

DIEGO DA SILVA CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES CAUSAIS DA MANCHA PARDA,
MANCHA BRANCA E QUEIMA DAS FOLHAS DA MANDIOCA**

GARANHUNS, PERNAMBUCO - BRASIL

MARÇO - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

**CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES CAUSAIS DA MANCHA PARDA,
MANCHA BRANCA E QUEIMA DAS FOLHAS DA MANDIOCA**

DIEGO DA SILVA CUNHA

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR

UEDER PEDRO LOPES

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Agrícola, para obtenção do título de *Mestre*.

GARANHUNS
PERNAMBUCO – BRASIL
MARÇO – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

**CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES CAUSAIS DA MANCHA PARDA,
MANCHA BRANCA E QUEIMA DAS FOLHAS DA MANDIOCA**

DIEGO DA SILVA CUNHA

GARANHUNS
PERNAMBUCO - BRASIL
MARÇO - 2017

Ficha Catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

Cunha, Diego da Silva

Caracterização dos agentes causais da mancha parda, mancha branca e queima das folhas da mandioca/ Diego da Silva Cunha. – Garanhuns, 2017.

58f.

Orientador: Ueder Pedro Lopes

Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola) – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, 2017.

CDD:

1. Manchas foliares
2. *Manihot esculenta* Crantz
3. Cercosporioses
- I. Lopes, Ueder Pedro
- II. Caracterização dos agentes causais da mancha parda, mancha branca e queima das folhas da mandioca

Caracterização dos agentes causais da mancha parda, mancha branca e queima das
folhas da mandioca

DIEGO DA SILVA CUNHA

APROVADO EM: 10 DE MARÇO DE 2017

Dr. Alexandre Reis Machado

(Membro Externo)

Dr.^a Rejane do Livramento Freitas Lopes

(Coorientadora)

Dr. Ueder Pedro Lopes

(Orientador)

Dedicatória

Ao meu pai, minha mãe e avó.

Ao meu avô (“in memoriam”).

Aos meus irmãos, tios, primos e amigos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela vida, por me proporcionar saúde, paz e as oportunidades para continuar trilhando meu caminho.

Ao meu pai Geraldo e à minha mãe Geania, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos. Aos meus irmãos Henrique e Gabriel, minha namorada Noemia e aos meus tios, tias, primos e primas, pelo carinho, apoio e torcida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e à Unidade Acadêmica de Garanhuns, por disponibilizar toda estrutura necessária para realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Agrícola, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Aos Laboratórios de Fitopatologia, Biologia Molecular e Biotecnologia, da Central de Laboratórios de Garanhuns (Cenlag), pela disponibilidade de estrutura e equipamentos para realização desta pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Ueder Pedro Lopes, pelos ensinamentos, amizade, paciência e orientação durante a execução deste trabalho.

Aos meus coorientadores, Dr^a. Rejane Freitas Lopes e Dr. Sami Michereff, pelo aprendizado, treinamentos, discussões e colaboração no projeto.

Ao Dr. Alexandre Machado, pelo auxílio nas análises filogenéticas, discussões e disponibilidade de participar da banca de defesa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Facepe), pelo apoio financeiro ao projeto APQ-1542-5.01/15 e pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao projeto Universal CNPq 454010/2014.

À toda equipe do Laboratório de Fitopatologia, em especial à Rita de Cassia, Erivaldo, Jaciele, Felipe, Evair, João, Marthony, Carol e Alberto.

Aos meus amigos de turma Alexandre, Wedson, Jessica, Priscila, Thyago, Melry, Amanda, Geisemiel, Miro, Francisco, pelos momentos divertidos e de aprendizado.

Aos professores, técnicos e servidores da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) e da Central de Laboratórios de Garanhuns (Cenlag), em especial ao Sr. Claudio, Sr. Jair, Sr. Flavio, Dona Neide, Sra. Rose, Martoni, Isabele e Iquilane, pelo apoio e suporte ao longo do desenvolvimento do projeto.

À Luciana Herculano, Samara Alves, Alderi e Kledson Mendes, pelo apoio, suporte, parceria e convívio no dia-a-dia desse mestrado, amizades que irei levar por toda vida.

Às amizades formadas em Garanhuns, que me auxiliaram no decorrer do meu projeto, seja pessoalmente ou via internet, Osmar, Adso, Steyce, Claudianny, Alane, Alanny, Alan, Gisa, Jaqueline Fontes, Diana, Gabriela, Ana, Kathleen, Valquíria, Júlio, Kedma, Kádna e a todas as equipes dos laboratórios de biotecnologia, solos, sementes, zootecnia e veterinária.

Aos meus amigos da UFRB que me motivaram a não desistir e tentar seleção de mestrado para Produção Agrícola, Fábio Farias, Maria Amorim, Caline, William, Damiana, Diana, Raone, Paulo, Neilon, Eldes, Dionei e a todos da residência Trio Elétrico.

Aos meus professores e orientadores, cujos ensinamentos e experiências levarei por toda vida, Rudiney Ringenberg, Marcos Paulo, Prof^a. Leia Araújo, Edson Duarte, Marcos Roberto.

Muito obrigado a todos que tive o prazer de conviver nessa fase maravilhosa de minha vida.

