos Estados de Alagoas, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro e Tocantins. A maioria dos isolados foi identificado como *B. maydis*. Apenas um isolado foi identificado como *B. gossypina*, coletado no Estado do Mato Grosso (Tabela 3).

Todas as características morfológicas analisadas apresentaram diferenças significativas entre os isolados de *Bipolaris*. Houve formação de grupos distintos para o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Em relação ao número de septos, comprimento e largura dos conídios, houve apenas a contagem e descrição das mesmas (Tabela 4).

Tabela 3. Isolados de *Bipolaris* infectando milho em seis Estados brasileiros

Isolado	Espécie	Hospedeiro	Coleta	Local de coleta
CF/UENF 475	<i>B. maydis</i>	Milho comum	out/17	Gurupi – TO
CF/UENF 477	<i>B. maydis</i>	Milho comum	abr/18	Paragominas – PA
CF/UENF 479	<i>B. maydis</i>	Milho comum	mar/18	Rio Largo – AL
CF/UENF 481	<i>B. maydis</i>	Milho comum	mai/18	Tangará da serra - MT
CF/UENF 482	<i>B. gossypina</i>	Milho comum	mai/18	Tangará da serra - MT
CF/UENF 492	<i>B. maydis</i>	Milho comum	nov/18	Alegre - ES
CF/UENF 496	<i>B. maydis</i>	Milho-pipoca	mar/19	Alegre - ES
CF/UENF 501	<i>B. maydis</i>	Milho-pipoca	mar/18	Campos dos Goytacazes-RJ
CF/UENF 502	<i>B. maydis</i>	Milho-pipoca	ago/18	Campos dos Goytacazes-RJ
CF/UENF 503	<i>B. maydis</i>	Milho-pipoca	nov/18	Campos dos Goytacazes-RJ
CF/UENF 508	<i>B. maydis</i>	Milho-pipoca	nov/19	Campos dos Goytacazes-RJ

Tabela 4. Características morfológicas de onze isolados de *Bipolaris* patogênicos ao milho, cultivados em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação.

Isolados	IVCM*	Conídios		Número de septos
		Comprimento (µm)	Largura (µm)	
CF/UENF 475	1.76 d	48.95 - 118.51	12.91 - 18.03	5 - 10
CF/UENF 477	0.92 e	58.11 - 114.22	12.55 - 17.96	7 - 12
CF/UENF 479	2.29 c	50.23 - 96.01	11.39 - 20.58	5 - 9
CF/UENF 481	2.03 d	48.53 - 98.37	13.07 - 17.91	5 - 11
CF/UENF 482*	3.43 b	32.07 - 65.94	11.58 - 15.57	3 - 9
CF/UENF 492	1.87 d	28.8 - 71.44	10.45 - 15.15	3 - 8
CF/UENF 496	5.84 a	42.00 - 80.46	9.82 - 14.43	5 - 10
CF/UENF 501	2.19 d	91.97 - 52.79	16.35 - 10.88	4 - 10
CF/UENF 502	2.64 c	87.2 - 44.05	15.86 - 9.46	1 - 6
CF/UENF 503	2.71 c	71.6 - 21.54	14.75 - 8.45	4 - 9
CF/UENF 508	3.81 b	72.87 - 32.81	15.97 - 10.52	2 - 8
CV (%)	18.65			

*Variável transformada via aplicação da equação de Box e Cox (1964) ** espécie *B. gossypina*. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Na variável IVCM foi observada diferença significativa entre os isolados. No entanto, os grupos formados não estavam de acordo com as espécies e/ou região de origem, demonstrando grande variação na morfologia entre os distintos isolados. Ressalta-se, portanto, a necessidade de análises e técnicas mais precisas para distinguir as espécies dentro do gênero, uma vez que as formas morfológicas sofrem grande influência do ambiente (Bhunjun et al., 2020; Sun et al., 2020).

Os isolados de *B. maydis*, em meio de cultura BDA, após 14 dias de crescimento das colônias, têm como coloração predominante cinza esverdeada na frente e preto verso da placa, textura cotonosa, borda irregular, o centro da colônia, geralmente, tinha coloração mais clara. A formação de setores e zonas também foi observada. A maioria das colônias dos isolados cresceu lentamente e não atingiu a borda da placa durante a avaliação. A esporulação dos isolados com 14 dias de incubação foi abundante.

Os conídios foram classificados como fusiforme, com dimensões médias de 28.8 - 118.51 x 8.45 - 20.58 μm (comprimento/largura), coloração marrom, curvo, distoseptado e hilo truncado. Conidióforos geralmente surgindo individualmente ou em pequenos grupos, septados, retos ou sinuosos, com tubo germinativo surgindo em ambas as extremidades (Figura 2).

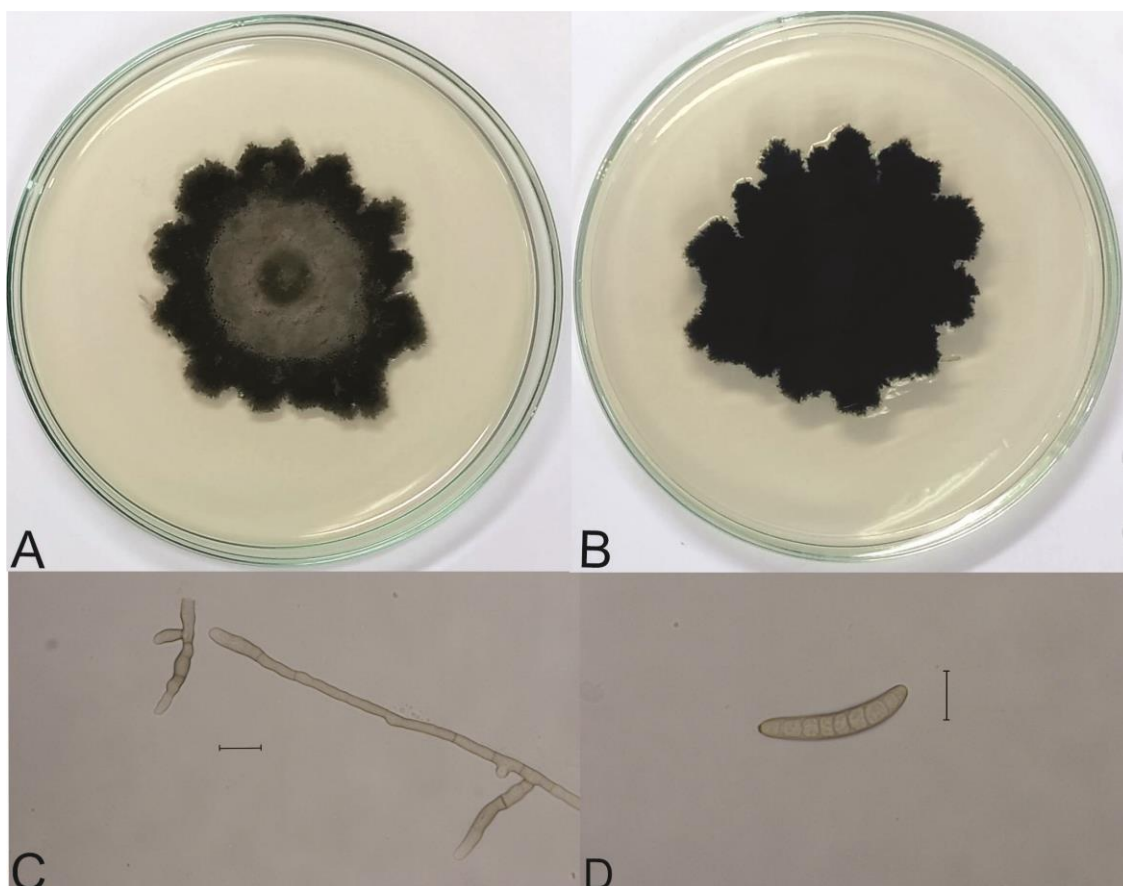


Figura 2. Aspecto morfológico de *B. maydis* (CF/UENF 477) em meio de cultura BDA aos 14 dias de crescimento a 25 °C. (A) Frente da colônia; (B) verso da colônia; (C) conídios e conidióforos; (D) conidióforos individuais; (E) conídio individual. Barras de escala (C, D, E) = 20 μm .

Já o isolado de *B. gossypina* apresentou colônias com coloração preta esverdeada, textura aveludada e borda irregular com uma leve pigmentação marrom no meio de cultura. As colônias não atingiram toda a extensão da placa durante a avaliação. A esporulação do isolado, aos 14 dias de incubação, foi abundante.

As dimensões médias dos conídios foram 32.07 - 65.94 x 11.58 - 15.57 μm (comprimento/largura), coloração marrom escura, formato obclavado, ligeiramente curvo, distoseptado, com hilo truncado e delicadamente acentuado. O turbo germinativo, geralmente surgindo em ambas as extremidades dos conídios. Conidióforos com coloração marrom geralmente surgindo individualmente, em pares, ou em pequenos grupos, septados, retos ou sinuosos com cicatrizes conidiogênicas marrom escura (Figura 3).

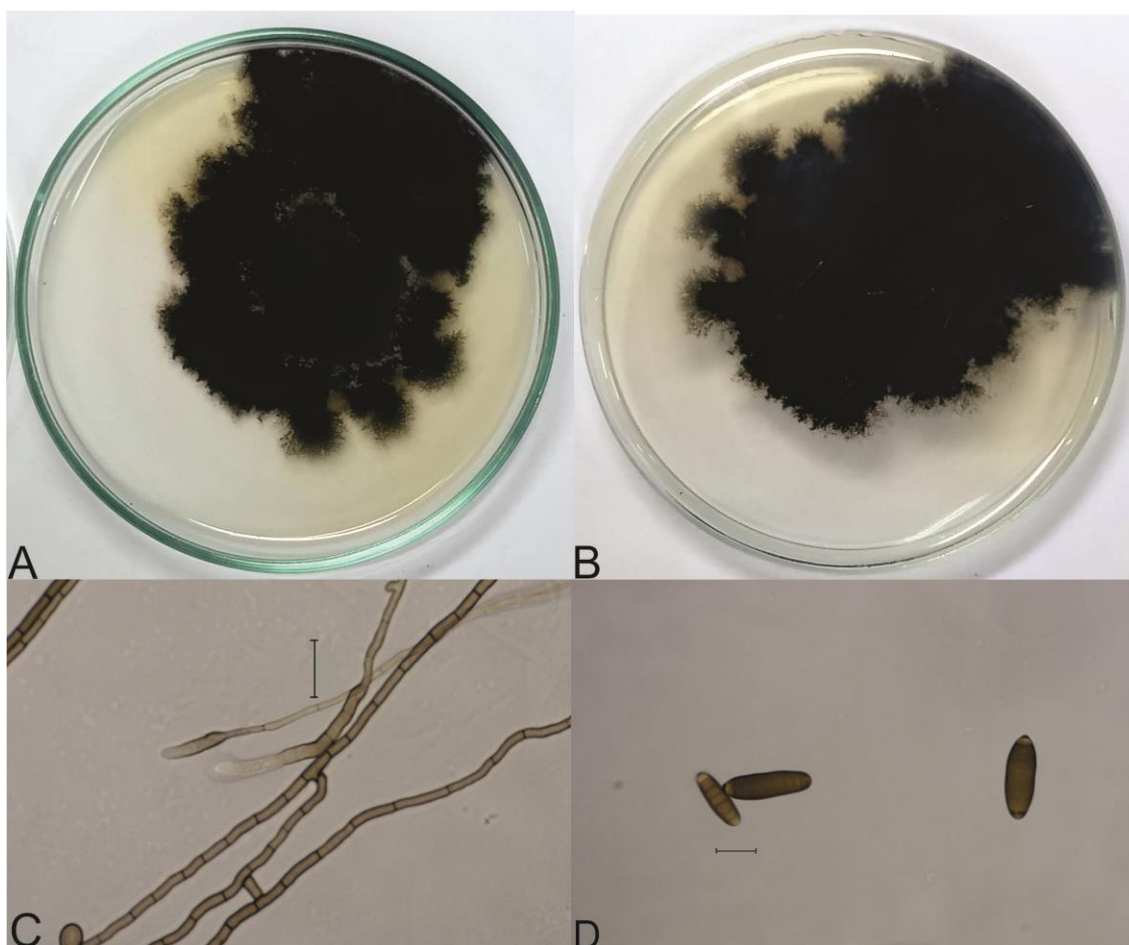


Figura 3. Aspecto morfológico do isolado de *B. gossypina* (CF/UENF 477). (A) Frente e (B) verso das colônias em BDA 14 dias a 25°C; (C) conidióforos individuais e hifas; (D) conídios individuais. Barras de escala (C e D) = 20 μm .

Em geral, as espécies de *B. maydis* são maiores que as de *B. gossypina* e com coloração das hifas, conídios e conidióforos castanhos mais claros. A espécie *B. gossypina* tem hilo truncado, porém, é levemente acentuado, geralmente com as extremidades dos conídios mais clara e forma mais arredondada quando comparados com as espécies de *B. maydis*, e o aspecto da colônia é aveludado.

As características morfológicas e culturais encontradas para as duas espécies foram compatíveis com aquelas já descritas na literatura. Nos isolados, algumas características que distinguem morfológicamente as espécies de *Bipolaris*, *Exserohilum* ou *Curvularia* foram observadas. O hilo truncado foi observado em todos os isolados – essa é a característica que distingue as espécies do gênero *Exserohilum* (Hernández-Restrepo et al., 2018). Já conídios mais curvados é uma característica marcante do gênero *Curvularia*, assim como um número reduzido de septos, ambas as características não foram observadas nos isolados analisados (Manamgoda et al., 2014).

Como não houve a formação de grupos de espécies em nenhuma das variáveis analisadas, ressalta a importância das técnicas moleculares para a identificação em nível de espécies deste gênero (Manamgoda et al., 2012; Marin-Felix et al., 2017).

Filogenia molecular

A análise filogenética, tanto das regiões de ITS quanto de GAPDH, foi realizada com 81 táxons, e destes, 11 foram gerados neste estudo: CF/UENF 475, CF/UENF 477, CF/UENF 479, CF/UENF 481, CF/UENF 482, CF/UENF 492, CF/UENF 496, CF/UENF 501, CF/UENF 502, CF/UENF 503 e CF/UENF 508.

O alinhamento das sequências da região de ITS resultou em um total de 454 caracteres, sendo que a maioria, 84%, foram sítios conservados; 14% foram variáveis e apenas 8% foram sítios informativos para parcimônia. Já o alinhamento das sequências da região de GAPDH resultou em um total de 509 caracteres, 65% dos caracteres foram sítios conservados, 27% variáveis e 19% foram informativos para parcimônia (Tabela 5).

Tabela 5. Propriedade do alinhamento das sequências de DNA para o gênero *Bipolaris* e modelo de substituição nucleotídica por região do gene (ITS e GAPDH) e para o concatenado (ITS+GAPDH).

	ITS	GAPDH	ITS+GAPDH
Número de caracteres	454	509	963
Sítios conservados	384	349	733
Sítios variáveis	64	141	205
Sítios informativos de parcimônia	38	95	133
Modelos de substituição nucleotídica	GTR+I	GTR+G	GTR+I+G
Conteúdo AT (%)	53,3	45,1	48,9
Conteúdo CG (%)	46,7	54,9	51,1

ITS = *internal transcribed spacer*, GPDH = *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

A estrutura topológica da árvore ITS e GAPDH é semelhante em termos de clados principais ao conjunto de dados concatenados. Em termos de conjunto de dados, a topologia da árvore GAPDH (dados não apresentados) foi similar ao conjunto de dados concatenados. A análise filogenética concatenada das regiões de ITS e GAPDH foi realizada com 66 táxons, e destes, 11 foram gerados neste estudo.