BIOGRAFIA

Diego da Silva Cunha, filho de Geraldo Nascimento da Cunha e Geania Gomes da Silva. Nascido em 21 de novembro de 1990, na cidade de Salvador, BA. Em 2006, ingressou no curso técnico agrícola com habilitação à agropecuária no Instituto Federal Baiano – Campus Senhor do Bonfim, formando-se em 2008. Em 2009, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, graduando-se em 2014. No ano de 2015, iniciou o curso de Mestrado em Produção Agrícola na Universidade Federal Rural de Pernambuco, submetendo-se à defesa de dissertação em 10 de março de 2017.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reação dos diferentes isolados inoculados em plantas e folhas destacadas de mandioca.....	47
Tabela 2. Informações sobre os isolados utilizados nesse estudo.....	57
Tabela 3. Quadro resumo das características de conídios e conidióforos de cercosporóides associados às manchas foliares da mandioca, descritas na literatura e obtidas neste estudo	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Locais de obtenção dos diferentes isolados de cercosporóides em mandioca. 34
- Figura 2. Árvore obtida de inferência bayesiana das sequências de TEF-1 α dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e de sequências de *Cercospora* da literatura. A espécie *Pseudocercospora euphorbiacearum* (CPC 25222) foi utilizada como outgroup. 36
- Figura 3. Árvore obtida de inferência bayesiana das sequências da região ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e de sequências de *Cercospora* da literatura. A espécie *Pseudocercospora euphorbiacearum* (CPC 25222) foi utilizada como outgroup. 37
- Figura 4. Árvore obtida de inferência bayesiana da análise combinada de sequências de TEF-1 α e ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e de sequências de *Cercospora* da literatura. A espécie *Pseudocercospora euphorbiacearum* (CPC 25222) foi utilizada como outgroup. 38
- Figura 5. Árvore obtida de inferência bayesiana das sequências da região TEF-1 α dos isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas. As espécies *Passalora eucalypti* (CBS 111318) e *Passalora zambiae* (CBS 112971) foram utilizadas como outgroup. 39
- Figura 6. Árvore obtida de inferência bayesiana de sequências da região ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas. As espécies *Passalora eucalypti* (CBS 111318) e *Passalora zambiae* (CBS 112971) foram utilizadas como outgroup. 40
- Figura 7. Árvore obtida de inferência bayesiana da análise combinada de sequências de TEF-1 α e ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas. As espécies *Passalora eucalypti* (CBS 111318) e *Passalora zambiae* (CBS 112971) foram utilizadas como outgroup. 41
- Figura 8. Mancha branca da mandioca – *Cercospora manihobae*. Folhas apresentando sintomas da doença (A e B); detalhe da lesão (C); colônia em meio BDA, com 30 dias de idade (D); conidióforo (E); conídio hialino e filiforme (F). 42

- Figura 9. Mancha branca da mandioca – *Cercospora caribaea*. Folhas apresentando sintomas da doença (A e B); detalhe da lesão com centro claro (C); colônia em meio BDA, com 16 dias de idade (D); conidióforo (E); detalhe de conídios simples e em cadeia (F). 43
- Figura 10. Mancha parda da mandioca - *Passalora henningsii*. Folhas apresentando sintomas da doença (A e B); detalhe da lesão com estruturas do patógeno (C); colônia em meio BDA, com 30 dias de idade (D); conidióforo (E); conídios (F). 44
- Figura 11. Mancha parda da mandioca – *Passalora* sp. Folhas com lesões da doença (A); colônia em meio BDA, com 30 dias idade (B); conídios (C). 45
- Figura 12. Queima das folhas da mandioca - *Passalora vicosae*. Folha apresentando sintomas da doença (A); detalhe do amarelecimento em lesões iniciais (B) e no bordo das folhas (C); colônia em meio BDA, com 30 dias de idade (D); conidióforos e conídios (E e F). 46
- Figura 13. Folhas de mandioca apresentando sintomas após a inoculação com suspensão de conídios dos isolados B2 (A), B8 (C) e P3(E) e com discos de micélio dos isolados B2 (B), B8 (D), P3 (F), P13 (G), Q3 (H, I). 47

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Obtenção dos isolados.....	29
2.1.1 Coleta de folhas doentes e isolamento dos patógenos.....	29
2.1.2 Obtenção de culturas puras e armazenamento	29
2.2 Análises moleculares.....	30
2.2.1 Extração de DNA e amplificação por PCR.....	30
2.2.2 Sequenciamento das amostras.....	31
2.3 Análises filogenéticas.....	31
2.4 Caracterização morfológica e cultural.....	32
2.5 Patogenicidade dos isolados.....	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

RESUMO

A mancha parda (MP), a mancha branca (MB) e a queima das folhas (QF) da mandioca, causadas por cercosporóides, embora sejam doenças comuns na cultura, são pouco estudadas. A fim de entender a diversidade dos patógenos e a relação entre os sintomas e o agente causal destas doenças, foi realizado este estudo com os seguintes objetivos: i) obter uma coleção de isolados associados a cada uma das doenças; ii) obter um conjunto de dados com sequências gênicas dos isolados; iii) estudar o relacionamento filogenético dos isolados; iv) avaliar as características morfológicas dos isolados. Uma coleção de 122 isolados foi obtida a partir de folhas de mandioca apresentando sintomas de MP, MB e QF. Visando caracterizar molecularmente os isolados, inicialmente foi feita uma análise filogenética utilizando as sequências do gene TEF-1 α de 29 isolados (sendo 6 isolados obtidos de folhas de mandioca com sintomas de MB, 13 de MP e 10 de QF). A partir desta análise prévia, foram selecionados representantes dentre os isolados obtidos de folhas de mandioca com sintomas de MB (5 isolados), MP (6 isolados) e QF (7 isolados), para o sequenciamento da região ITS. Enquanto a região ITS mostrou-se limitada para diferenciar este grupo de patógenos, sequências de TEF-1 α mostraram-se promissoras para a caracterização molecular, separando os isolados em cinco grupos. Isolados representativos (B2; B8; P3; P13; Q3) dos diferentes grupos formados foram caracterizados quanto à morfologia e patogenicidade. Todos os isolados foram capazes de causar doença em mandioca. De acordo com as características morfológicas, foi possível caracterizar os isolados B2, B8, P3 e Q3 como pertencentes às espécies *Cercospora manihobae*, *Cercospora caribaea*, *Passalora henningsii* e *Passalora vicosae*, respectivamente. O isolado P13 foi identificado como pertencente ao gênero *Passalora*. Este estudo contribui para o melhor entendimento da etiologia das doenças causadas por cercosporóides na cultura da mandioca.

Palavras-chave: *Cercospora caribaea*; *Cercospora manihobaea*; *Manihotis esculenta*; *Passalora henningsii*; *Passalora vicosae*; cercosporóides.

ABSTRACT

Brown leaf spot, white leaf spot and blight leaf spot caused by cercosporoids, although common diseases in the crop, are poorly studied. In order to understand the pathogen diversity and the relationship between the symptoms and the causal agent of these diseases, this study was carried out with the following objectives: i) to obtain a collection of isolates associated with each disease; ii) to generate a dataset of gene sequences of the isolates; iii) to study the phylogenetic relationship of the isolates; iv) to evaluate the morphological characteristics of the isolates. A collection of 122 isolates was obtained from cassava leaves showing symptoms of brown leaf spot, white leaf spot and blight leaf spot. The molecular characterization by phylogenetic analysis was performed using the TEF-1 α gene sequences from 29 isolates (6 isolates obtained from cassava leaves with symptoms of white leaf spot, 13 from brown leaf spot and 10 from blight leaf spot). From this previous analysis, representative isolates from each disease were selected (5 isolates from leaves with white leaf spot, 6 isolates from leaves with brown leaf spot and 7 isolates from leaves with blight leaf spot) for the sequencing of the ITS region. While the ITS region was limited to differentiate this group of pathogens, TEF-1 α sequences were promising for molecular characterization, separating the isolates into five groups. Representative isolates (B2, B8, P3, P13, Q3) of the different groups were characterized morphologically and evaluated for pathogenicity. All isolates were able to cause disease in cassava. According to the morphological characteristics, the isolates B2, B8, P3 and Q3 were identified as belonging to the species *Cercospora manihobae*, *Cercospora caribaea*, *Passalora henningsii* and *Passalora vicosae*, respectively. The isolate P13 was identified as belonging to the genus *Passalora*. This study contributes to a better understanding of the etiology of diseases caused by cercosporoids in cassava.