Por meio da análise filogenética foi possível identificar duas espécies do gênero *Bipolaris* infectando o milho: *B. maydis* e *B. gossypina*, agrupadas em dois clados diferentes e bem definidos. A maioria das espécies (dez) foi agrupada no maior clado da árvore, este com um valor de probabilidade posteriori (pp) de 1, portanto, excelente confiabilidade de ramos. O isolado CF/UENF 475 ficou agrupado junto com a espécie tipo (CBS 137271) e outros isolados de *B. maydis*. A espécie de *B. gossypina* formou outro clado, junto com sua espécie tipo (BRIP 14840), sendo que este clado também teve um valor de pp=1 (Figura 4).

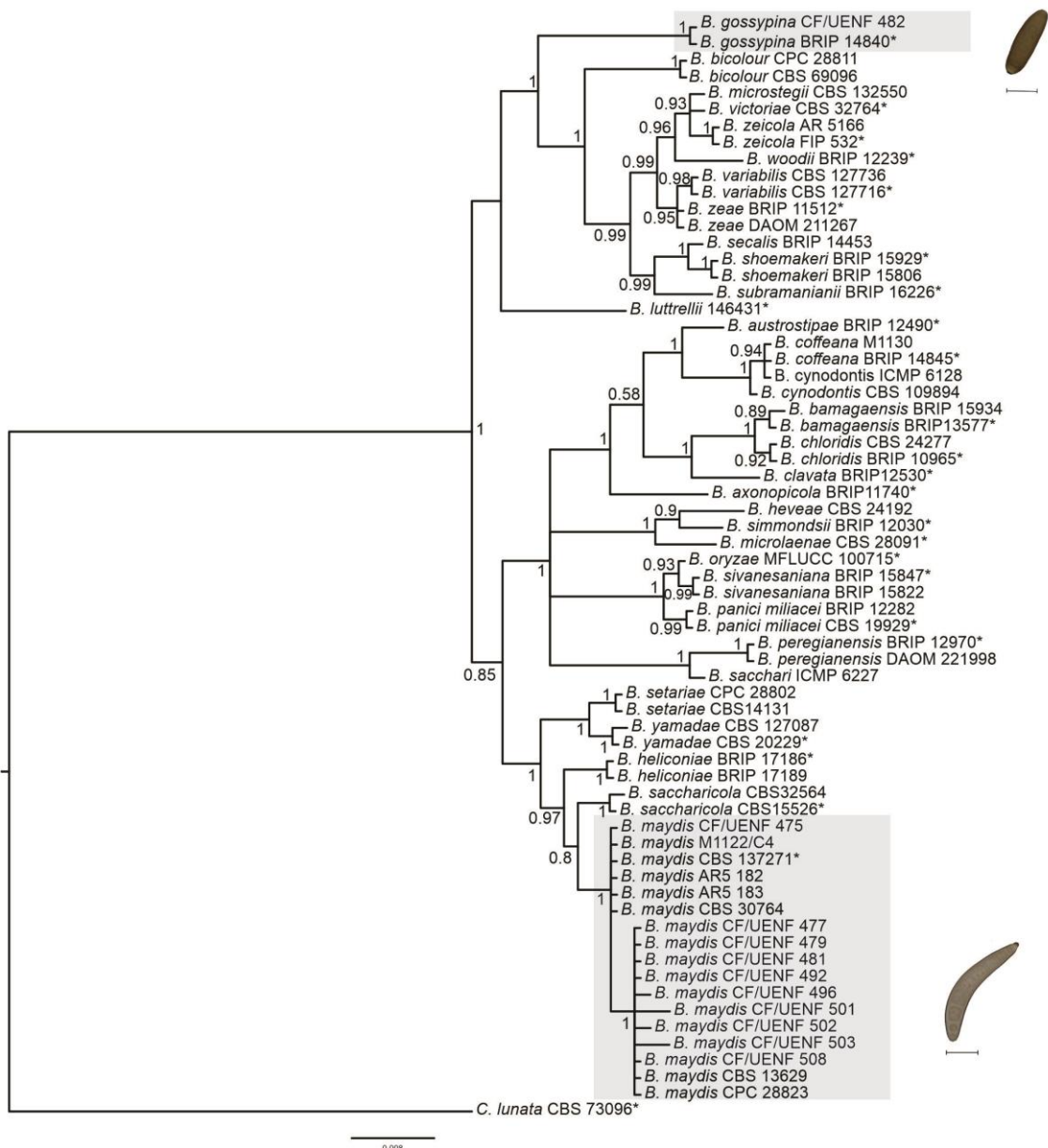


Figura 4. Filograma multilocus baseado na inferência bayesiana oriunda da combinação das sequências dos genes ITS e GAPDH de isolados de *Bipolaris* em milho. Valores de probabilidade posterior (pp) bayesiana estão indicados acima dos nós. A árvore está enraizada com *Curvularia lunata* (CBS 73096). *Espécie tipo. Barras de escala = 20 µm.

O gênero *Bipolaris* é caracterizado por ter uma distribuição cosmopolita com uma ampla gama de hospedeiros, principalmente as espécies vegetais pertencentes à família *Poaceae* (Manamgoda et al., 2014). Os isolados de *Bipolaris* foram amostrados em seis Estados brasileiros, demonstrando que está bem distribuído no território brasileiro.

A espécie *B. maydis* tornou-se a principal doença em quase todas as regiões produtoras de milho, devido ao uso generalizado de variedades de milho híbrido suscetíveis, especialmente em lavouras semeadas em regiões/épocas mais quentes (Kunhao et al., 2015). Os dados desta pesquisa confirmam que o patógeno está bem distribuído nas regiões produtoras. Observou-se que o local de coleta e hospedeiro não influenciam na formação dos clados (ramos), os quais devem sempre expressar as relações evolutivas das espécies.

O uso da filogenia molecular é recomendado para identificação a nível de espécies, o que torna a ferramenta crucial para solucionar problemas taxonômicos e identificar patógenos, pois quando as análises são baseadas apenas em dados morfológicos, as espécies de *Bipolaris*, às vezes, podem ser confundidas com *Curvularia* e *Exserohilum* (Manamgoda et al., 2012; Marin-Felix et al., 2020).

As espécies de *Bipolaris* podem persistir nos restos culturais por um longo tempo, o que pode gerar maior sobrevivência e disseminação desses patógenos. A identificação de espécies, baseada apenas em dados morfológicos, é mais difícil, quando o patógeno não é comum em uma determinada cultura. A identificação da espécie *B. gossypinasó* foi possível devido a filogenia molecular. Até o presente momento, este é o primeiro relato da espécie *B. gossypina* infectando o milho no Brasil.

A referida espécie é registrada infectando sementes de algodão (*Gossypium* L.) e conhecida a partir da espécie-tipo (BRIP 14840), coletada na República do Quênia (Tan et al., 2014; Farr e Rossman, 2020). Como a rotação soja-algodão-milho é um sistema de plantio tradicional no Estado do Mato Grosso – local de coleta do isolado (Freitas, 2017). A infecção na cultura do milho, por *B. gossypina*, requer atenção, pois pode estar ocorrendo uma variação genética dentro da espécie e, futuramente, a mesma se tornar uma fonte potencial de inóculo para a cultura do milho.

Esse fato reforça ainda mais a necessidade de análises moleculares para diferenciar e classificar corretamente as espécies de fungos fitopatogênicos, pois apenas com dados baseados em sintomas e morfologias não é possível realizar a identificação em nível de espécie (Bhunjun et al., 2020). Os resultados desta pesquisa confirmam que a região GAPDH é o

melhor marcador individual para delinear espécies de *Bipolaris*, por meio da filogenia molecular (Marin-Felix et al., 2017; Bhunjun et al., 2020).

Caracterização patológica

Ensaio de campo para selecionar os contrastes de linhagens de milho-pipoca

Para as variáveis IBP e SBF nas fontes de variação genótipo e tempo de avaliação foi possível observar efeito significativo, ao nível de 5% de probabilidade. Houve efeito significativo também para a interação genótipo *versus* tempo de avaliação quanto à resistência a *B. maydis*. Isso indica que há dependência entre os efeitos de genótipo *versus* tempo; logo, foi necessário proceder ao desdobramento das interações.

No desdobramento do tempo de avaliação dentro de cada linhagem, verificou-se que a incidência e a severidade variaram de acordo com o genótipo. Para incidência, houve diferença significativa nos genótipos L203, L265, L266, L293, L682, L685, L688, L689, L691, L693, L70, L71 e P2. Para severidade, com exceção das linhagens L203, L692 e L693, não houve diferença entre os genótipos. No desdobramento das linhagens dentro de cada período de avaliação, para a variável incidência, houve diferença significativa nas duas avaliações. Já para severidade, as diferenças observadas entre genótipos foram apenas na segunda avaliação. Isso mostra que ocorreu incremento da doença em algumas linhagens ao longo do tempo.

Em condições de campo, o patógeno é disseminado de maneira natural, dessa forma, a incidência é devido às novas unidades infectadas. De maneira geral, a incidência observada foi baixa na primeira avaliação, indicando possivelmente um quadro de desenvolvimento inicial de doença, porém, já foi possível observar diferenças na suscetibilidade dos genótipos.

No agrupamento das médias para incidência, houve a formação de quatro grupos nas duas avaliações. Dessa forma, apesar de todas as linhagens apresentarem sintomas de *B. maydis*, foi possível identificar a formação de grupos distintos estatisticamente e, assim, discriminá-los quanto à resistência à *B. maydis* (Figura 5).

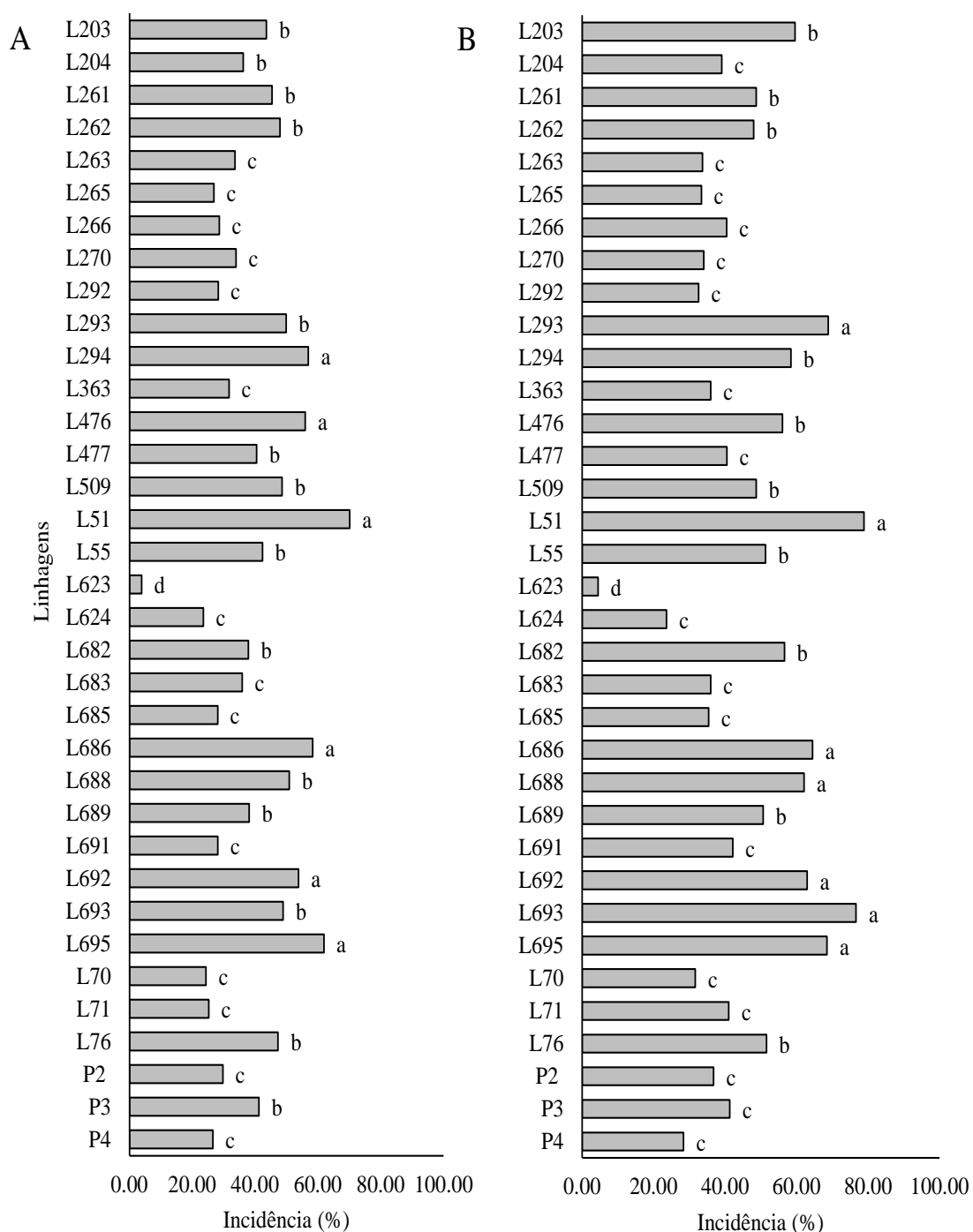


Figura 5. Agrupamento de médias pelo teste de Scott e Knott ($p < 0,05$) para incidência de mancha de *Bipolaris* em linhagens de milho-pipoca, estimadas na primeira (A) e na segunda (B) avaliação, barras seguidas por uma mesma letra pertencem ao mesmo grupo.

Em ambas as avaliações, o grupo com as menores estimativas de incidência de *B. maydis* foi constituído por uma única linhagem, a L623—originada de PA 091. Nas condições estudadas, esse genótipo demonstrou ter um potencial para ser usado como fonte de resistência ao patógeno com apenas 4% de incidência. Esse percentual é menor do que o encontrado em trabalhos anteriores, demonstrando que a linhagem tem potencial para ser usada como fonte de resistência (Kurosawa et al., 2018).

Além da L623, um segundo grupo formado por L263, L265, L266, L270, L292, L363, L624, L683, L685, L691, L70, L71, P2 e P4 foi considerado moderadamente resistente, os quais provêm de genealogias distintas (Tabela 2) que já tiveram alelos vinculados às características de interesse da cultura, como a capacidade de expansão e produção, selecionados ao longo do tempo, além de resistência às outras doenças foliares (Pacheco et al., 2001; Amaral Júnior et al., 2013).

É necessário saber a performance das linhagens em relação ao patógeno, pois a qualidade da linhagem será mérito das populações que as originaram, supondo que as virtudes dos híbridos estarão correlacionadas com a qualidade dos parentais. Dessa forma, essas genealogias podem ser uma alternativa como fonte de resistência, assim, acredita-se que durante o processo de melhoramento desses genótipos, selecionaram-se, mesmo que de forma indireta, alelos favoráveis à resistência à *B. maydis*. As linhagens L51, L686, L692, e L695, em ambas as avaliações, apresentaram altos índices de incidência, sendo classificadas como suscetíveis ao patógeno.

Em relação à severidade, na primeira avaliação, todas as linhagens reagiram de maneira semelhante com baixo índice de doença. Na segunda avaliação houve um incremento da doença em algumas linhagens, resultando em um grupo de linhagens suscetíveis (Figura 6). Apesar da baixa magnitude em todos os genótipos (máximo de 2,5% de severidade), na segunda avaliação, a reação dos genótipos à infecção de *B. maydis* permitiu identificar linhagens com diferentes níveis de resistência.