Keywords: *Cercospora caribaea*; *Cercospora manihobaea*; *Manihotis esculenta*; *Passalora henningsii*; *Passalora vicosae*; cercosporoids.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura da mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), também conhecida como macaxeira ou aipim, pertence à família Euphorbiaceae e é originária da América do Sul, tendo se expandido para a América Central, Antilhas e outros países de clima tropical e subtropical, como Ceilão, Filipinas, Java, Tailândia, grande parte da África e Madagascar (SENA, 2006; CENÓZ et al., 2007; PINTO, 2010; SILVA e ANDRADE, 2011). No Brasil, seu cultivo ocorre em praticamente todo o território nacional, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, e possui grande importância social e econômica, sendo considerada vital para o semiárido nordestino (LIMA et al., 2012).

A mandioca é considerada uma das culturas mais exploradas mundialmente e sua utilização como tuberosa é superada apenas pela batata inglesa (SOUZA e OTSUBO, 2002). Segundo a FAO, a produção mundial de mandioca vem crescendo em ritmo acelerado, tendo sido produzidas 270,28 milhões de toneladas em 2014 (FAO, 2017).

O Brasil se posiciona como o quarto maior produtor, produzindo 23,24 milhões de toneladas de raízes, ficando atrás da Nigéria, Tailândia e Indonésia (com 54,83, 30,03 e 23,44 milhões de toneladas, respectivamente) (FAO, 2017; CONAB, 2017). Em 2015, o setor de mandioca ocupou o quinto lugar em valor de produção agrícola entre as culturas permanentes do Brasil, com uma receita bruta de 8,2 bilhões de reais, perdendo apenas para a soja, cana-de-açúcar, milho e arroz (CONAB, 2017). Na safra 2016, a produção brasileira foi de 23,71 milhões de toneladas, com uma área plantada de 1,55 milhões de hectares (IBGE, 2016). O Estado do Pará é o de maior produção de raízes, com uma safra estimada de 5,17 milhões de toneladas em 2017, seguido pelo Paraná e Bahia, com 2,76 e 1,75 milhões de toneladas, respectivamente. Juntos, estes estados representam metade da produção nacional (CONAB, 2017).

A cultura da mandioca desempenha um importante papel na alimentação humana e animal, sendo considerada a principal fonte de carboidratos em algumas regiões do planeta, como na África e América do Sul (CENÓZ et al., 2007; SILVA e ANDRADE, 2011; VALLE e LORENZI, 2014; REDDY, 2015). Além disso, as raízes podem servir como matéria-prima para inúmeros produtos industriais, contribuindo de forma direta e indireta para a geração de emprego e renda (SANTOS et al., 2004; HOWELER et al., 2013; VALLE e LORENZI, 2014).

A mandioca pode ser classificada em dois tipos, de acordo com o teor de ácido cianídrico presente na polpa da raiz fresca. A mandioca de mesa possui um baixo teor de ácido cianídrico ($<100 \text{ mg Kg}^{-1}$) em suas raízes, sendo geralmente comercializada e consumida *in natura*. Já a mandioca brava, por possuir um alto teor de ácido cianídrico ($>100 \text{ mg Kg}^{-1}$), é usada na produção de farinha e fécula e serve como matéria-prima nas indústrias de mineração, têxtil e farmacêutica (BORGES et al., 2002; SOUZA e FIALHO, 2003; VALLE e LORENZI, 2014).

1.2 Doenças na cultura da mandioca

As doenças podem incidir em plantas de mandioca em qualquer fase de desenvolvimento e estão entre as principais causas de perdas na produção (FERREIRA et al., 2012; TREMACOLDI, 2014; REDDY, 2015). Dentre as doenças que atingem a cultura estão as podridões radiculares (*Phytophthora* sp. e *Fusarium* sp.), as manchas foliares, como mancha parda (*Passalora henningsii*), queima das folhas (*Passalora vicosae*), mancha branca (*Passalora manihotis*) e mancha preta (*Cercospora manihobae*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), oídio (*Oidium manihotis*), ferrugem (*Uromyces manihotis*) e algumas viroses, como mosaico comum (*Cassava common virus*), mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*) e mosaico africano (*African cassava mosaic virus*) (VIÉGAS, 1941; LOZANO e BOOTH, 1976; TERI, 1978; MSIKITA et al., 2000; SOUZA e FIALHO, 2003; REDDY, 2015; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016; LIU et al., 2016).

As doenças da parte aérea levam à redução da área foliar sadia, afetando a atividade fotossintética das plantas. Além da redução na produção de raízes, pode haver também a redução da parte aérea, pela desfolha parcial ou total, reduzindo a produção de massa verde, que em algumas regiões é utilizada na alimentação animal (VIÉGAS, 1941; TERI; THURSTON; LOZANO, 1978; LOZANO e BOOTH, 1974).

As principais manchas foliares que afetam a cultura da mandioca são a mancha parda, a queima das folhas e a mancha branca (VIÉGAS, 1941; LOZANO e BOOTH, 1976; MELO, 1986; MSIKITA et al., 2000; REDDY, 2015; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016). Estas doenças foram relatadas em diferentes zonas geográficas e climáticas em todo o mundo, sendo especialmente abundantes em áreas tropicais e subtropicais. Por ocorrerem de forma simultânea na mesma área de cultivo, sua sintomatologia é muitas vezes confundida, o que pode dificultar a diagnose (VIÉGAS, 1941; LOZANO e BOOTH, 1976; BANITO et al., 2007; BRAUN et al., 2013; PEI et al., 2014). Por isso, a caracterização de fitopatógenos é importante, pois permite a identificação da espécie, a compreensão da diversidade de populações, a associação correta entre o agente causal e os sintomas causados na planta, dentre outros. Estas informações dão suporte para estudos de prevalência e programas de melhoramento visando ao desenvolvimento de genótipos resistentes a doenças. Desta forma, é possível entender o comportamento da doença na região ao longo do ciclo da cultura e propor estratégias de manejo da doença mais eficientes (TERI, 1978; BRIOSO et al., 2001; CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; HUANG et al., 2015; LIU et al., 2016; SILVA, 2016).

1.2.1 Mancha parda

Dentre as manchas foliares da mandioca, a mancha parda é a de maior ocorrência em áreas de cultivo em todo o mundo, tendo sido encontrada em diferentes espécies, como *Manihot esculenta*, *Manihot utilissima*, *Manihot glaziovii* e *Manihot piauhyensis* (VIÉGAS, 1941; 1945, LOZANO e BOOTH, 1974; TERI, 1978). A doença foi descrita pela primeira vez em 1895, em folhas de mandioca colhidas na Tanzânia,

leste Africano (VIÉGAS, 1941; TERI, 1978). Posteriormente, a doença foi relatada na Índia em 1904 (VIÉGAS, 1941; PALOMAR e MARTINEZ, 1988), nas Filipinas em 1918 (TERI, 1978), no Brasil (VIÉGAS, 1941; VIÉGAS, 1945), Panamá (VIÉGAS, 1941; TERI, 1978), Gana (TERI; THURSTON; LOZANO, 1978) e em outros países nos anos 70 (TERI; THURSTON; LOZANO, 1978; AYESU-OFFEI e ANTWI-BOASIAKO, 1996; CROUS e BRAUN, 2003). Em condições favoráveis à doença, a produção de raízes pode ser reduzida em mais de 30% (TERRY e OYEKAN, 1976; TERI, 1978).

Atualmente, a mancha parda é associada ao fungo *Passalora henningsii* (Allesch.) R. F. Castañeda & U. Braun. Porém, vários nomes já foram atribuídos a essa espécie, ao longo dos diversos relatos de sua associação com a mandioca, dentre os quais: *Cercospora henningsii*, *Cercosporidium henningsii*, *Cercospora cassavae*, *Cercospora manihotis*, *Septogloeum manihotis*, *Helminthosporium manihotis* e *Cercospora cearae* (VIÉGAS, 1941; CHUPP, 1954; AYESU-OFFEI e ANTWI-BOASIAKO, 1996; CROUS e BRAUN, 2003; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016; MYCOBANK, 2017).

O fungo se desenvolve nos espaços intercelulares do limbo foliar, produzindo estroma com duas a seis células em profundidade, apresentando diâmetro de 20-45 µm. A partir desse estroma, em fascículos densos, os conidióforos são formados (LOZANO e BOOTH, 1974). Os conidióforos são uniformes quanto à cor e tamanho, apresentando coloração castanho-olivácea e dimensões de 3,5-5 x 10-50 µm. São levemente geniculados, com pontas arredondadas e cicatriz, apresentando septação moderada. Os conídios são produzidos isoladamente no ápice de cada conidióforo e apresentam coloração olivácea uniforme, são ligeiramente curvados e arredondados nas extremidades, apresentando de 2 a 8 septos (VIÉGAS, 1945; CHUPP, 1954; LOZANO e BOOTH, 1974; TERI, 1978).

Estudos morfológicos mostraram que o crescimento de *P. henningsii* em meio de cultura (Batata Dextrose Ágar - BDA) é bastante lento, tendo as colônias atingido apenas 14,3 mm de diâmetro após 30 dias de cultivo, com micélios curtos e compactos (TERI, 1978; PEI et al., 2014). As colônias apresentaram bordas lobadas e coloração cinza claro (PEI et al., 2014).

Os sintomas da doença no campo se caracterizam por lesões inicialmente pequenas, arredondadas a angulares, de coloração amarelada a castanha. Posteriormente, estas lesões atingem 5 a 10 mm de diâmetro, com formato angular e coloração pardo-avermelhada, com bordos mais escuros e circundados por um estreito halo amarelado (MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016). As lesões ocorrem em ambas as faces do limbo foliar, sendo que, na face adaxial das folhas, os pontos apresentam-se uniformemente castanhos, com uma borda escura, enquanto na parte abaxial, as lesões possuem margens distintas e uma coloração cinzenta no centro, devido à formação de conidióforos e conídios (LOZANO e BOOTH, 1974).

A doença afeta principalmente as folhas mais velhas e, em ataques severos, pode levar a uma intensa desfolha na parte inferior da planta (LOZANO e BOOTH, 1976; CIAT, 1982). Além disso, uma planta infectada pode se tornar mais vulnerável, uma vez que as lesões podem servir como porta de entrada para outros patógenos (WYDRA e VERDIER, 2002; PEI et al., 2014). Isto foi demonstrado por Wydra e Verdier (2002), que verificaram uma correlação positiva e significativa entre a ocorrência de mancha parda e a incidência de antracnose, mancha branca e podridões nas raízes.

A mancha parda é comum em regiões com temperaturas elevadas e alta pluviosidade, ocorrendo com maior intensidade em folhas mais velhas de plantas acima de cinco meses de idade (LOZANO, 1980; SILVA et al., 1988; WYDRA e VERDIER, 2002). Apesar disso, tem sido verificado que plantas jovens, de dois meses de idade, quando infectadas artificialmente, apresentam sintomas da doença.

A sobrevivência do fungo de uma safra a outra ocorre pelos restos culturais, sendo o transporte de conídios realizado normalmente pela ação do vento ou da chuva (MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016). O uso de cultivares resistentes é uma das principais medidas de controle da doença e diversas variedades de mandioca têm sido avaliadas no Brasil, na busca de fontes de resistência (VIÉGAS, 1941; SANTOS et al., 2004; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016). Outras medidas podem contribuir para a redução da doença, como a utilização de um maior espaçamento entre plantas, o que reduz a umidade no interior da lavoura, a eliminação de espécies nativas de mandioca, como *M. glaziovii* e *M. piauhyensis*, que podem servir como fonte de inóculo (VIÉGAS, 1941; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO;

OLIVEIRA, 2016), e a pulverização com os fungicidas ditiocarbamato e benzimidazóis (TERI; THURSTON; LOZANO, 1978).

1.2.2 Queima das folhas

A queima das folhas, também conhecida como mancha-parda-grande, foi descrita pela primeira vez em 1935 por Muller e Chupp, em folhas de mandioca selvagem coletadas em Minas Gerais, Brasil (VIÉGAS, 1945; CHUPP, 1954; TERI, 1978). A doença foi também relatada na Colômbia (LOZANO e BOOTH, 1974; TERI, 1978) e, até onde se sabe, está confinada à América Latina (CHUPP, 1954; TERI, 1978).