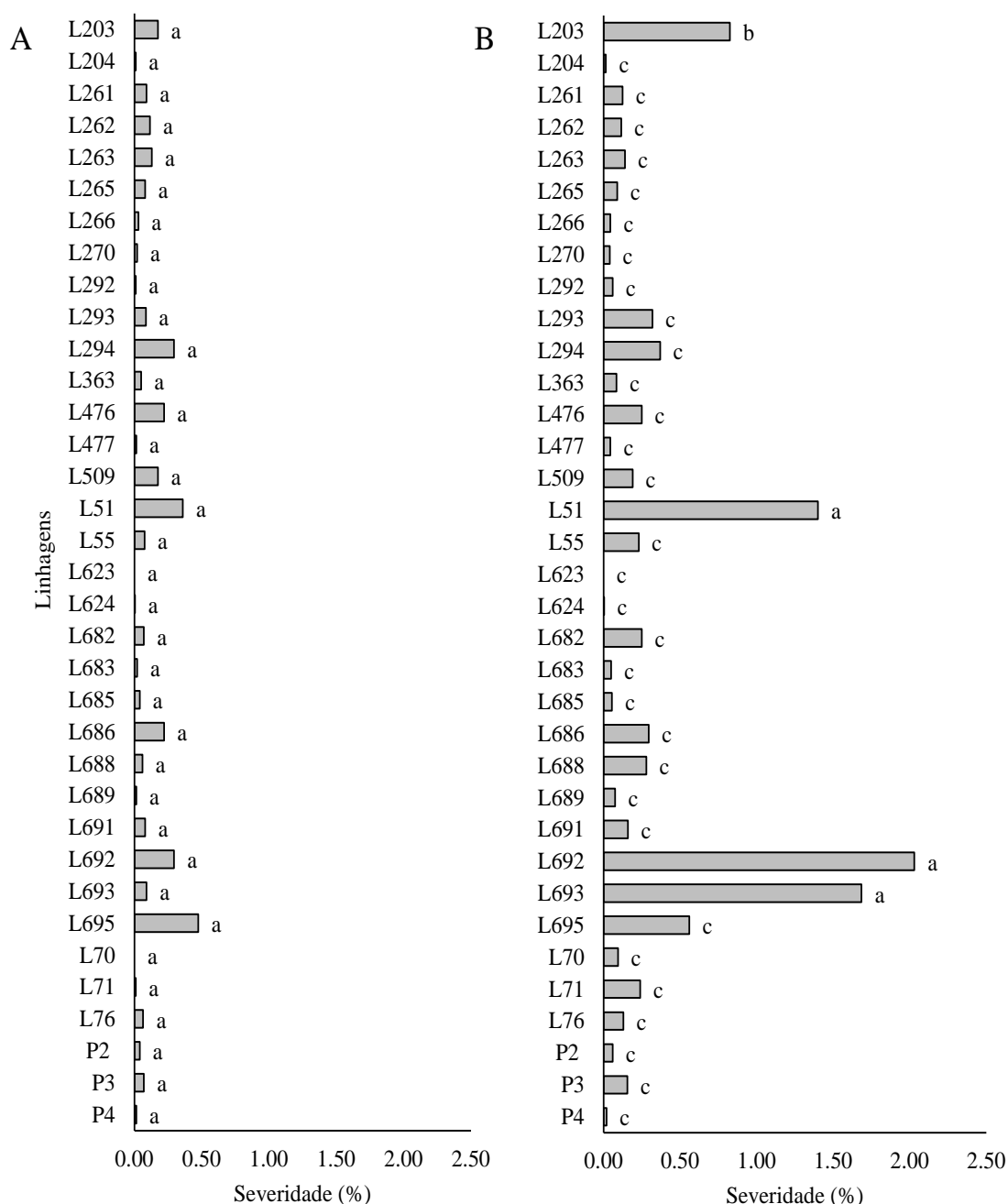


Figura 6. Agrupamento de médias pelo teste de Scott e Knott ($p < 0,05$) para severidade de mancha de *Bipolaris* em linhagens de milho-pipoca, estimadas na primeira (A) e na segunda (B) avaliação, barras seguidas por uma mesma letra pertencem ao mesmo grupo.

No agrupamento das médias para severidade foi possível observar que os níveis de severidade variaram de acordo com o hospedeiro e em decorrência do período de avaliação. Na segunda avaliação, ocorreu a formação de três grupos, no grupo de menor severidade média foram reunidas

31 das 35 linhagens avaliadas, três linhagens no grupo mais suscetível e uma no grupo intermediário (Figura 6).

Após a avaliação do percentual de área lesionada nas diferentes linhagens foi possível considerar como potenciais fontes de resistência à *B. maydis* os genótipos: L204, L261, L262, L263, L265, L266, L270, L292, L293, L294, L363, L476, L477, L509, L55, L623, L624, L682, L683, L685, L686, L688, L689, L691, L695, L70, L71, L76, P2, P3, P4. As mais suscetíveis foram identificadas nas linhagens L51, L692 e L693, desta forma, em trabalhos futuros tais linhagens podem ser utilizadas como genitoras para estudo de herança, análise de proteômica, entre outros estudos de melhoramento de plantas.

Dentre as linhagens que apresentaram níveis baixos de severidade nos dois períodos avaliados, a linhagem L623 exibiu também os menores valores de incidência em ambos os períodos avaliados, portanto, a linhagem L623 pode ser fonte de resistência passível de ser explorada em programas de melhoramento genético visando à resistência. As linhagens L51 e L692, em ambas as avaliações apresentaram maiores índices de incidência e severidade, sendo classificadas como suscetíveis ao patógeno.

Neste estudo, foi possível evidenciar diferenças entre os níveis de resistência dos genótipos avaliados. Diferenças essas, que podem ser atribuídas à genealogia dos genótipos estudados. Resultados semelhantes foram encontrados por Mubeen et al. (2017), que ao avaliarem o efeito de *B. maydis* em distintos genótipos de milho, notaram que a resistência varia de acordo com o genótipo usado. Os autores encontraram o máximo de 4% de severidade, conseguindo distinguir os genótipos com diferentes níveis de resistência à *B. maydis*.

Na cultura do milho-pipoca, em germoplasma brasileiro, ainda não foram quantificadas perdas ligadas à *B. maydis*. Portanto, existe a demanda de estudos visando à identificação de fontes de resistência, tanto para trabalhos de melhoramento, como também para caracterizar a variabilidade do patógeno. Tal informação permitirá avançar em estudos mais aprofundados, tais como ação de genes associados à resistência, estudos de proteômica, interação patógeno-hospedeiro, entre outros.

Atualmente, a identificação de genótipos de milho-pipoca promissores quanto à resistência é alvo de estudos (Kurosawa et al., 2018; Saluci, 2020). Por meio dos nossos resultados foi possível observar que houve diferença nos níveis de resistência dos genótipos, principalmente na incidência, sendo possível discriminá-los e selecioná-los para uso em estudos de melhoramento que buscam a seleção de genótipos, assim como estudar a interação patógeno-hospedeiro.

Avaliação patológica dos isolados em condições controladas

Seis isolados representativos de *B. maydis* foram selecionados para realizar a avaliação patológica: CF/UENF 475, CF/UENF 477, CF/UENF 479, CF/UENF 481, CF/UENF 492, CF/UENF 501 e o isolado de *B. gossypina*: CF/UENF 482. Os mesmos foram inoculados nas linhagens de milho-pipoca: L623 – resistente e L51 e L692 – suscetíveis, que foram selecionadas, no trabalho de campo. Por meio da análise de variância foi observada diferença significativa apenas para a variável área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) nas linhagens. Para a incidência, não houve diferença significativa em nenhum dos fatores (linhagens e isolados).

Não foi observada interação significativa entre esses fatores, ou seja, os fatores atuam de forma independente. Não existe diferença quanto à patogenicidade entre os isolados, e por outro lado, existe uma variabilidade entre os diferentes materiais genéticos avaliados, no que se refere à resistência à *B. maydis*. A fim de obter uma visão mais abrangente a respeito da reação das linhagens quanto à resistência à *B. maydis*, construíram-se gráficos de *boxplot* para as variáveis IBP e AACPD (Figura 7).

A mediana geral para a AACPD ficou em torno de 470. As linhagens L51 e L692 mostraram uma maior amplitude dos dados AACPD. Na L51, as médias variaram de 29 a 1010, com mediana oscilando entre 161 (CF/UENF 481) a 835 (CF/UENF 481). Na L623, os limites inferiores e superiores foram de 11 a 688, respectivamente, e a mediana ficou entre 115 (CF/UENF 479) a 617 (CF/UENF 477). Já para L692, os limites foram de 110 a 1010, e a mediana ficou entre 113 no isolado (CF/UENF 479) a 617 para o isolado (CF/UENF 501).

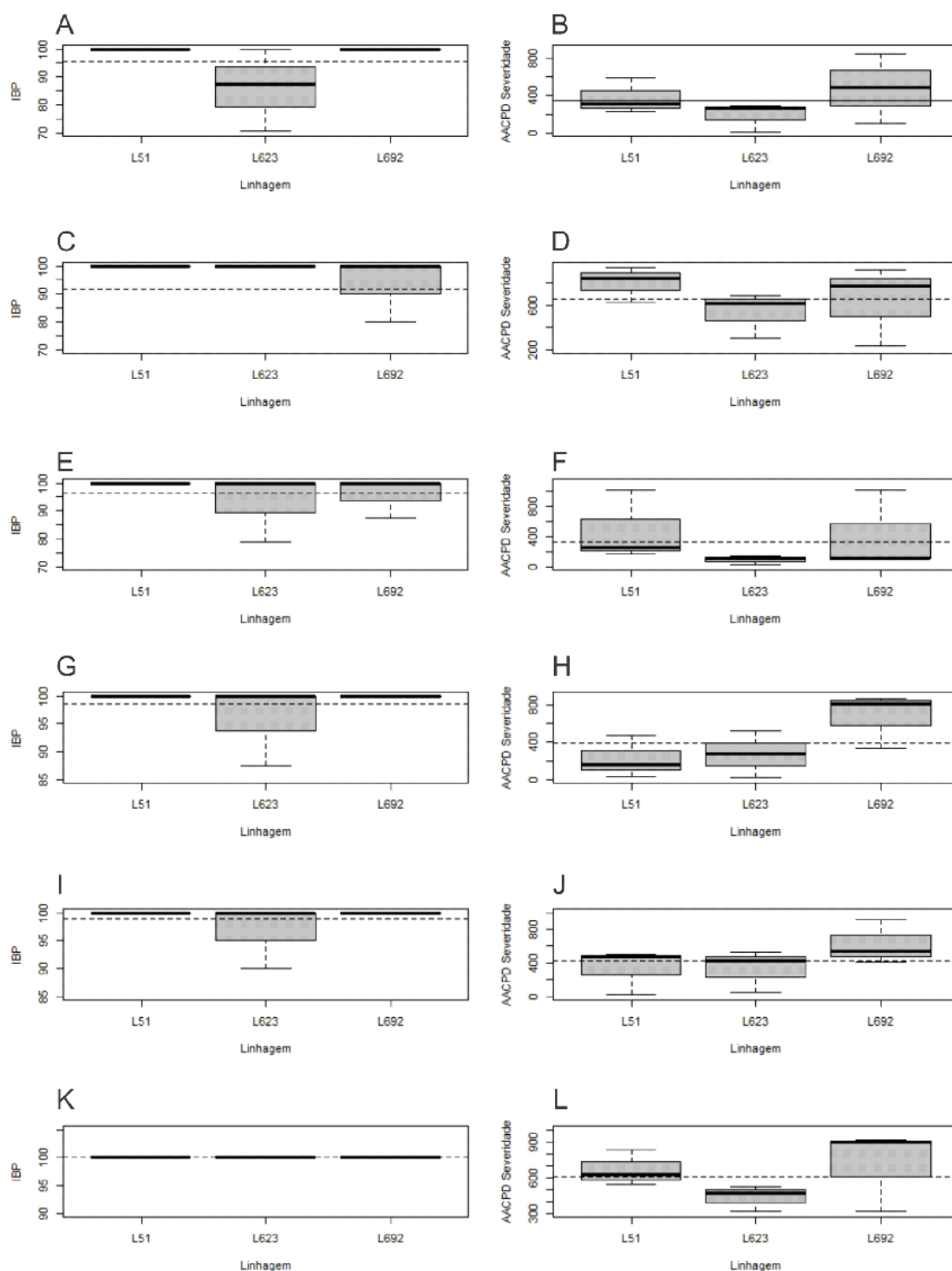


Figura 7. Patogenicidade de diferentes isolados de *Bipolaris maydis* em milho-pipoca. A-B: CF/UENF 475; C-D: CF/UENF 477; E-F: CF/UENF 479; G-H: CF/UENF 481; I-J CF/UENF 492; K-L: CF/UENF 501.

Os diferentes isolados de *B. maydis infectaram*, de forma semelhante, as linhagens, não demonstrando diferença no nível de doença que provocaram. Houve diferença na performance das linhagens em relação ao progresso da doença.

Apesar da alta pressão de inóculo no ambiente, de forma geral, a linhagem L623 apresentou menor mediana e amplitude de AACPD. A média dessa linhagem, independente do isolado para AACPD, está abaixo da mediana, existindo assim, potencial para a resistência a ser explorada, confirmando, portanto, resultados observados em campo.

Quando comparadas às outras linhagens deste estudo, a mesma conseguiu reduzir o progresso da doença ao ser inoculada com a suspensão contendo os conídios de *B. maydis*. A linhagem L623 é oriunda da genealogia PA-091, que é indicada como possível fonte de resistência ao *B. maydis* a ser explorada em programas de melhoramento de milho-pipoca (Saluci et al., 2020).

O emprego de genótipos resistentes é uma das estratégias eficientes do controle de doenças de plantas, uma vez que pode ser usada em larga escala e possui baixo impacto ambiental quando comparados aos produtos químicos (Camargo, 2018). Nas condições estudadas, a linhagem L623 foi a que mais conseguiu impedir o progresso da doença, mesmo nas condições de alta concentração de inóculo, ambiente altamente favorável para o desenvolvimento da doença. Por isso, pode ser indicada para trabalhos futuros para programas de melhoramento que visem resistência ao patógeno.

A espécie de *B. gossypina* (CF/UENF 482) também foi inoculada nas três linhagens, porém as linhagens de milho-pipoca podem ter se comportado como um hospedeiro alternativo, ou as condições ambientais não foram favoráveis para o desenvolvimento do isolado. Houve a infecção e colonização das folhas pelo isolado, porém, não ocorreu o progresso da doença. Nas folhas foram observados sintomas pontuais como lesões alongadas, elípticas, e necróticas, de coloração marrom com bordas mais avermelhadas.

Esse isolado foi coletado no Estado do Mato Grosso, o qual se destaca com a maior produção de algodão do Brasil (IBGE, 2021). Como é um isolado específico na cultura do algodão, sugere-se que o patógeno usou a cultura do milho como um hospedeiro alternativo. Outra hipótese é que condições ambientais podem ser especialmente favoráveis à interação de espécies de *Bipolaris* entre diferentes hospedeiros, ocasionando ou não a doença.

Fatos semelhantes já foram relatados na cultura do milho com outras espécies de *Bipolaris*, por exemplo, a espécie *B. zeicola* também em condições

controladas, foi moderada ou pouco patogênica em milho, mas em locais de ocorrência natural a doença foi grave (Sun et al., 2020).

Dessa forma, provavelmente as condições do teste de patogenicidade foram diferentes das condições ambientais onde ocorreu a infecção natural do patógeno, logo, pode não ter sido a mais adequada para *B. gossypina*. Portanto, em trabalhos futuros, sugere-se simular a inoculação de *B. gossypina* em outras condições ambientais, alterando luminosidade, teste de temperatura e umidade, concentração de inóculo, entre outras. Para isso, é necessário entender que a patogenicidade é um processo complexo e requer o entendimento dos componentes biológicos, bem como fatores exclusivos dos fungos que participam de interações patógeno-hospedeiras (Turgeon e Baker, 2007).

De acordo com as análises morfológicas, filogenéticas e patológicas, neste estudo foi observado que as duas espécies de *Bipolaris* foram associadas à mancha-foliar do milho no Brasil, sendo que *B. maydis* foi predominante nos locais estudados.

Uma vez confirmada a espécie do patógeno, esses isolados podem servir para trabalhos futuros para aumentar a confiança na seleção dos genótipos resistentes. Em condições controladas ocorre uma alta concentração de inóculo, que atrapalham o mecanismo de defesa do hospedeiro, resultando em alta ou moderada severidade. Portanto, genótipos que conseguirem diminuir o progresso da doença podem ser selecionados como fontes de resistência (Altaf et al., 2016).

O estudo do patossistema busca selecionar genótipos resistentes aos diversos patógenos, e é uma área que proporciona uma interação entre fitopatologistas e melhoristas de plantas, sendo talvez uma das maiores contribuições da ciência para a agricultura (Camargo, 2018).

RESUMO E CONCLUSÕES

Baseados em dados morfológicos e moleculares foram identificadas duas espécies de *Bipolaris* (*B. maydis* e *B. gossypina*) presentes em cultivos de milho no Brasil. A ocorrência da espécie *Bipolaris maydis* no Brasil é bem

distribuída; *Bipolaris gossypina* foi relatado apenas no Estado do Mato Grosso brasileiro, sendo este o primeiro relato da espécie na cultura do milho no Brasil.

A linhagem L623 foi a mais resistente, tanto em inoculação natural ou induzida, e poderá ser utilizada como fonte de resistência em programas de melhoramento.

Os isolados de *B. maydis* não diferiram quanto a sua capacidade patológica. Todos os isolados identificados são indicados para serem utilizados como fonte de inóculo em pesquisas visando à resistência à *Bipolaris*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C., Ferreira, F.A., Alfenas, R.F. (2016). Inoculação de fungos fitopatogênicos. In A. C. Alfenas, R. G. Mafía (Eds.) *Métodos em Fitopatologia*. 2 ed. Viçosa: UFV, p. 123–143.
- Altaf, M., Raziq, F., Khan, I., Hussain, H., Ullah, W., Naeem, A., Adnan, M., Rizwan, S., Shah, A., Iqbal, M. (2016) Study on the response of different maize cultivars to various inoculum levels of *Bipolaris maydis* (Y. Nisik e C. Miyake) shoemaker under field conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4: 533–537.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410.
- Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., de Paiva Freitas Júnior, S., Candido, L. S., Vittorazzi, C., Pena, G.F., Ribeiro, R. M., da Conceição Silva, T.R., Pereira, M.G., Scapim, C.A., Viana, A.P., de Carvalho, G.F. (2013) UENF 14: A new popcorn cultivar. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13:218–220.
- Arnhold, E. (2008). Seleção para resistência a doenças foliares em famílias S 1 de milho-pipoca. *Ceres*, 55:89–93.
- Berbee, M.L., Pirseyedi, M., Hubbard, S. (1999) Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91: 964–977.
- Bhunjun, C.S., Dong, Y., Jayawardena, R.S., Jeewon, R., Phukhamsakda, C.,

- Bundhun, D., Hyde, K.D., Sheng, J. (2020) A polyphasic approach to delineate species in *Bipolaris*. *Fungal Diversity*, 102:225–256.
- Box, G.E.P., Cox, D.R. (1964) An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society*, 26:211–252.
- Bruns, H.A. (2017) Southern corn leaf blight: A story worth retelling. *Agronomy Journal*, 109:1218–1224.
- Camargo, L.E.A. (2018) Controle genético. In L. Amorim, J. A. M. Rezende, e A. Bergamin Filho (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 5. ed. Agronômica Ceres. p. 229–238.
- Castellani, A. (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42:225–226.
- Cruz, C.D. (2013) GENES - Software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 35:271–276.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32:1792–1797.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y. (2020) *Fungal databases*. National Fungus Collections. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 11/12/2000.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A. (2014). ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). *Applied Mathematics*, 05:2952–2958.
- Freitas, R.E. (2017) Expansion of agricultural areas in Brazil from 1994 to 2013: soybeans versus corn versus cotton. *Organizações Rurais e Agroindustriais*, 19:219–232.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1323–1330.
- Hepperle D (2011) DNA Dragon 1.4.1 - DNA Sequence Contig Assembler Software.
- Hernández-Restrepo, M., Madrid, H., Tan, Y. P., da Cunha, K.C., Gené, J., Guarro, J., Crous, P.W. (2018) Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41:71–108.
- Hussain, H., Raziq, F., Khan, I., Shah, B., Ullah, W., Naeem, A., Adnan, M.,

- Junaid, K., Rizwan, S., Shah, A., Iqbal, M. (2016) Effect of *Bipolaris maydis* (Y. Nisik C. Miyake) shoemaker at various growth stages of different maize cultivars. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4:439–444.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. (2021). *Produção Agrícola Municipal*. <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612#resultado>
- Kist, B.B. (2019) *Anuário brasileiro do milho 2019*. Santa Cruz: Gazeta. 72p.
- Kunhao, Y., Guoshu, G., Xiaobo, Q., Jichao, Y., Chunxian, J., Xiaofang, S., Yiyu, W., Jizhi, Y. (2015) Effect of cultivation measures on sheath blight and southern leaf blight of corn. *Plant Prot*, 1:154–159.
- Kurosawa, R. do N.F., Vivas, M., Junior, A.T. do A., Ribeiro, R.M., Miranda, S. B., Pena, G.F., Leite, J.T., Mora, F. (2018) Popcorn germplasm resistance to fungal diseases caused by *Exserohilum turcicum* and *Bipolaris maydis*. *Bragantia*, 77:36–47.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Hyde, K.D. (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity*, 56:131–144.
- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. (2014) The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 82:137–217.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J. Z., L. Cai, Q. C., Marincowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., U. Braun, E., Camporesi, Damm, U., Beer, Z. W. de, Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernandez-Restrepo, M., Hyde, K. D., Jayawardena, R. S., Lombard, L., Luangsa-ard, J., McTaggart, A. R., Crous, P. W. (2017) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1 STUDIES. *Studies in Mycology*, 86:99–216.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Crous, P. W. (2020) Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*, 19: 559–588.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
- Mubeen, S., Rafique, M., Munis, M.F.H., Chaudhary, H.J. (2017) Study of southern corn leaf blight (SCLB) on maize genotypes and its effect on yield.

- Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16:210–217.
- Nei, M., Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, 333 p.
- Pacheco, C.A.P., Gama, E.E.G., Parentoni, S. N., Manuel dos Santos, Lopoos, M.A., Ferreira, A. da S., Fernandes, F.T., Guimarães, P.E. de O., Fernandes, L.A.C., Meireles, walter F., Feldman, R. O., Magnavaca, R. (2001) *BRS-Ângela - variedade de milho-pipoca*. Embrapa Milho e Sorgo- Comunicado Técnico.
- Pinho, D., Dutra, D., Pereira, O. (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38:152–157.
- Posada, D., Buckley, T. (2004) Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics : Advantages of Akaike. *Syst. Biol.*, 53:793–808.
- R Core Team. (2016) *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. Foundation for Statistical Computing.
- Rambaut, A. (2009) FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Rambaut, A., Drummond A.J (2013) Tracer v1.6. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rannala, B., Yang, Z. (1996) *Probability Distribution of Molecular Evolutionary Trees: a new method of phylogenetic inference*. *Journal of molecular evolution*, 43:304–311.
- Saluci, J.C.G., Vivas, M., Almeida, R.N. de, Dutra, I.P., Carlos, M.C., Júnior, A. T. do A., Scapim, C.A. (2020) Potential of popcorn S4 lines for resistance to southern corn leaf. *Functional Plant Breeding Journal*, 2:79–87.
- Santos, J.S., de Souza, Y.P., Vivas, M., do Amaral Junior, A.T., de Almeida Filho, J.E., Mafra, G.S., Viana, A.P., Gravina, G.A., Ferreira, F.R.A. (2020). Genetic merit of popcorn lines and hybrids for multiple foliar diseases and agronomic properties. *Functional Plant Breeding Journal*, 2:36-47.
- Sweley, J.C., Rose, D.J., Jackson, D.S. (2013) Quality Traits and Popping Performance Considerations for Popcorn (*Zea mays* Everta). *Food Reviews International*, 29:157–177.
- Tan, Y.P., Madrid, H., Crous, P.W., Shivas, R.G. (2014) *Johnalcornia* gen. et. comb. nov., and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology*, 43:589–603.

Turgeon, B.G., Baker, S.E. (2007) Genetic and Genomic Dissection of the *Cochliobolus heterostrophus* Tox1 Locus Controlling Biosynthesis of the Polyketide Virulence Factor T-toxin. *Advances in Genetics*, 57:219–261.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOMOLECULAR E PATOLÓGICA DE *EXSEROHILUM* EM MILHO-PIPOCA

RESUMO

Fungos fitopatogênicos do gênero *Exserohilum* são encontrados principalmente em *Poaceae*, como o milho. Para a identificação correta do patógeno é necessário investigar quais espécies de *Exserohilum* estão associadas à mancha-foliar na cultura do milho. Diante disso, objetivou-se identificar as espécies de *Exserohilum* que estão associados à mancha-foliar e a avaliação da patogenicidade dos isolados. Para tal, amostras com sintomas de mancha-foliar foram coletadas em lavouras de milho em cinco Estados brasileiros. Após a coleta, isolamento e purificação das culturas monospóricas, os isolados fúngicos foram cultivados em meio BDA e, após 13 dias, foram avaliados a coloração da colônia predominante; o aspecto do micélio; a forma da margem das colônias e o crescimento micelial; a dimensão dos conídios; bem como a patogenicidade e posicionamento filogenético. Nove isolados de *Exserohilum* foram obtidos e identificados em lavouras de milho. As diferenças morfológicas não possibilitaram a formação de grupos em relação às espécies, por isso, são indicadas análises baseadas em dados moleculares para identificação em nível de espécies. A análise filogenética concatenada das regiões de ITS e GAPDH

foi realizada por meio da inferência bayesiana, utilizando 36 táxons, sendo que nove foram oriundos desta pesquisa. Os isolados de *E. turcicum* foram coletados no Estado do Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A espécie *E. rostratum* foi amostrada apenas no Rio de Janeiro. A patogenicidade foi caracterizada diante da reação de sintomas em linhagem L55 de milho-pipoca, inoculados com os isolados selecionados. Após a inoculação dos diferentes isolados, todos foram patogênicos e demonstraram capacidade semelhante de infectar e causar doença na linhagem L55 de milho-pipoca, independente da região de coleta do isolado.

Palavras-chave: Fungos fitopatogênicos; Mancha-foliar; Milhos especiais.

ABSTRACT

Phytopathogenic fungi of the *Exserohilum* genus are found mainly in Poaceae, such as corn. For the correct identification of the pathogen, it is necessary to investigate which species of *Exserohilum* are associated with leaf spot in corn. Therefore, the objective was to identify the species of *Exserohilum* that are associated with leaf spot and evaluate the pathogenicity of the isolates. For this purpose, samples with symptoms of leaf spots were collected from corn plantations in five Brazilian states. After collection, isolation and purification of monosporic cultures, the fungal isolates were cultivated in PDA medium and, after 13 days, the color of the predominant colony was evaluated; the appearance of the mycelium; the shape of the colony margin and mycelial growth; the dimension of the conidia; as well as pathogenicity and phylogenetic positioning. Nine *Exserohilum* isolates were obtained and identified in cornfields. The morphological differences did not allow the formation of groups in relation to the species, therefore, analyzes based on molecular data for identification at the species level are indicated. The concatenated phylogenetic analysis of the ITS and GAPDH regions was carried out using Bayesian inference, using 36 taxa, nine of which came from this research. Isolates of *E. turcicum* were collected in the State of Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The species *E. rostratum* was sampled only in Rio de

Janeiro. The pathogenicity was characterized by the reaction of symptoms in the popcorn line L55, inoculated with the selected isolates. After the inoculation of the different isolates, all were pathogenic and had a similar capacity to infect and cause diseases in the L55 line of popcorn, regardless of the region where the isolate was collected.

Keywords: Phytopathogenic fungi; Leaf spot; Special corns.

INTRODUÇÃO

O gênero *Exserohilum* inclui uma série de fungos patogênicos em plantas, causadores de manchas foliares, assim como os gêneros *Bipolaris* e *Curvularia* (Manamgoda et al., 2014; Hernández-Restrepo et al., 2018). Os patógenos conhecidos atualmente como *Bipolaris*, *Curvularia* e *Exserohilum*, por muito tempo eram incluídos em um único gênero, o *Helminthosporium*, por compartilharem características morfológicas em comum (Shoemaker, 1959).

O gênero *Exserohilum* foi proposto como um novo gênero apenas em 1974. As novas espécies de *Exserohilum* propostas tinham conídios com hilos protuberantes, sendo essa uma das características morfológicas mais marcantes no gênero (Leonard e Suggs, 1974). As espécies de *Exserohilum* são encontradas principalmente em *Poaceae* - tais como milho, arroz, sorgo -, mas já foram relatadas em vários gêneros de plantas. Dentre as espécies que infectam o milho, encontram-se *Exserohilum turcicum* (Passe.) (Leonard e Suggs, 1974) e *E. rostratum* (Drechsler) (Leonard e Suggs, 1974).

A espécie *E. turcicum* provoca a doença conhecida como mancha de Turcicum, queima de Turcicum ou *northern leaf blight of corn* (NLBC) a qual é caracterizada por lesões foliares necróticas alongadas, de cor de palha e acinzentada que pode levar à morte do tecido foliar. Quando a doença ocorre em genótipos suscetíveis, pode reduzir o rendimento da cultura em até 92% (Singh et al., 2019; Badu-Apraku et al., 2021). A doença se desenvolve, especialmente, em regiões de clima tropical e subtropical, com temperatura moderada $\pm 20^{\circ}\text{C}$, alta umidade (67 – 91%) e com período de orvalho no mínimo de 5 h. O uso de variedades resistentes é a estratégia mais importante

para controlar a doença (Sabato et al., 2013; Nwanosike e Mabagala, 2017; Singh et al., 2019).

A espécie *E. rostratum* é a mais comum das espécies registradas e conhecidas do gênero, e tem uma ampla gama de hospedeiros vegetais. A espécie provoca mancha-foliar além do milho, em trigo, banana entre outras. Os sintomas típicos são manchas foliares pequenas, de cor parda avermelhada, que coalescem e tornam a folha seca (McGinnis et al., 1986; Hernández-Restrepo et al., 2018; Farr e Rossman, 2020).