A espécie *Passalora vicosae* (A. S. Mull. & Chupp) Crous, Alfenas & R. W. Barreto, também conhecida por *Cercospora vicosae*, tem sido associada à queima das folhas (VIÉGAS, 1945; CHUPP, 1954; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016; MYCOBANK, 2017).

Os sintomas da doença se caracterizam pelo surgimento de manchas pardas grandes e irregulares, sem bordos definidos, podendo ser numerosas e coalescerem, afetando quase toda a área foliar (TERI, 1978; BATISTA et al., 1981; SILVA e ANDRADE, 2011). Em observações de campo, verificou-se que os sintomas iniciam nas bordas do limbo foliar, como pequenas manchas desclorofiladas que, ao longo do tempo, crescem e adquirem uma coloração marrom uniforme em ambas as faces do limbo foliar. Na parte adaxial, se observa um centro de fundo cinzento, devido à presença de conidióforos e conídios do patógeno. Devido à inexistência de uma diagnose adequada, a doença é comumente confundida com a mancha parda (LOZANO e BOOTH, 1974).

O fungo *P. vicosae* apresenta esporodóquios retos e fasciculados, foscos, hipofílicos, sem bulbilhos nítidos, são facilmente destacáveis, afastados uns dos outros, porém recobrimdo áreas mais ou menos nítidas. Os conidióforos são septados, com formato cilíndrico, muito foscos na base, clareando até a extremidade; podem ser

simples ou ramificados, geniculados ou não, apresentando 4-6 μm de diâmetro e 50-250 μm de comprimento. As células conidiogênicas são terminais e intercalares, integradas, proliferando simpodialmente, apresentam formato subcilíndrico, com coloração castanho clara e dimensões de 12-30 $\times$ 4-6 μm . Os conídios são septados, solitários, com formato cilíndrico a obclavado, em linha reta a ligeiramente curvado, com 27-93 $\times$ 4-6 μm , são septados com cerca de 1-8 septos, coloração olivácea a marrom pálido, apresentam hilo espessado e escurecido (VIÉGAS, 1945; CHUPP, 1954; SILVA, 2016).

Suas colônias apresentam crescimento lento em meio BDA (13 a 16 mm de diâmetro após 23 dias), são circulares, com margens lobadas irregulares, micélio aéreo escasso, de coloração cinza-olivácea, e o fundo da colônia apresenta-se na cor preta-olivácea, não produzindo esporos em meio de cultura (SILVA, 2016).

A queima das folhas ocorre em períodos chuvosos e em áreas quentes de cultivo de mandioca no Brasil e Colômbia, podendo ocorrer simultaneamente em áreas com a presença de mancha parda (LOZANO e BOOTH, 1974; LOZANO, 1980). Também afeta principalmente as folhas mais velhas de plantas acima de cinco meses de idade, podendo causar desfolha severa em plantas suscetíveis (LOZANO e BOOTH, 1976; LOZANO, 1980; SILVA e ANDRADE, 2011; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016).

Informações sobre a epidemiologia e manejo da doença são escassas. Alguns estudos sobre a resistência de genótipos têm sido realizados e medidas de controle usuais para a mancha parda têm se mostrado efetivas na redução da queima das folhas (MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016).

1.2.3 Mancha branca

A doença foi descrita pela primeira vez por Chupp e Ciferri, em folhas coletadas por Muller em 1929, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Porém, foi demonstrado que a doença era causada pelo mesmo fungo coletado por Stevens em 1925, na Guiana Inglesa, continente Sul-Americano (VIÉGAS, 1941; CHUPP, 1954; TERI, 1978).

A mancha branca é mais comumente encontrada em regiões mais frias e úmidas de cultivo, porém pode ser observada em menor intensidade em regiões quentes (LOZANO e BOOTH, 1974; SILVA e ANDRADE, 2011). A doença tem sido relatada na Ásia, América do Norte, América Latina e África tropical (VIÉGAS, 1941; LOZANO e BOOTH, 1974; LOZANO, 1980; BANITO et al., 2007).

Atualmente, a mancha branca é associada ao fungo *Passalora manihotis* (F. Stevens & Solheim) U. Braun & Crous, que já recebeu outros nomes, como *Cercospora caribaea* Ciferri, *Phaeoramularia manihotis* (F. Stevens e Solheim) M.B. Ellis, *Ragnhildiana manihotis* Stevens e Slheim e *Cercospora panamensis* Stev. e Moore (VIÉGAS, 1941; MYCOBANK, 2017).

Os conidióforos de *P. manihotis* são medianos, fuliginosos ou castanho-oliváceos, multi-septados, com cerca de 1-15 genículos, uniformes em cor e largura, raramente ramificados, ponta subtruncada com cicatriz de conídios, nas dimensões 3,5-5 x 50-200 µm. Os conídios são hialinos, obclavado-cilíndricos, sem contornos arredondados, com cerca de 1 a 6 septos, praticamente retos, com 4-8 x 20-90 µm (VIÉGAS, 1941; CHUPP, 1954).

Em meio BDA, as colônias apresentam crescimento médio, de 29,8 a 39,3 mm em 30 dias, com dobras muito proeminentes, e micélio com aspecto aéreo e coloração cinza escuro a preto (TERI, 1978).

Os sintomas da doença se caracterizam por lesões que variam de circulares a angulares, geralmente de 1 a 2 mm de diâmetro (raramente ultrapassam 5 mm) com coloração branca, às vezes marrom-amareladas, bem distintas da mancha parda e queima das folhas (VIÉGAS, 1941; SILVA e ANDRADE, 2011). As lesões são facilmente distinguidas das outras manchas foliares, pois se apresentam como pontos brancos no limbo foliar. Além disso, podem apresentar bordas de coloração difusa na face adaxial da folha, aparecendo às vezes também como uma linha irregular de cor parda-violeta rodeada por uma coroa marrom ou amarelada. No centro das lesões, observa-se um aspecto aveludado de cor cinza, correspondendo à frutificação do patógeno, que ocorre predominantemente na parte abaxial das folhas (VIÉGAS, 1941;

CHUPP, 1954; LOZANO e BOOTH, 1976; LOZANO, 1980; TERI; THURSTON; LOZANO, 1980).

A doença pode atingir folhas novas, mas comumente ocorre em folhas mais velhas, podendo ocasionar desfolha significativa em plantas suscetíveis (LOZANO, 1980; SILVA et al., 1988).

O fungo sobrevive durante a estação seca nos tecidos infectados e renova sua atividade na estação chuvosa, quando o hospedeiro inicia seu período de crescimento (VIÉGAS, 1941; BREKELBAUM; BELLOTI; LOZANO, 1977; LOZANO, 1980).