Em condições de campo, os sintomas de mancha-foliar em milho, provocados por diferentes espécies de fungos, podem ser confundidos entre si. Isso torna mais difícil a identificação do patógeno, baseada apenas na sintomatologia (Sun et al., 2020). Para traçar medidas de controle eficientes em cultivos de milho, a correta identificação dos patógenos é uma etapa decisiva. Para tal, é indicado o uso de dados moleculares (Marin-Felix et al., 2019).

As análises baseadas em dados moleculares podem identificar nível de espécie o patógeno. Alguns marcadores moleculares individuais são usados como código de barras para *Exserohilum*. Para o gênero é recomendado o uso de dados moleculares multilocus para rápida diferenciação de espécies via PCR - *polymerase chain reaction* (Hernández-Restrepo et al., 2018).

Diante do problema destacado acima, sobre a importância de identificação da espécie, é necessário investigar quais espécies de *Exserohilum* estão associadas à mancha-foliar na cultura do milho. Diante disso, objetivou-se identificar as espécies de *Exserohilum* que estão associados à mancha-foliar e a avaliação da patogenicidade dos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e manutenção dos isolados

Amostras de folhas de milho comum sintomáticas foram coletadas e identificadas de acordo com a procedência da coleta, que foram os Estados do Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. O

material vegetal obtido foi encaminhado à Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF para isolamento do patógeno, caracterização, manutenção da cultura e armazenamento.

O procedimento de isolamento dos fungos foi realizado pelo método direto, como descrito por Alfenas et al. (2016). O método consiste em focalizar, sob microscópio estereoscópico, em amostras de folhas com sintomas, as estruturas do patógeno e transferir o fragmento desejado para uma placa com o meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA).

Posteriormente, foram obtidas culturas puras a partir do isolamento com ponta de hifa. Esse procedimento consiste em retirar das bordas da colônia as pontas das hifas mais isoladas e, logo em seguida, depositá-las em uma nova placa contendo meio BDA.

O crescimento foi em câmara de germinação tipo “BOD”, em temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h de luz. Cada isolado foi armazenado em tubos contendo água destilada esterilizada – método Castellani (Castellani, 1939) e em placas de Petri congeladas a - 18 °C.

Caracterização morfológica

Para a caracterização morfológica, discos de 6mm de diâmetro, contendo estruturas de cada isolado, foram depositados no centro da placa de Petri, com meio de cultura BDA, e incubados por 13 dias em BOD a ± 25 °C, em regime 12h luz. As características avaliadas foram: a coloração da colônia predominante, o aspecto do micélio, a forma da margem das colônias e o crescimento micelial que foi mensurado a partir do diâmetro diário das colônias em duas direções ortogonais, obtendo-se uma média para cada uma das quatro repetições por isolado.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas até o momento em que o primeiro isolado atingiu a borda da placa (13 dias). Foram avaliadas quatro repetições, considerando cada placa de Petri ($\varnothing=90$ mm) uma repetição, determinando-se assim, o índice de velocidade crescimento micelial do fungo –

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

IVCM (cm/dia), conforme a fórmula:

Sendo: D: o diâmetro médio da colônia no dia da medição; Da: o diâmetro médio da colônia do dia anterior; e, N: número de dias após a inoculação.

As características micromorfológicas (comprimento e largura) foram mensuradas a partir das dimensões de 30 conídios/isolado. Para o número de septos, foi realizada a contagem, anotando a predominância e a variação de número de septos (máximo e mínimo) em cada conídio. As estruturas dos conídios foram observadas e fotografadas em um microscópio Nikon E-400 equipado com uma câmera digital.

Os dados foram testados quanto à normalidade de resíduos, pelo teste Shapiro-Wilk, e homogeneidade de variâncias pelo teste de Oneill e Mathews ($p < 0,05$). As variáveis que não atenderam aos pressupostos para análise de variância foram transformadas via aplicação da equação de Box e Cox (Box e Cox, 1964). Posteriormente, após as pressuposições serem atendidas, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo algoritmo de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2014) do programa R (R Core Team, 2016).

Caracterização molecular

Extração de DNA e sequenciamento

O DNA genômico de cada fungo foi obtido de acordo com o protocolo de extração descrito por Pinho et al., (2013), utilizando o kit de purificação da Promega (*WizardGenomic DNA Purification Kit*). A quantificação ocorreu utilizando fluorimetria (Qubit®), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração e quantificação, o DNA permaneceu armazenado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização.

A PCR das regiões espaçador interno transcrito (ITS – do inglês *internal transcribed spacers*) e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH - *glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*) foi amplificada usando *primer* e as condições estabelecidas por Manamgoda et al. (2012).

Nas reações de amplificação para ITS, utilizaram-se os *primers* ITS: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Glass e Donaldson, 1995). No termociclador, as condições foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3'; e 30 ciclos com desnaturação a 94° C por 30", anelamento a 55° C por 30", extensão a 72° C por 1'; e a extensão final por período a 72 °C por 10'.

Para a região de GPDH utilizaram-se os *primers* GPD1 5'-CAA CGGCTTCGGTTCGCATTG-3' e GPDH2 5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTG C-3' (Berbee et al., 1999). As condições utilizadas no termociclador foram: desnaturação inicial a 96 °C por 2'; e 30 ciclos com desnaturação a 96° C por 2', anelamento a 52° C por 1', extensão a 72° C por 1'; e a extensão final por período a 72 °C por 10 '.

No termociclador (Veriti® *Thermal Cycler*) amplificaram-se os fragmentos de DNA. Cada reação continha: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1.0 U de Taq polimerase, 0,2 µM de *primers*, 0.2 mM de cada dNTP, 1.0 mM de MgCl₂, com o volume final de 25 µl. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

Os produtos da PCR ficaram incubados em um termobloco por duas horas a 60 °C até a secagem completa e, então, encaminhada para a empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil), onde se realizou a purificação e o sequenciamento.

De posse das sequências de nucleotídeos, as mesmas foram editadas e corrigidas manualmente, quando necessárias, com auxílio do *software* DNA Dragon (Hepperle, 2011). O arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas, também foi corrigido utilizando as sequências dos *primers* no sentido 5'-3' e 3'-5'.

Para identificação dos isolados de *Exserohilum*, foram obtidas as sequências das regiões de ITS e GAPDH (Hernández-Restrepo et al., 2018; Sun et al., 2020), que estão depositados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 1).

Tabela 1. Números de acesso do GenBank de sequências de DNA de *Exserohilum* usadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Local	ITS	GAPDH	Referência
<i>E. corniculatum</i>	BRIP 11426*	Oryza sativa	Austrália	LT837453	LT883533	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. holmii</i>	BRIP 12679	Dactyloctenium radulnas	Austrália	LT837846	LT882542	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. holmii</i>	CBS 413.65*	Dactyloctenium radulnas	EUA	LT837459	LT715890	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. khartoumensis</i>	IMI 249194*	Sorghum bicolor	Sudão	LT837461	LT715888	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. minor</i>	BRIP 14615	Dactyloctenium aegyptium	Austrália	LT837469	LT883544	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. minor</i>	BRIP 14616*	Dactyloctenium aegyptium	Austrália	LT837470	LT883545	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. monoceras</i>	BRIP 12271*	Echinochloa colona	Austrália	LT837475	LT883548	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. monoceras</i>	CBS 198.29	Echinochloa crus-gali	Japão	LT837853	LT882534	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. neoregeliae</i>	CBS 132832*	<i>Neoregelia carolinae</i>	Japão	LT837476	LT715886	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. neoregeliae</i>	CBS 132833	<i>Neoregelia carolinae</i>	Japão	LT837477	LT715887	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Oryzicola</i>	CBS 502.90*	<i>Oryza sativa</i>	Colômbia	HF934949	LT715878	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Oryzicola</i>	BRIP 16229	<i>Echinochloa crus-gali</i>	Austrália	LT837455	LT715877	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. pedicellatum</i>	CBS 322.64*	<i>Triticum aestivum</i>	EUA	KT265258	LT715902	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. pedicellatum</i>	CBS 375.76	<i>Oryza sativa</i>	Turquia	KT265259	LT715879	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. protrudens</i>	BRIP 14814*	Dactyloctenium aegyptium	Austrália	LT631308	LT715880	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. protrudens</i>	BRIP 14816	Dactyloctenium aegyptium	Austrália	LT631309	LT715881	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. rostratum</i>	CBS 325.87*	<i>Homo sapiens</i>	EUA	KT265237	LT715898	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. rostratum</i>	CF/UENF 500	<i>Zea mays</i>	Sudeste - BR	MZ541097	MZ541097	Este estudo
<i>E. Turcicum</i>	BRIP 12267	<i>Sorghum bicolor</i>	Austrália	LT837482	LT883553	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	BRIP 13326	<i>Sorghum sudanense</i>	Austrália	LT837480	LT883551	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CBS 195.26	<i>Zea mays</i>	Indonésia	LT837485	LT882583	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CBS 384.58	<i>Zea mays</i>	EUA	LT837481	LT883552	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CBS 330.64	<i>Zea mays</i>	EUA	LT837484	LT715874	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CBS 385.58	<i>Zea mays</i>	EUA	LT837488	LT715873	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CBS 386.58	<i>Sorghum halepense</i>	EUA	LT837486	LT882582	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CBS 387.58	<i>Zea mays</i>	EUA	LT837483	LT883554	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CBS 690.71*	<i>Zea mays</i>	Alemanha	LT837487	LT882581	Hernández-Restrepo et al., 2018
<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 480	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541091	MZ541091	Este estudo
<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 483	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541092	MZ541092	Este estudo
<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 487	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541093	MZ541093	Este estudo

<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 489	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541094	MZ541094	Este estudo
<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 490	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541095	MZ541095	Este estudo
<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 491	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541096	MZ541096	Este estudo
<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 504	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541098	MZ541098	Este estudo
<i>E. Turcicum</i>	CF/UENF 507	<i>Zea mays</i>	Brasil	MZ541099	MZ541099	Este estudo

ITS = *internal transcribed spacer*; GPDH = *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.
 CF/UENF = Coleção da Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. *Espécie tipo.

Filogenia

As sequências consenso dos isolados oriundos nesta pesquisa foram comparadas com as presentes no banco de dados do GenBank, para fazer uma rápida identificação molecular por meio de uma ferramenta de pesquisa e alinhamento, o BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al., 1990). Após essa etapa, as sequências foram adicionadas ao conjunto de sequências, obtido no Genbank e exportado para o *software* MEGA v. 7 (Nei e Kumar, 2000), onde foram alinhadas por meio da ferramenta MUSCLE *Multiple Sequence Alignment* (Edgar, 2004).

A análise final concatenada da inferência bayesiana para o gênero foi gerada na plataforma CIPRES *Science Gateway* (Miller et al., 2010). Os modelos de substituição nucleotídica para a análise filogenética foram calculados independentemente para cada região e para a concatenada usando o *MrModeltest* (Posada e Buckley, 2004) e selecionados de acordo com *Akaike Information Criterion* (AIC) implementado no PAUP v. 4.0b10.

A análise filogenética para cada gene e para a árvore concatenada foi gerada por meio da inferência bayesiana, usando o Método da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Duas análises simultâneas, cada uma composta por quatro cadeias MCMC, foram conduzidas iniciando as árvores aleatoriamente até 10^7 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações, resultando em 10.000 árvores e descartadas da análise as primeiras 2500. O valor de probabilidade a posteriori (Rannala e Yang, 1996) da árvore consenso foi calculado baseado nas 7500 árvores restantes.

A convergência dos logs de verossimilhança foi analisada com o *software* TRACER v. 1.4.1 (Rambaut e Drummond 2013). A árvore foi visualizada no *software* FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2009) e exportada para um programa editor de imagem. A espécie *Curvularia lunata* CBS 730.96 foi utilizada como grupo externo (*outgroup*) nas análises.

Avaliação patológica dos isolados em condições controladas

Para realizar a avaliação da capacidade patológica dos isolados, foi selecionado um isolado de cada espécie por região e foram inoculadas na

linhagem L55, caracterizada previamente como suscetível (Kurosawa et al., 2018).

As sementes de milho-pipoca foram semeadas em vasos plásticos contendo 3L de solo:areia:esterco de curral na proporção 2:1:1. Após a emergência, foi realizado o desbaste, permanecendo duas plântulas por vaso, as quais continuaram na casa de vegetação até atingirem o estágio fenológico V4 (quarta folha expandida, apresentando colar, lígula e aurículas visíveis).

Após esse período, as plantas foram alocadas em câmaras de crescimento para um melhor controle ambiental com umidade de $\pm 90\%$, temperatura de $\pm 20^\circ\text{C}$ e regime de luz 12h. A suspensão de conídios foi ajustada, com auxílio de um hemocítmetro, para a concentração de 1×10^3 conídios/mL. A inoculação com a suspensão de esporos foi realizada de forma manual até o ponto de escorrimento nas folhas (Turgay et al., 2020).

Para verificar o início dos sintomas e o desenvolvimento da doença, as avaliações ocorreram diariamente, caracterizando visualmente a presença dos sintomas até o 14º dia. O experimento foi realizado em câmara climatizada, com temperatura de $\pm 25^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar acima de 90%. O delineamento estatístico adotado foi em blocos casualizados com quatro repetições, cada vaso foi considerado uma unidade experimental, com duas plantas em cada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características morfológicas

Os isolados de *Exserohilum* foram obtidos e identificados em cultivo de milho comum no Brasil, e pertencem a duas espécies: *E. rostratum* e *E. turcicum*. A espécie *E. turcicum* foi amostrada nos Estados do Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Já, a espécie *E. rostratum* foi coletada apenas no Rio de Janeiro (Tabela 2).

Tabela 2. Informações dos isolados de *Exserohilum* em milho comum coletados em diferentes regiões do Brasil.

Isolado	Espécie	Data de coleta	Local de coleta (Cidade / Estado)	Localização (GPS)
CF/UENF 480	<i>E. turcicum</i>	Set/2018	Crato – CE	7°15'23.2"S 39°18'14.4"W
CF/UENF 483	<i>E. turcicum</i>	Jan/2019	Muitos Capões – RS	28°19'05.1"S 51°10'42.9"W
CF/UENF 487	<i>E. turcicum</i>	Jan/2019	Vacaria – RS	28°30'38.5"S 50°56'10.4"W
CF/UENF 489	<i>E. turcicum</i>	Jan/2019	Muitos Capões – RS	28°19'05.1"S 51°10'42.9"W
CF/UENF 490	<i>E. turcicum</i>	Jan/2019	Campos Novos – SC	27°23'46.7"S 51°13'20.8"W
CF/UENF 491	<i>E. turcicum</i>	Out/2017	Alegre – ES	20°45'28.4"S 41°27'17.7"W
CF/UENF 500	<i>E. rostratum</i>	Mar/2018	Campos dos Goytacazes-RJ	21°41'45.6"S 41°14'59.0"W
CF/UENF 504	<i>E. turcicum</i>	Nov/2018	Campos dos Goytacazes-RJ	21°41'45.6"S 41°14'59.0"W
CF/UENF 507	<i>E. turcicum</i>	Mar/2019	Itaocara – RJ	21°40'42.0"S 42°05'41.1"W

Na variável índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), por meio da análise de variância, foi observada diferença significativa entre os isolados de *Exserohilum*. Nesta variável, os isolados foram agregados em quatro grupos. Para o número de septos, comprimento e largura dos conídios, ocorreu a contagem e descrição do intervalo dos mesmos. Para as espécies de *E. turcicum*, o comprimento dos conídios variou de 26.68 a 158.39 μm , e a largura de 8.66 a 22.37 μm . Em relação ao número de septos, independente da espécie, o número de septos predominante foi 4 ou 5 (Tabela 3). Essas variações nas características morfológicas estão de acordo com as descritas na literatura (Hernández-Restrepo et al., 2018; Turgay et al., 2020).

Tabela 3. Características morfológicas de nove isolados *Exserohilum* presentes em lavouras de milho, avaliados após 13 dias de incubação.

Isolados	IVCM*	Conídios		Número de septos
		Comprimento (µm)	Largura (µm)	
CF/UENF 480	3.19 c	81.14 - 43.28	9.94 - 15.43	4 (3 - 6)
CF/UENF 483	4.39 b	88.04 - 32.98	10.67 - 16.28	4 (2 - 6)
CF/UENF 487	3.59 c	110.65 - 68.45	12.57 - 17.47	5 (4 - 7)
CF/UENF 489	4.67 b	107.96 - 41.05	8.66 - 18.73	5 (4 - 6)
CF/UENF 490	2.81 c	102.96 - 41.67	10.23 - 18.47	4 (4 - 5)
CF/UENF 491	2.01 d	84.48 - 45.37	11.33 - 16.62	5 (3 - 8)
CF/UENF 500*	6.20 a	59.11 - 26.68	10.56 - 19.59	5 (3 - 7)
CF/UENF 504	4.70 b	100.63 - 53.54	11.57 - 18.30	4 (3 - 6)
CF/UENF 507	3.95 b	158.39 - 39.23	10.81 - 22.37	4 (3 - 6)
CV (%)	21.29			

* *E. rostratum*; **Índice de velocidade de crescimento micelial.

Médias seguidas da mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

As características morfoculturais foram avaliadas de forma descritiva. Em meio BDA, aos 13 dias de cultivo, para os isolados de *E. turcicum*, foram observadas que a textura da colônia era cotonosa; a coloração variou de cinza oliva à cinza esverdeado na frente da colônia, e cinza escuro no verso; borda majoritariamente irregular, com predominância de micélio aéreo. Foi observada a formação de zonas. O isolado CF/UENF 500 foi o único que teve o crescimento da colônia máximo, ou seja, atingiu a borda da placa durante o período da avaliação. A esporulação do isolado, aos 13 dias após a incubação, foi pouca.

Nas características micromorfológicas foram identificados conídios com formato fusiforme levemente curvado, as dimensões (comprimento e largura) variaram de 26.68 – 158.39 x 8.66 – 22.37 µm; coloração marrom-clara, com presença de quatro septos em média (variando de 3 a 8); presença de hilo proeminente; os conidióforos septados, visualizados individualmente ou em pequenos grupos, com formatos retos ou sinuosos com coloração variando de marrom clara à escura, sendo no ápice mais claro (Figura 1).

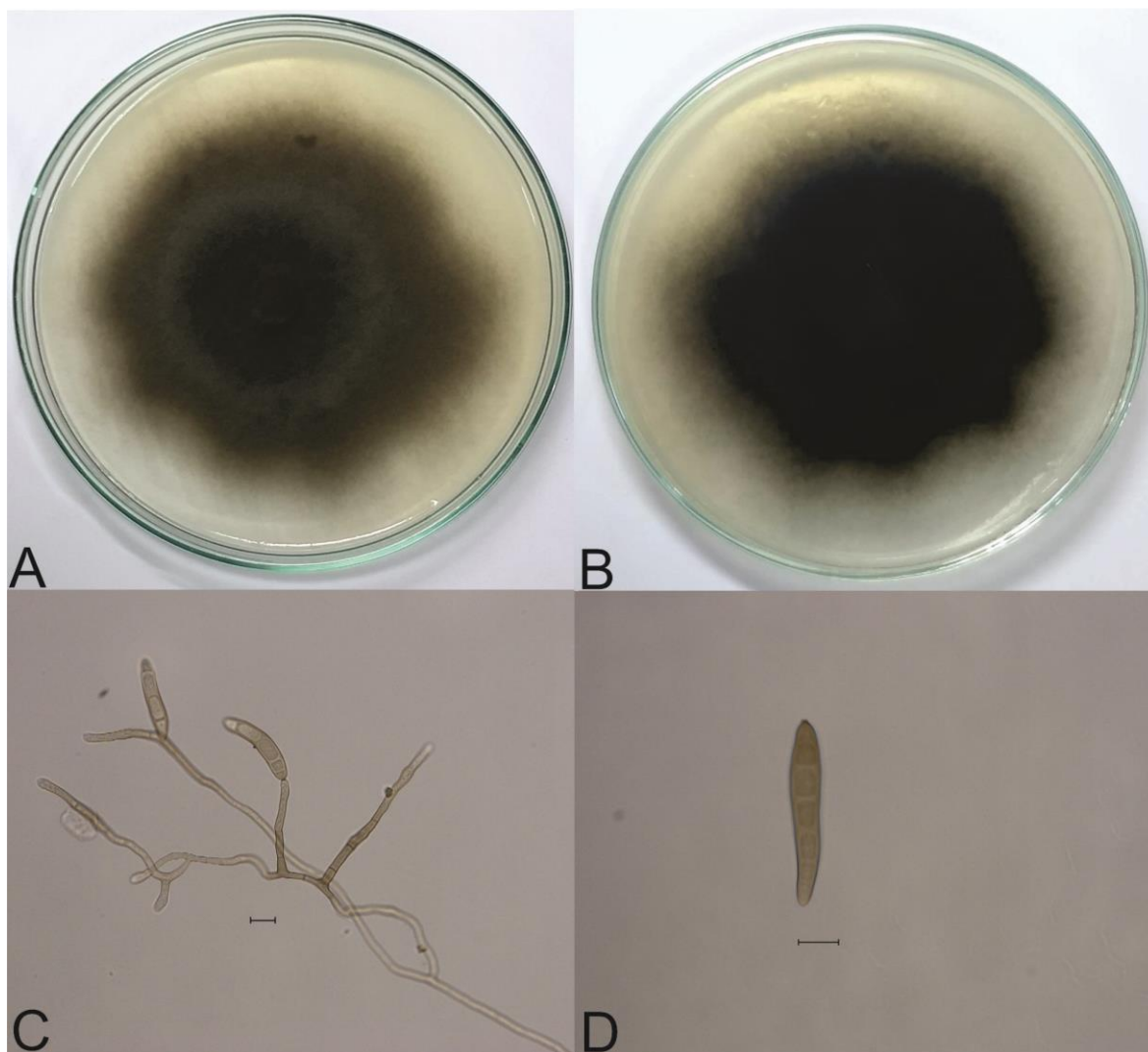


Figura 1. Aspecto morfológico do isolado de *Exserohilum turcicum* (CF/UENF 490). (A) Frente e (B) verso das colônias em BDA 13 dias a 25°C; (C) conídios e conidióforos; (D) conídios individuais. Barras de escala (C e D) = 20 μm .

Nos isolados de *E. rostratum* observados em meio de cultura BDA aos 13 dias, as características morfoculturais observadas foram a coloração cinza esverdeado escuro na frente da colônia, e preto no verso; presença de zonas; borda predominantemente irregular e com textura aveludada. As observações micromorfológicas permitiram identificar conídios distoseptados com formato fusiforme, retos e suavemente curvos, e as dimensões médias variaram de 26.68 – 59.11 x 10.56 – 19.59 μm , com coloração marrom-escuro, tornando-se mais clara próxima ao ápice. Os conidióforos septados, únicos, com formato reto ou flexuoso, não ramificados, exibindo coloração marrom-escuro. O número de septos, entre os isolados, variou de 3 a 7, e foi observada a presença de hilo proeminente (Figura 2).

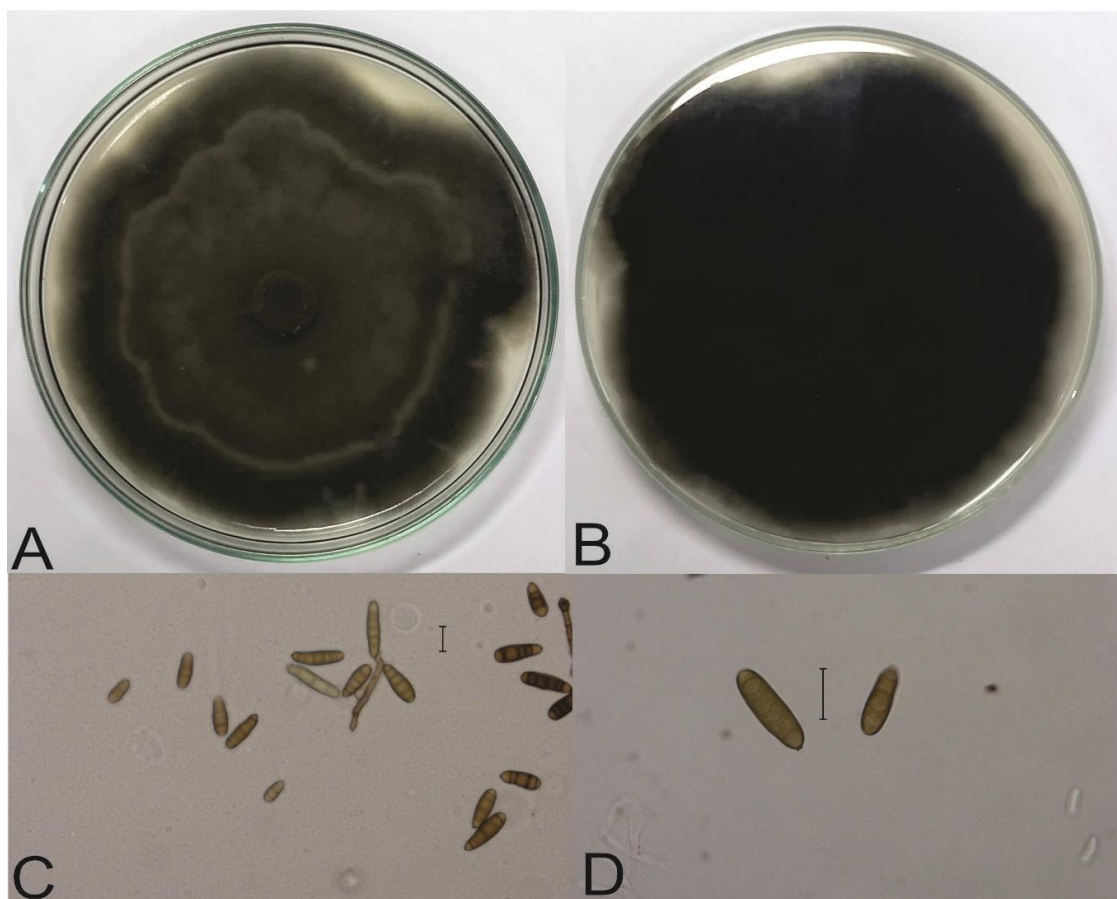


Figura 2. Aspecto morfológico do isolado de *Exserohilum rostratum* (CF/UENF 500). (A) Frente e (B) verso das colônias em BDA 13 dias à 25°C; (C) conídios e conidióforos; (D) conídios individuais. Barras de escala (C e D) = 20 μm.

As espécies de *E. rostratum* mostram tamanho de conídios relativamente menor quando comparadas com as espécies de *E. turcicum*. A textura da colônia de ambas as espécies difere entre si, sendo cotonosas nos isolados de *E. turcicum* e aveludada para *E. rostratum*. Foi observado, também, que a coloração das hifas, conídios e conidióforos, era castanho mais escuro na espécie *E. rostratum*.

Uma característica micromorfológica que diferencia as espécies do gênero *Exserohilum* de outros próximos como *Bipolaris* e *Curvularia* é a presença de hilo protuberante (Leonard e Suggs, 1974). Isso foi observado em todos os isolados tanto de *E. turcicum* e quanto no isolado de *E. rostratum*. No entanto, na prática ressalta-se que essa não é uma característica facilmente detectada, o que dificulta mais ainda a identificação baseada em morfologia. Em relação às características da cultura, as colônias de *Exserohilum* detêm coloração cinza

esverdeada, já os isolados que pertencem à *Bipolaris* têm coloração cinza escura (Marin-Felix et al., 2017; Marin-Felix et al., 2019).

As dimensões (comprimento e largura) dos conídios das espécies de *E. Turcicum* quando comparadas com as espécies de *B. maydis*, são ligeiramente maiores, há pouca variação em relação ao número de septos (4-5) e a esporulação não é tão abundante (Manamgoda et al., 2014; Hernández-Restrepo et al., 2018). Mesmo diante dessas observações, para a correta identificação a nível de espécies, é necessário o uso de ferramentas baseadas em dados moleculares, biotecnológicos e de bioinformática.

Para confirmar a presença do patógeno *E. turcicum* em diferentes regiões da Turquia, empregaram-se ferramentas baseadas em sequências de DNA para validar a identificação morfológica (Turgay et al., 2020). Isso sugere que ambas as ferramentas devem ser usadas de forma conjunta, contudo, sabe-se que apenas a análise a nível molecular é capaz de distinguir a espécie dentro do gênero (Hernández-Restrepo et al., 2018).

Devido à variabilidade das características morfológicas, as espécies de *Exserohilum* podem ser facilmente confundidas entre si, ou até mesmo, com gêneros diferentes (Hernández-Restrepo et al., 2018). Considerando que neste trabalho as diferenças morfológicas não possibilitaram a diferenciação a nível de espécies, são então, indicadas análises moleculares para distingui-las.

Caracterização molecular

A análise filogenética concatenada das regiões de ITS e GAPDH foi realizada por meio da inferência bayesiana, realizada com 36 táxons, sendo nove oriundos desta pesquisa: CF/UENF 480, CF/UENF 483, CF/UENF 487, CF/UENF 489, CF/UENF 490, CF/UENF 491, CF/UENF 500, CF/UENF 504 e CF/UENF 507. O alinhamento das sequências resultou em um total de 924 caracteres, destes, 75% foram conservados, 18% variáveis e 14% foram informativos para parcimônia.

Tabela 4. Propriedade do alinhamento das sequências de DNA para o gênero *Exserohilum* e modelo de substituição nucleotídica por região do gene (ITS e GAPDH) e para o concatenado (ITS+GAPDH).

	ITS	GAPDH	ITS+GAPDH
Número de caracteres	443	481	924
Sítios conservados	347	348	695
Sítios variáveis	87	79	166
Sítios informativos de parcimônia	58	56	144
Modelos de substituição nucleotídica	HKY+G	HKY+G	HKY+G
Conteúdo AT (%)	52.1	42	47.1
Conteúdo CG (%)	47.9	58	52.9

ITS = internal transcribed spacer; GPDH = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Os resultados mostraram a presença de duas espécies em lavouras de milho nas regiões avaliadas pelo Brasil: *E. rostratum* e *E. turcicum*. Dos nove analisados táxons resultantes desta pesquisa, oito pertencem à espécie *E. turcicum*. O maior clado da árvore incluía 17 isolados e pertence à essa espécie. Os oito isolados de *E. turcicum* ficaram agrupados, em um clado junto com sua espécie tipo (CBS 690.71). No clado da espécie *E. rostratum*, é possível observar o isolado CF/UENF 500 e sua espécie tipo (CBS 325.87). O suporte de ramo para ambos os cladogramas mostra o valor de probabilidade a posteriori (pp) igual a 1, portanto, uma excelente confiabilidade de ramo (Figura 3).