O controle da doença pode ser feito utilizando as mesmas práticas culturais aplicadas para a mancha parda e queima das folhas (MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016).

1.2.4 Mancha preta

A doença é causada pelo fungo *Cercospora manihobae* Viégas (VIÉGAS, 1945; TERI, 1978) e foi descrita pela primeira vez em 1945, por Viégas, em folhas de mandioca coletadas em Campinas e São Paulo, Brasil. Não há relato da doença em nenhuma outra região do mundo e não existe uma descrição completa da doença na literatura (VIÉGAS, 1945; CHUPP, 1954; LOZANO e BOOTH, 1976; TERI, 1978). Além disso, o patógeno só foi encontrado em folhas caídas e pecíolos de *Manihot utilissima* Pohl, mas nunca em tecidos vivos de Euforbiácea (VIÉGAS, 1945; TERI, 1978).

Os sintomas da doença são manchas foliares indistintas, às vezes com borda ligeiramente escurecida, subcircular, podendo ocorrer também nos pecíolos como lesões alongadas. Seus estromas são pequenos, pretos, com fascículos numerosos, às vezes densos, divergentes (TERI, 1978; BREKELBAUM; BELLOTI; LOZANO, 1977). Os conidióforos são pálidos a castanho-oliváceos, ligeiramente atenuados em relação à ponta, multi-septados, raramente possuem ramificações e genículos, com 4-6 x 70-1000

µm. Os conídios são hialinos, aciculares, retos a curvos, multi-septados, base truncada, ponta aguda e dimensões de 3,5-5 x 80-270 µm (VIÉGAS, 1945; CHUPP, 1954; TERI, 1978).

Em meio BDA, as colônias são circulares, com bordas hialinas mais ou menos gelatinosas, micélio aéreo compacto, esbranquiçado, sobre um crescimento esverdeado, e rígidas (difíceis de serem repicadas). As hifas são hialinas, pouco septadas quando novas, porém tornam-se bastante septadas e altamente incrustadas. As colônias não colorem o meio, porém produzem rachaduras nítidas (VIÉGAS, 1945).

1.3 Taxonomia em Cercosporóides

As manchas foliares citadas acima eram comumente conhecidas como cercosporiose da mandioca, por serem associadas a espécies dos gêneros *Cercospora* e *Cercosporidium*. O gênero *Cercospora*, considerado um dos maiores grupos de fungos, com ocorrência no mundo todo, agrupava patógenos associados a sintomas de manchas foliares, podendo causar lesões em brácteas, flores, frutos, pedicelos e sementes na maioria das famílias de vegetais, principalmente os de interesse agrícola. Esse grupo continha mais de 2.000 espécies, tradicionalmente classificadas de acordo com sua fase assexuada, tendo como correspondente sua fase sexuada *Mycosphaerellaceae*, *Teratosphaeriaceae*, entre outros (AGRIOS, 2005; MEGHVANSI et al., 2013; CROUS e BRAUN, 2003; BAKHSHI et al, 2015; NGUANHOM et al., 2015; GUATIMOSIM et al., 2016; MASSOLA JUNIOR; BEDENDO; OLIVEIRA, 2016).

Os estudos sobre cercosporóides vêm avançando ao longo dos anos. Historicamente, o primeiro nome genérico de hifomiceto cercosporóide foi introduzido por Fries (1849), chamado *Passalora* e, em 1863, Fresenius introduziu o nome *Cercospora*. Em 1954, Chupp organizou o gênero *Cercospora*, incluindo mais de 1.500 espécies como pertencendo a este gênero. Chupp ao rever as espécies anteriormente incluídas no gênero, verificou que o nome *Cercospora* havia sido utilizado de forma inadequada ao longo dos anos, e que micologistas erroneamente descreveram espécies

como pertencentes ao gênero *Cercospora*, sendo que na verdade eram distintos morfológicamente (CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; GUATIMOSIM et al., 2016). Embora este complexo abranja milhares de nomes, só recentemente tem sido possível obter uma maior clareza quanto às relações filogenéticas e morfológicas entre táxons deste grupo (CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007). Desde a classificação de Chupp até a atualidade, diversos estudos objetivaram investigar estes grupos de indivíduos, e reagrupar as espécies presentes nos mesmos, em grupos que representem a evolução mais precisa de cada indivíduo (GUATIMOSIM et al., 2016). Porém, uma das maiores limitações é a dificuldade de cultivo destes organismos, além da escassez de informações em nível de DNA, uma vez que o primeiro estudo abordando a taxonomia deste complexo com base em dados de sequenciamento de DNA surgiu somente em 1999 (GROENEWALD; GROENEWALD; CROUS, 2005; CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; SILVA, 2016). Apesar dos avanços com análises moleculares, 65% das espécies de fungos ainda não possuíam dados moleculares em 2013 (CROUS et al., 2015) e a maioria dos trabalhos de taxonomia foram realizados sem o amparo de parâmetros moleculares (GUATIMOSIM et al., 2016). Outro fator que dificulta a identificação de fungos é a ausência de materiais ex-tipo depositados nos centros de recursos biológicos (GOODWIN et al., 2001; CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; GUATIMOSIM et al., 2016).

Nos últimos anos, os cercosporóides vêm ganhando maior atenção, a exemplo do gênero *Paracercospora* Deighton, sinônimo do gênero mais antigo *Pseudocercospora*. Crous et al. (2001) mostraram que o *Cercostigmina* também era sinônimo de *Pseudocercospora*, o que levou Crous & Braun (2003) a concluir que o tipo conidioma, a catenulação conidial, a septação e a proliferação de células conidiogênicas possuíam uma menor importância na separação de espécies no nível genérico. Crous et al. (2006) mostraram que *Phaeoisariopsis* e *Stigmina* também eram sinônimos de *Pseudocercospora*. Os gêneros *Mycovellosiella* e *Phaeoramularia* foram considerados sinônimos do gênero *Passalora*, que atualmente é caracterizado pelos conidióforos pigmentados, espessados e escurecidos, e conídios pigmentados com hilo espessado e escurecido (BRAUN et al., 2013, 2014, 2015; CROUS e BRAUN 2003).

A pigmentação presente nos conidióforos é uma característica comum entre fungos dos gêneros *Cercospora* e *Passalora*. Porém, o que distingue os dois gêneros é a pigmentação dos conídios, que está presente em *Passalora*, enquanto que em *Cercospora*, os conídios são hialinos a sub-hialinos. A cicatriz no loci conidiogênico separa os gêneros *Passalora* e *Pseudocercospora*, sendo que em *Passalora* é conspícuo, ou seja, apresenta células conidiogênicas com cicatrizes escuras, refrativas e mais ou menos planas, bem visíveis, enquanto que em *Pseudocercospora*, esta cicatriz é inconspícua, ou seja, não visível. O tipo de hilo separa os gêneros *Passalora* e *Stenella*, sendo um tanto escuro-refrativo e mais ou menos truncado em *Passalora* e ligeiramente espesso e escuro em *Stenella* (CROUS e BRAUN, 2003; CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007).