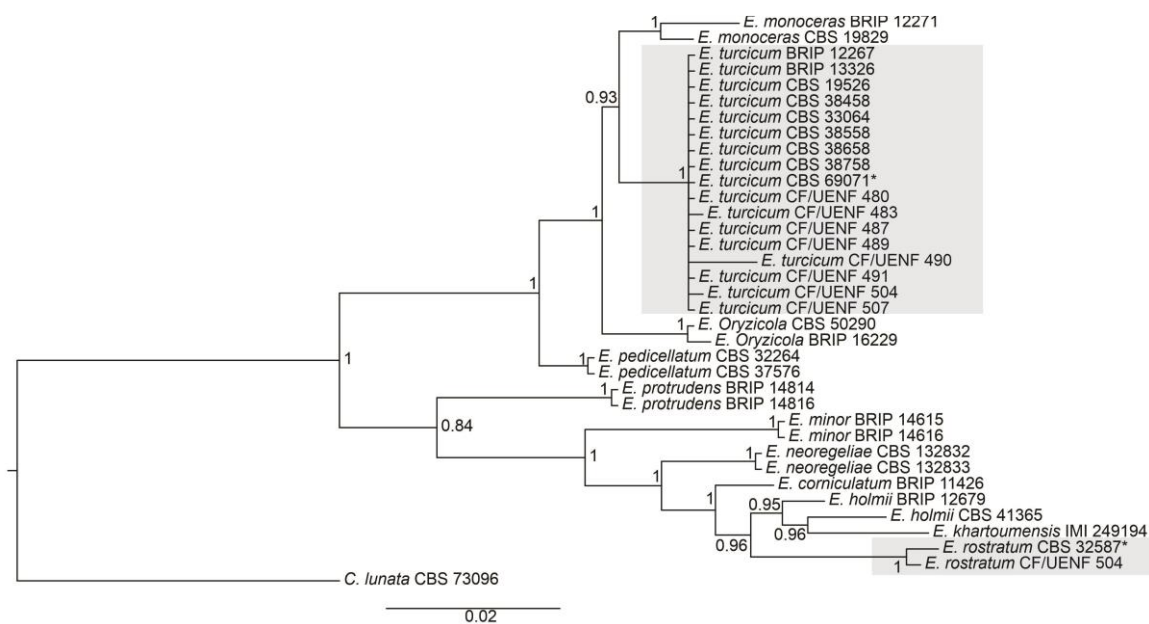


Figura 3. Filograma multilocus baseado na inferência bayesiana composto da combinação das sequências dos genes ITS e GAPDH de isolados de *Exserohilum* em milho. Valores de probabilidade posterior (pp) bayesiana estão indicados acima dos nós. A árvore está enraizada com *Curvularia lunata* (CBS 730.96). Barras de escala = 20 μ m. *Espécie tipo.

A análise filogenética permitiu a separação das espécies com boa confiabilidade. No total, foram analisadas 11 diferentes espécies de *Exserohilum* com ótimo suporte de ramos, incluindo o táxon, *E. corniculatum*. Esses resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Hernández-Restrepo et al. (2018), onde propõem o táxon *E. corniculatum* como novo.

As espécies em *Exserohilum*, de maneira geral, foram distribuídas em dois grandes subclados bem suportados. No primeiro clado, encontram-se as espécies *E. monoceras*, *E. oryzicola*, *E. pedicellatum* e *E. turcicum*. Enquanto que o segundo clado inclui isolados identificados como *E. corniculatum*, *E. holmii*, *E. khartoumensis*, *E. minor*, *E. neoregeliae*, *E. protrudens* e *E. rostratum*.

Estudos mostraram que algumas espécies de *Exserohilum* podem ser altamente variáveis em relação à morfologia, mas a nível molecular elas estão intimamente relacionadas, por isso a importância desses dados para resolver problemas taxonômicos (Hernández-Restrepo et al., 2018). A região de GAPDH é recomendada para a confirmação de espécies do gênero *Bipolaris* (Bhunjun et al., 2020; Manamgoda et al., 2012). Em *Exserohilum* para a identificação de espécies, uma análise concatenada multigênica é altamente recomendada e a região

GAPDH conseguiu resolver a maioria dos problemas taxonômicos existentes entre as espécies (Hernández-Restrepo et al., 2018).

Pesquisas baseadas em dados moleculares são recentes para o gênero, independente da finalidade. Hernández-Restrepo et al. (2018) revisaram o gênero *Exserohilum* com base nas culturas disponíveis de coleções mundiais e de isolados adicionais de diversos substratos e origens geográficas, e propuseram um limite entre os gêneros, *Exserohilum*, *Pyrenophora*, *Porocercospora*, *Bipolaris* e *Curvularia*. Já Turgay et al. (2020) definiram quais são as raças que estão em diferentes regiões da Turquia, baseando-se em dados morfológicos, patogênicos e moleculares.

As espécies de *Exserohilum* são fitopatógenos importantes em culturas agrícolas, principalmente em *Poaceae* e outras monocotiledôneas (Tabela 1). As espécies identificadas nessa pesquisa têm o milho como hospedeiro conhecido. No Brasil, em milho-pipoca é relatada principalmente a ocorrência da espécie *E. turcicum* (Kurosawa et al., 2018; Santos et al., 2020).

No Brasil, o gênero nunca teve sua estrutura filogenética estudada, indicando a necessidade de mais estudos com essas finalidades, e ainda existem poucos estudos com esse patossistema, o que é indispensável para compreendê-lo e para traçar as medidas de controle eficientes.

Avaliação patológica dos isolados em condições controladas

Os isolados usados para a avaliação patológica foram CF/UENF 480, CF/UENF 489, CF/UENF 491, CF/UENF 500, CF/UENF 504, sendo um representante de cada espécie por região de coleta.

Após a inoculação dos diferentes isolados, foi observado que todos provocaram doença na linhagem L55 de milho-pipoca. A doença ocasionada por *E. turcicum* é caracterizada por sintomas de lesões necróticas alongadas (podendo medir de 2,5 a 15 cm), formato elíptico, e coloração do tecido doente que pode variar de verde-cinza a marrom. Já os sintomas de *E. rostratum* são lesões menores, necróticas de coloração marrom que coalescem e secam as folhas (Figura 4).

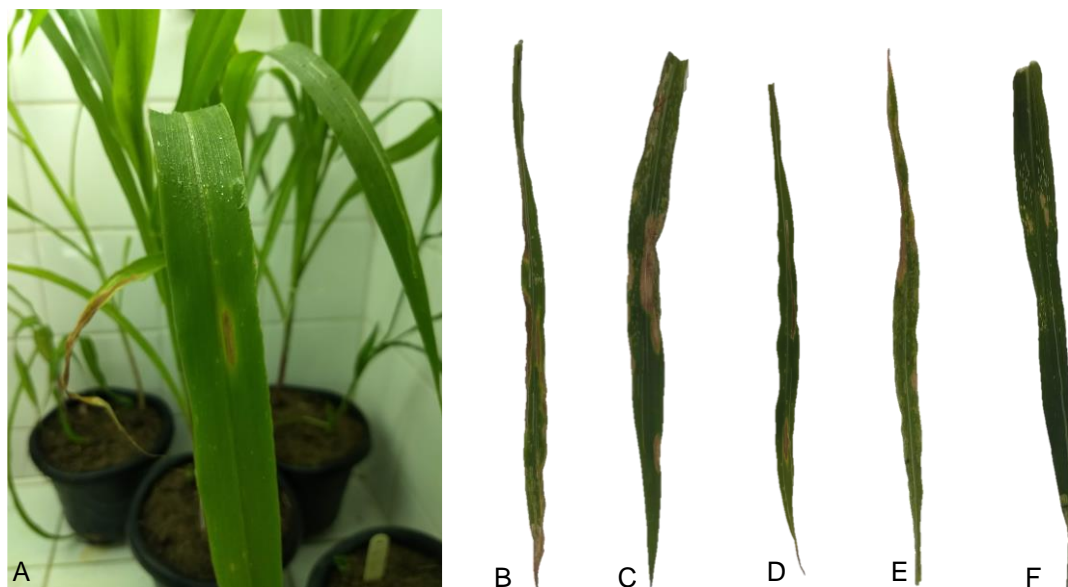


Figura 4. Sintomas de *Exserohilum* em milho-pipoca após 14 dias de inoculação. A: Sintomas de *E. turcicum* em plantas de milho-pipoca; B-E: folhas com sintomas de *E. turcicum*, B: CF/UENF 480, C: CF/UENF 489, D: CF/UENF 491, e CF/UENF 504; F: folhas destacadas com sintomas de *E. rostratum* (CF/UENF 500).

Ambas as espécies são relatadas como patógenos na cultura do milho (Farr e Rossman, 2020). A espécie *E. turcicum* é comumente relatada por ser uma das causas da redução da produtividade de milho, e uma das estratégias para o manejo dessa doença e para amenizar as perdas econômicas decorrentes da doença é o uso de cultivares resistentes ou tolerantes (Badu-Apraku et al., 2021). No Brasil não há relatos de trabalhos que busquem estudar a diversidade de espécies do gênero e capacidade patogênica em milho-pipoca.

Em milho-pipoca, a espécie *E. turcicum* é comumente relatada (Kurosawa et al., 2018; Santos et al., 2020). Já para *E. rostratum* não há essa informação, demonstrando que pode ser uma doença secundária e não causa tantos prejuízos econômicos, ou que os sintomas, em campo, possa estar sendo confundido com o início de outras manchas-foliares, como as causadas por *E. turcicum* ou até mesmo a *B. maydis*.

Nas condições estudadas, os sintomas começaram a aparecer após cinco dias de inoculação. Para a espécie de *E. turcicum* não foram observadas

diferenças visuais nos sintomas independentes do isolado que foi usado. Dessa forma, foi observada que a espécie produz os mesmos sintomas nas folhas, independentemente do hospedeiro original ou do local de coleta, e todos os isolados têm a mesma capacidade de ocasionar a doença. A espécie *E. rostratum* também foi capaz de ocasionar mancha-foliar (Figura 4).

Os sintomas de *E. turcicum* nas folhas de milho estão de acordo com as relatadas na literatura (Hernández-Restrepo et al., 2018; Badu-Apraku et al., 2021). As diferenças nos sintomas ocasionados pelo patógeno podem estar mais relacionadas às raças do patógeno e/ou às variedades de milho que se é cultivado (Turgay et al., 2020).

Esse é o primeiro trabalho que busca verificar a ocorrência de espécies *Exserohilum* em cultivos de milho de diferentes origens geográficas do Brasil, baseado em dados morfológicos, patogênicos e moleculares. Após a diferenciação das espécies, os isolados podem ser usados em trabalhos futuros para aumentar a confiança na seleção dos genótipos resistentes.

RESUMO E CONCLUSÕES

Duas espécies de *Exserohilum* foram associadas causando a mancha-foliar em milho. Os isolados de *E. turcicum* não diferiram quanto sua capacidade patogênica, e essa característica também não é influenciada pela região de coleta dos isolados. Os mesmos podem ser usados em trabalhos futuros que visem o melhoramento de milho-pipoca visando a resistência a *E. turcicum*.

A combinação dos dados morfológicos, moleculares e patológicos podem ser usados para entender quais as espécies de *Exserohilum* estão associados à mancha-foliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C., Ferreira, F.A., Alfenas, R.F. (2016). Inoculação de fungos fitopatogênicos. In A.C. Alfenas, R.G. Mafia (Eds.) *Métodos em Fitopatologia*. 2 ed. Viçosa: UFV, p. 123–143.

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410.
- Badu-Apraku, B., Bankole, F.A., Ajayo, B.S., Fakorede, M.A.B., Akinwale, R.O., Talabi, A.O., Bandyopadhyay, R., Ortega-Beltran, A. (2021) Identification of early and extra-early maturing tropical maize inbred lines resistant to *Exserohilum turcicum* in sub-Saharan Africa. *Crop Protection*, 139:1-10.
- Berbee, M.L., Pirseyedi, M., Hubbard, S. (1999) Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91: 964–977.
- Bhunjun, C.S., Dong, Y., Jayawardena, R.S., Jeewon, R., Phukhamsakda, C., Bundhun, D., Hyde, K.D., Sheng, J. (2020) A polyphasic approach to delineate species in *Bipolaris*. *Fungal Diversity*, 102:225–256.
- Castellani, A. (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42:225–226.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32:1792–1797.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y. (2020) *Fungal databases*. National Fungus Collections. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 11/12/2000.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A. (2014). ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). *Applied Mathematics*, 05:2952–2958.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1323–1330.
- Hepperle D (2011) DNA Dragon 1.4.1 - DNA Sequence Contig Assembler Software.
- Hernández-Restrepo, M., Madrid, H., Tan, Y.P., da madrid, K.C., Gené, J., Guarro, J., Crous, P.W. (2018) Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41:71–108.
- Leonard, K.J., Suggs, E.G. (1974) *Setosphaeria Prolata*, The Ascigerous State of *Exserohilum Prolatum*. *Mycologia*, 66:281–297.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Crous, P., Madrid,H., Chukeatirote,

- E., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Hyde, K.D. (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity*, 56:131–144.
- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. (2014) The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 82:137–217.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J. Z., L. Cai, Q. C., Marincowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., U. Braun, E., Camporesi, Damm, U., Beer, Z.W. de, Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernandez-Restrepo, M., Hyde, K. D., Jayawardena, R.S., Lombard, L., Luangsa-ard, J., McTaggart, A. R., Crous, P. W. (2017) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1 STUDIES. *Studies in Mycology*, 86:99–216.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Iturrieta-González, I., García, D., Gené, J., Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Quaedvlieg, W., Schumacher, R.K., Taylor, P.W.J., Ambers, C., Bonthond, G., Edwards, J., Krueger-Hadfield, S. A., Luangsa-ard, J.J., Morton, L., Moslemi, A., Sandoval-Denis, M., Crous, P. W. (2019) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Studies in Mycology*, 94:1–124.
- McGinnis, M.R., Rinaldi, M.G., Winn, R.E. (1986) Emerging agents of phaeohyphomycosis: Pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24:250–259.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
- Nei, M., Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, 333 p.
- Nwanosike, M.R.O., Mabagala, R.B. (2017) Influence of Metrological Parameters on the Development of *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs on Maize in Tanzania. *International Journal of Agricultural and Food Research*, 6:1-9.
- Pinho, D., Dutra, D., Pereira, O. (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38:152–157.
- Posada, D., Buckley, T. (2004) Model Selection and Model Averaging in

- Phylogenetics : Advantages of Akaike. *Syst. Biol.*, 53:793–808.
- R Core Team. (2016) *R: a Language and Environment for Statistical Computing*.
Foundation for Statistical Computing.
- Rambaut, A. (2009) FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Rambaut, A., Drummond A. J. (2013) Tracer v1.6. Disponível em:
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rannala, B., Yang, Z. (1996) *Probability Distribution of Molecular Evolutionary Trees: a new method of phylogenetic inference*. *Journal of molecular evolution*, 43:304–311.
- Shoemaker, R.A. (1959) Nomenclature of Drechslera and *Bipolaris*, grass parasites segregated from 'Helminthosporium'. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 879–887.
- Singh, R., Jakhar, D.S., Kumari, R., Kumar, P., Lal, I. (2019) Review Management of Turcicum leaf blight in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology and Crop Science*, 8: 115–117.
- Sun, X.X., Qi, X., Wang, W., Liu, X., Zhao, H., Wu, C., Chang, X., Wei, J. (2020) Etiology and Symptoms of Maize Leaf Spot Caused by *Bipolaris* spp. in Sichuan, China. *Phatogens*, 9:1-8.
- Turgay, E.B., Büyük, O., Tunalı, B., Helvacıoglu, O., Kurt, S. (2020) Detection of the race of *Exserohilum turcicum* [(Pass.) K.J. Leonard e Suggs] causing northern leaf blight diseases of corn in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 102:387–393.

RESUMO E CONCLUSÕES

Os fungos estão entre os agentes causais mais importantes em plantas. Os gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum* têm incidência bem expressiva no milho-pipoca. Diante disso, buscou-se verificar quais as espécies de *Bipolaris* e *Exserohilum* estão associadas à mancha-foliar em milho e, para tal, objetivou-se proceder a caracterização morfológica, molecular e patológica em linhagens de milho-pipoca. As espécies de *Bipolaris* foram coletadas nos Estados de Alagoas, Espírito Santo, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro e Tocantins. Foram identificadas duas espécies de *Bipolaris*: *B. gossypina* e a *B. maydis*. A *B. gossypina* foi identificada apenas no Estado do Mato Grosso, já a espécie *B. maydis* foi amostrada em cultivos de milho nos demais Estados brasileiros. As espécies pertencentes ao gênero *Exserohilum* se desenvolvem em condições ambientais específicas. A espécie *E. turcicum* foi encontrada no Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Na Região Sul do Brasil foram identificadas apenas espécies de *E. Turcicum*. A espécie *E. rostratum* foi coletada apenas no Rio de Janeiro. Os isolados, tanto de *Bipolaris* quanto de *Exserohilum*, não diferiram quanto sua capacidade patogênica em linhagem de milho-pipoca. A combinação dos dados morfológicos, moleculares e patológicos podem ser usados para entender quais os patógenos que estão associados à mancha-foliar. De maneira geral, esses achados contribuem para a compreensão dos patógenos que causam a mancha-foliar em milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A.C., Ferreira, F.A., Alfenas, R.F. (2016) Inoculação de fungos fitopatogênicos. In A.C. Alfenas, R.G. Mafia (Eds.) *Métodos em Fitopatologia*. 2 ed. Viçosa: UFV, p. 123–143.
- Altaf, M., Raziq, F., Khan, I., Hussain, H., Ullah, W., Naeem, A., Adnan, M., Rizwan, S., Shah, A., Iqbal, M. (2016) Study on the response of different maize cultivars to various inoculum levels of *Bipolaris maydis* (Y. Nisik e C. Miyake) shoemaker under field conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4: 533–537.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410.
- Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A., de Paiva Freitas Júnior, S., Candido, L.S., Vittorazzi, C., Pena, G.F., Ribeiro, R.M., Conceição Silva, T.R., Pereira, M.G., Scapim, C.A., Viana, A.P., Carvalho, G.F. (2013) UENF 14: A new popcorn cultivar. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13:218–220.
- Arnhold, E. (2008). Seleção para resistência a doenças foliares em famílias S 1 de milho-pipoca. *Ceres*, 55:89–93.
- Badu-Apraku, B., Bankole, F.A., Ajayo, B.S., Fakorede, M.A.B., Akinwale, R.O., Talabi, A.O., Bandyopadhyay, R., Ortega-Beltran, A. (2021) Identification of early and extra-early maturing tropical maize inbred lines resistant to *Exserohilum turcicum* in sub-Saharan Africa. *Crop Protection*, 139:1-10.
- Berbee, M.L., Pirseyedi, M., Hubbard, S. (1999) Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and

- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91: 964–977.
- Bergamin Filho, A., Amorim, L., Rezende, J.A.M. (2018) Importância das doenças de plantas. In L. Amorim, J.A.M. Rezende, A. Bergamin Filho (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 5. ed. Agronômica Ceres. p. 19–36.
- Bhunjun, C.S., Dong, Y., Jayawardena, R.S., Jeewon, R., Phukhamsakda, C., Bundhun, D., Hyde, K.D., Sheng, J. (2020) A polyphasic approach to delineate species in *Bipolaris*. *Fungal Diversity*, 102:225–256.
- Box, G.E.P., Cox, D.R. (1964) An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society*, 26:211–252.
- Brocchieri, L. (2001) Phylogenetic inferences from molecular sequences: Review and critique. *Theoretical Population Biology*, 59:27–40.
- Bruns, H.A. (2017) Southern corn leaf blight: A story worth retelling. *Agronomy Journal*, 109:1218–1224.
- Caldart, E.T., Mata, H., Canal, C.W., Ravazzolo, A.P. (2016) Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44:1–20.
- Camargo, L.E.A. (2018) Controle genético. In L. Amorim, J.A.M. Rezende, A. Bergamin Filho (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 5. ed. Agronômica Ceres. p. 229–238.
- Castellani, A. (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42:225–226.
- Companhia Nacional de Abastecimento – Conab. 2020 Preços agrícolas. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/precos>.
- Cruz, C.D. (2013) GENES - Software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 35:271–276.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32:1792–1797.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y. (2020) *Fungal databases*. National Fungus Collections. Disponível em: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>. Acesso em: 11/12/2000.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A. (2014). ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). *Applied Mathematics*, 05:2952–2958.

- Freitas, R.E. (2017) Expansion of agricultural areas in Brazil from 1994 to 2013: soybeans versus corn versus cotton. *Organizações Rurais e Agroindustriais*, 19:219–232.
- Gama, E.E.G., Magnavaca, R., Silval, Sans, J.B. da, Aguiar, L.M., Viana, Afonso, P., Parentoni, S.N., Pacheco, C.A.P., Fernandes, L.A.C., Tavares, F. (1990) Milho-pipoca. *Informe Agropecuário*, 14:8–12.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1323–1330.
- Hennig, W. (1966) Phylogenetic Systematics. In *Annual Review of Entomology*. 10: 97-116.
- Hepperle D (2011) DNA Dragon 1.4.1.DNA Sequence Contig Assembler Software.
- Hernández-Restrepo, M., Madrid, H., Tan, Y.P., da Cunha, K.C., Gené, J., Guarro, J., Crous, P.W. (2018) Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41:71–108.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R., Bollback, J.P. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294:2310–2314.
- Hussain, H., Raziq, F., Khan, I., Shah, B., Ullah, W., Naeem, A., Adnan, M., Junaid, K., Rizwan, S., Shah, A., Iqbal, M. (2016) Effect of *Bipolaris maydis* (Y. Nisik e C. Miyake) shoemaker at various growth stages of different maize cultivars. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4:439–444.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2021). *Produção Agrícola Municipal*.
- Instituto Brasileiro do Feijão e dos Pulses – Ibrafe. *Pesquisa inédita revela potencial do mercado de pipoca no Brasil*. Disponível em <https://www.ibrafe.org/>. Acesso em: 23/01/2021.
- Kist, B.B. (2019) *Anuário brasileiro do milho 2019*. Santa Cruz: Gazeta. 72p.
- Kunhao, Y., Guoshu, G., Xiaobo, Q., Jichao, Y., Chunxian, J., Xiaofang, S., Yiyu, W., Jizhi, Y. (2015) Effect of cultivation measures on sheath blight and southern leaf blight of corn. *Plant Prot*, 1:154–159.
- Kurosawa, R. do N.F., Vivas, M., Junior, A.T.A., Ribeiro, R.M., Miranda, S.B., Pena, G.F., Leite, J.T., Mora, F. (2018) Popcorn germplasm resistance to fungal diseases caused by *Exserohilum turcicum* and *Bipolaris maydis*.

- Bragantia*, 77:36–47.
- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M. (2009) *The Phylogenetic Handbook*. 2 ed. New York: Cambridge University Press. 750p.
- Leonard, K.J., Suggs, E.G. (1974). *Setosphaeria Prolata*, The Ascigerous State of *Exserohilum Prolatum*. *Mycologia*, 66:281–297.
- Leuchtmann, A., Petrini, O., Petrini, L.E., Carroll, G.C. (1992) Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. *Mycological Research*, 96: 287–294.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Hyde, K.D. (2012) A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity*, 56:131–144.
- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. (2014) The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 82:137–217.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J.Z., Cai, Q.C., Marincowitz, S., Barnes, I., Bensch, K., U. Braun, E., Camporesi, Damm, U., Beer, Z.W., Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernández-Restrepo, M., Hyde, K.D., Jayawardena, R.S., Lombard, L., Luangsa-ard, J., McTaggart, A.R., Crous, P.W. (2017) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1 STUDIES. *Studies in Mycology*, 86:99–216.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Crous, P.W. (2020) Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*, 19: 559–588.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Iturrieta-González, I., García, D., Gené, J., Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Quaedvlieg, W., Schumacher, R.K., Taylor, P.W.J., Ambers, C., Bonthond, G., Edwards, J., Krueger-Hadfield, S. A., Luangsa-ard, J.J., Morton, L., Moslemi, A., Sandoval-Denis, M., Crous, P.W. (2019) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Studies in Mycology*, 94:1–124.
- Massola Júnior, N.S., Krugner, T.L. (2018) Fungos fitopatogênicos. In L. Amorim, J. A.M. Rezende, A. Bergamin Filho (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 5 ed. Agronômica Ceres, p. 107–142.
- McGinnis, M.R., Rinaldi, M.G., Winn, R.E. (1986) Emerging agents of

- phaeohyphomycosis: Pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24:250–259.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*.
- Montemarani, A., Sartori, M., Nesci, A., Etcheverry, M., Barros, G. (2018) Influence of crop residues, matric potential and temperature on growth of *Exserohilum turcicum* an emerging maize pathogen in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 67: 614–619.
- Morô, G.V., Fritsche-Neto, R. (2017) Importância e uso do milho no Brasil. In Cardoso, G.J.C., Borém, A., Pimentel, M.A. (Eds.) *Milho do plantio a colheita*. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 9–24
- Mubeen, S., Rafique, M., Munis, M.F.H., Chaudhary, H.J. (2017) Study of southern corn leaf blight (SCLB) on maize genotypes and its effect on yield. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16:210–217.
- Nei, M., Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, 333 p.
- Nisikado, Y. (1929) Studies on Helminthosporium diseases of gramineae in Japan. *Institute for Agricultural Research*, 4:111–126.
- Nwanosike, M.R.O., Mabagala, R.B. (2017) Influence of Metrological Parameters on the Development of *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs on Maize in Tanzania. *International Journal of Agricultural and Food Research*, 6:1-9.
- Pacheco, C.A.P., Gama, E.E.G., Parentoni, S.N., Manuel dos Santos, Lopoés, M. A., Ferreira, A. da S., Fernandes, F.T., Guimarães, P.E. de O., Fernandes, L. A.C., Meireles, walter F., Feldman, R.O., Magnavaca, R. (2001) *BRS-Ângela - variedade de milho-pipoca*. Embrapa Milho e Sorgo-Comunicado Técnico.
- Pereira, O.A.P. (2005) Doenças do milho. In Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J. A.M. , Bergamim Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. Agronômica Ceres. p. 477–488.
- Pinho, D.B., Machado, A.R., Firmino, A.L. (2016). Principios e métodos para a identificação molecular de fungos. In A.C. Alfenas R.G. Mafia (Eds.) *Métodos em Fitopatologia*. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 389–422.
- Pinho, D., Dutra, D., Pereira, O. (2013) Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing

- internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 38:152–157.
- Posada, D. (2009) Selecting models of evolution. In *The Phylogenetic Handbook* Cambridge University Press. p. 343–361.
- Posada, D., Buckley, T. (2004) Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics : Advantages of Akaike. *Syst. Biol.*, 53:793–808.
- R Core Team. (2016) *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. Foundation for Statistical Computing.
- Rambaut, A. (2009) FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees.
- Rambaut, A., Drummond A.J. (2013) Tracer v1.6. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
- Rannala, B., Yang, Z. (1996) *Probability Distribution of Molecular Evolutionary Trees: a new method of phylogenetic inference*. Journal of molecular evolution, 43:304–311.
- Ridley, M. (2006) *Evolução*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 743 p.
- Rossmann, A.Y., Manamgoda, D.S., Hyde, K.D. (2013) Proposal to conserve the name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae). *Taxon*, 62:1331–1332.
- Russo, C.A.M. (2001) Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In S. R. Mاتيoli (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos, p. 130–136.
- Sabato, E.D.O., Pinto, N.F.J.D.A., Fernandes, F.T. (2013) *Identificação e controle de doenças no milho*. 2 ed. Brasília: Embrapa, 198p.
- Saluci, J.C.G., Vivas, M., Almeida, R.N. de, Dutra, I.P., Carlos, M.C., Júnior, A.T. do A., Scapim, C.A. (2020) Potential of popcorn S4 lines for resistance to southern corn leaf. *Functional Plant Breeding Journal*, 2:79–87.
- Santos, J.S., de Souza, Y.P., Vivas, M., do Amaral Junior, A.T., de Almeida Filho, J.E., Mafra, G.S., Viana, A.P., Gravina, G.A., Ferreira, F.R.A. (2020). Genetic merit of popcorn lines and hybrids for multiple foliar diseases and agronomic properties. *Functional Plant Breeding Journal*, 2:36-47.
- Sharma, K., Goss, E.M., Dickstein, E.R., Smith, M.E., Johnson, J.A., Southwick, F.S., van Bruggen, A.H. (2014). *Exserohilum rostratum*: characterization of a cross-kingdom pathogen of plants and humans. *PLoS One*, 9:1-10.
- Sharma, B.C., Singh, R.P., Bhatnagar, A. (2020) Effect of tillage and nutrient

- management practices on maydis leaf blight of maize. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9:3735–3743.
- Shoemaker, R.A. (1959) Nomenclature of Drechslera and *Bipolaris*, grass parasites segregated from 'Helminthosporium. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 879–887.
- Singh, R., Jakhar, D.S., Kumari, R., Kumar, P., Lal, I. (2019) Review Management of Turcicum leaf blight in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology and Crop Science*, 8: 115–117.
- Sousa, H.M.V., Câmara, T.M.M., Oliveira, N.N.S., Silva, C.R.N. (2016) Desempenho agrônômico de genótipos de milho pipoca no nordeste do estado do Pará. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 15:305–3017.
- Sun, X.X., Qi, X., Wang, W., Liu, X., Zhao, H., Wu, C., Chang, X., Wei, J. (2020) Etiology and Symptoms of Maize Leaf Spot Caused by *Bipolaris* spp. in Sichuan, China. *Phatogens*, 9:1-8.
- Sweley, J.C., Rose, D.J., Jackson, D.S. (2013) Quality Traits and Popping Performance Considerations for Popcorn (*Zea mays* Everta). *Food Reviews International*, 29:157–177.
- Tan, Y.P., Madrid, H., Crous, P.W., Shivas, R.G. (2014) Johnalcornia gen. et. comb. nov., and nine new combinations in Curvularia based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology*, 43:589–603.
- Turgay, E.B., Büyüç, O., Tunalı, B., Helvacıoglu, O., Kurt, S. (2020) Detection of the race of *Exserohilum turcicum* [(Pass.) K.J. Leonard e Suggs] causing northern leaf blight diseases of corn in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 102:387–393.
- Turgeon, B.G., Baker, S.E. (2007) Genetic and Genomic Dissection of the Cochliobolus heterostrophus Tox1 Locus Controlling Biosynthesis of the Polyketide Virulence Factor T-toxin. *Advances in Genetics*, 57:219–261.
- Wang, M., Wang, S., Ma, J., Yu, C., Gao, J., Chen, J. (2017) Detection of Cochliobolus heterostrophus races in South China. *Journal of Phytopathology*, 165:681–691.
- Zervakis, G., Sourdís, J., Balis, C. (1994) Genetic variability and systematics of eleven Pleurotus species based on isozyme analysis. *Mycological Research*, 98:329–341.