Diferentes características morfológicas têm sido amplamente utilizadas para identificação de espécies de *Cercospora*, dentre elas: estrutura do conidioma (conidióforo livre, fasciculado, esporodóquio, sinêmio); micélio (ausência ou presença de micélio superficial e a textura); células conidiogênicas (localização, proliferação e tipo de cicatriz); conidióforo (arranjo, ramificação, pigmentação e ornamentação); conídio (hilo, forma, formação, septação, ornamentação e catenuação) (CHUPP, 1954; CROUS e BRAUN, 2003; CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; BRAUN et al., 2013; CROUS et al., 2013; GROENEWALD et al., 2013; QUAEDVLIEG et al., 2014; BAKHSHI et al 2015; SILVA, 2016).

Mais de 90 espécies de *Cercospora* foram descritas no Brasil, com base na morfologia, e os patógenos causadores de manchas foliares em mandioca foram descritos como pertencentes a esse grupo (VIÉGAS, 1941; 1945). No entanto, a partir dos estudos de Crous e Braun (2003), estes patógenos foram incluídos no gênero *Passalora*.

O uso apenas de características morfológicas torna-se uma tarefa difícil e não confiável, sendo necessário o uso de outras ferramentas que possam fornecer identificações mais precisas e reprodutíveis. Atualmente, grande parte dos estudos de evolução dos fungos cercosporóides têm se baseado na análise de dados moleculares. Esta ferramenta é importante devido à existência de um complexo de espécies que

representam vários gêneros polifiléticos e parafiléticos (CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; BRAUN et al., 2016; LIU et al., 2016).

As regiões gênicas que vêm sendo mais utilizadas para a identificação de cercosporóides são ITS (*Internal Transcribed Spacer*), LSU (*Large Subunit*), β -tubulina, TEF (*Translation Elongation Factor 1 α*), actina (ACT), calmodulina (CAL) e histona (H3-HIS) (CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; GROENEWALD et al. 2013; HUANG et al., 2015; LIU et al., 2016). No entanto, apesar dos avanços envolvendo a taxonomia destes fungos, alguns gêneros necessitam de mais esforços em pesquisa, como é o caso de *Passalora* (CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007; BRAUN et al., 2013; CROUS et al., 2013; GROENEWALD et al., 2013; QUAEDVLIEG et al., 2014; BAKHSHI et al 2015; NGUANHOM et al., 2015; ANDRADE, 2016; LIU et al., 2016; SILVA, 2016). Particularmente na cultura da mandioca, são escassas as informações relacionadas a estes cercosporóides.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo geral caracterizar os agentes etiológicos da mancha branca, mancha parda e queima das folhas da mandioca, por meio de análises moleculares e morfológicas. Os objetivos específicos consistiram em: i) obter uma coleção de isolados associados a cada uma das doenças; ii) obter um conjunto de dados com sequências gênicas dos isolados; iii) estudar o relacionamento filogenético dos isolados; iv) avaliar as características morfológicas dos isolados. Com os resultados obtidos, espera-se estabelecer uma relação entre os sintomas e o agente causal da doença, possibilitando uma melhor compreensão da diversidade desses patógenos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

2.1.1 Coleta de folhas doentes e isolamento dos patógenos

Durante os anos de 2015 e 2016, foram coletadas folhas de mandioca apresentando sintomas característicos de MB (mancha branca), MP (mancha parda) e QF (queima das folhas), em diferentes áreas de plantio comercial. De cada área, foi obtido um isolado para cada sintoma encontrado.

Para isolamento do fungo, as folhas foram identificadas e encaminhadas ao laboratório, onde foram mantidas em câmara úmida por 24 h, visando induzir a esporulação do patógeno. Após este tempo, as lesões foram observadas em microscópio estereoscópico e, com auxílio de uma agulha hipodérmica estéril, as estruturas fúngicas presentes foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 25 °C e analisadas diariamente quanto à presença de crescimento fúngico, até os sete dias.

2.1.2 Obtenção de culturas puras e armazenamento

Visando obter colônias puras, os fungos previamente isolados foram repicados para meio ágar-ágar e incubados a 25 °C sob um fotoperíodo de 12 h, por duas semanas. As colônias foram analisadas em microscópio estereoscópico com aumento de 32x e, com o auxílio de uma agulha hipodérmica estéril, foram retiradas pontas de hifas das bordas das colônias, que foram então transferidas para placas contendo BDA. As culturas de pontas de hifas foram armazenadas utilizando o método de Castellani (1939). Cinco discos de micélio (3 mm) obtidos das bordas de colônias com 30 dias de idade foram transferidos para tubos de 1,5 mL, contendo água destilada estéril. Em seguida, os tubos foram fechados e armazenados a 25 °C.

As culturas utilizadas neste estudo serão depositadas na Coleção de Cultura de Fungos Fitopatogênicos "Prof. Maria Menezes" (CMM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brasil).

2.2 Análises moleculares

2.2.1 Extração de DNA e amplificação por PCR

Com base nos sintomas (MB, MP e QF) e nas características morfológicas das colônias, 29 isolados foram selecionados e cultivados em meio BDA a 25 °C por três semanas. Uma pequena porção do micélio foi removida da superfície, com auxílio de um palito de dente esterilizado, e transferida para um microtubo de 1,5 mL. A extração de DNA dos isolados foi realizada utilizando o Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, WI, U.S.A.), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras foram armazenadas a -20 °C, para uso posterior.

A fim de caracterizar molecularmente os isolados, optou-se pelo sequenciamento de duas regiões gênicas, TEF-1 α e ITS. Inicialmente, foi realizada a amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando o conjunto de *primers* EF1-728F (CARBONE e KOHN, 1999) e EF-2R (O'DONNELL et al., 1998), para TEF-1 α , e os *primers* ITS-4 e ITS-5 (WHITE et al., 1990) para a região ITS. As reações foram realizadas em um volume final de 12,5 μ L, contendo 6,3 μ L de GoTaq® G2 Colorless Master Mix (Promega), 0,5 μ L de cada *primer* (a 10 μ M), 4,2 μ L de água ultrapura livre de nucleasse e 1 μ L de DNA (aproximadamente 50 ng). A amplificação foi realizada no termociclador *Mastercycle Pro* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) e consistiu nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 54 °C para TEF-1 α e 57 °C para ITS por 30 s, e extensão a 72 °C por 1 min; e uma extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo SYBR Green (SYBR™ *Safe DNA Gel Stain* – Invitrogen) e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *Illustra ExoProStar 1-Step* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante, e armazenados a -20 °C.

2.2.2 Sequenciamento das amostras

As regiões TEF-1 α e ITS foram sequenciadas em ambas as direções, pelo serviço de sequenciamento de DNA da Plataforma de Sequenciamento LABCEN/CCB na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As sequências consenso foram construídas utilizando o software DNA Baser v. 4.20.0 (Heracle Software, Alemanha).

2.3 Análises filogenéticas

Para as duas regiões gênicas (TEF-1 α e ITS), as sequências consenso foram comparadas com a base de dados de nucleotídeos GenBank do NCBI, por meio do algoritmo MegaBLAST, a fim de obter sequências com alta similaridade. O conjunto de dados contendo as sequências dos isolados e outras obtidas de banco de dados (Tabela 1) foram alinhadas, utilizando o MUSCLE (EDGAR et al., 2004) implementado no MEGA v.7 (Molecular Evolutionary Genetics Analyses) (TAMURA et al., 2016).

As análises foram realizadas com dois conjuntos de dados: i) Sequências dos isolados de *Cercospora* obtidos de lesões de mancha branca e sequências de *Cercospora* do banco de dados; ii) Sequências dos isolados de *Passalora* obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas e sequências de *Passalora* do banco de dados. Para cada conjunto de dados, foi realizada a análise das regiões TEF-1 α e ITS separadamente, bem como a análise combinada das duas regiões.

Antes da análise Bayesiana, foram selecionados os melhores modelos de substituição de nucleotídeos com auxílio do programa MrMODELTEST v.2.3 (POSADA e BUCKLEY, 2004). Após calcular os escores de probabilidade, os modelos foram selecionados com base no Critério de Informação Akaike (AIC). Para as árvores de sequências de *Cercospora*, os modelos de evolução foram GTR+G para TEF-1 α e SYM+I para ITS, e para as árvores de sequências de *Passalora*, os modelos de evolução foram SYM+I para TEF-1 α e K80 para ITS.

As análises filogenéticas foram realizadas pelo portal da web CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010), utilizando o MrBayes v.3.2.2 (RONQUIST; HEULSENBECK; TESLENKO, 2011).

Dois conjuntos de quatro cadeias MCMC (Cadeia de Markov Monte Carlo) foram executados para 1×10^7 gerações e amostrados a cada 1.000 gerações, sendo descartadas 25% das árvores (RANNALA e YANG, 1996). As árvores geradas foram visualizadas utilizando o Figtree (RAMBAUT, 2009) e editadas no software Corel Draw X7. As sequências derivadas deste estudo serão depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), e os alinhamentos e árvores no TreeBASE (www.treebase.org/treebase/index.html).

2.4 Caracterização morfológica e cultural

Com base na análise filogenética combinada das regiões ITS e TEF-1 α , foram selecionados cinco representantes obtidos pelos clados, dentre os 29 isolados analisados, para avaliar o crescimento da colônia e as características dos conidióforos e conídios.

Para avaliar o crescimento da colônia, discos de micélio (3 mm de diâmetro) foram retirados das bordas de colônias de 30 dias de idade e colocados no centro de uma placa de petri contendo meio BDA. Para cada isolado, foram realizadas três repetições. As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, por 30 dias. O diâmetro das colônias foi aferido aos 15 e 30 dias, em duas direções, com o auxílio de um paquímetro digital. A coloração da colônia foi determinada utilizando o manual para terminologia de cores (RAYNER, 1970).

As características da morfologia de conídios e conidióforos foram observadas após a inoculação dos isolados em folhas de mandioca. As estruturas foram removidas das lesões e montadas em lactofenol. As medidas e as imagens digitais foram obtidas com o microscópio Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Alemanha) acoplado com câmera. A média e a amplitude das dimensões dos conídios e conidióforos, incluindo comprimento e largura, foram calculadas. Outras características, como coloração, forma e presença ou ausência de septos foram também avaliadas.

Para os isolados cuja obtenção de estruturas diretamente dos tecidos infectados não foi possível, foram utilizadas estruturas produzidas *in vitro*.

2.5 Patogenicidade dos isolados

A fim de avaliar a patogenicidade em folhas de mandioca, foram utilizados cinco isolados, representativos das diferentes espécies encontradas: *Cercospora manihobae* (B2), *Cercospora caribae* (B8), *Passalora henningsii* (P3), *Passalora* sp. (P13) e *Passalora vicosae* (Q3). Folhas do terço médio de plantas de mandioca da variedade Sambaqui foram retiradas e levadas ao laboratório, onde foram sanitizadas com água sanitária a 1% por um minuto e lavadas em água corrente. Para cada isolado, foram obtidos três discos de micélio (3 mm de diâmetro), que foram colocados sobre a face adaxial de três folhas. As folhas foram armazenadas em câmara úmida a 25 °C por cinco dias e avaliadas quanto ao surgimento da doença.

Outra avaliação consistiu na inoculação de mudas de mandioca de dois meses de idade, utilizando suspensão de conídios. Para obter o inóculo de cada isolado, discos de micélio (2 mm de diâmetro) de colônias com 20 dias foram colocados em frascos contendo 30 mL de V8 a 20%. Os frascos foram mantidos sob agitação contínua (110 rpm), a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, por quatro dias. Após esse período, a suspensão foi vertida em placas contendo meio ágar-ágar, que foram mantidas abertas em câmara de incubação, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Após a secagem (cerca de três dias), foram adicionados 10 mL de água destilada (contendo 0,02% de Tween), procedendo-se à raspagem dos conídios com auxílio de um bastão de vidro. Logo após, as suspensões foram filtradas em gaze e a concentração de conídios estimada com auxílio de uma câmara de Neubauer. Após essa etapa, foi realizada a inoculação das suspensões de conídios nas mudas, que foram mantidas em câmara úmida por 24 h, e observadas diariamente até o surgimento dos sintomas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 122 isolados de cercosporóides, a partir de folhas sintomáticas de mandioca, provenientes de 13 cidades nos estados de Alagoas (AL), Bahia (BA), Minas Gerais (MG) e Pernambuco (PE), nos anos de 2015 e 2016 (Fig. 1). Dos 122 isolados, 75 foram obtidos de lesões de mancha parda, 32 de queima das folhas e 15 de mancha branca.

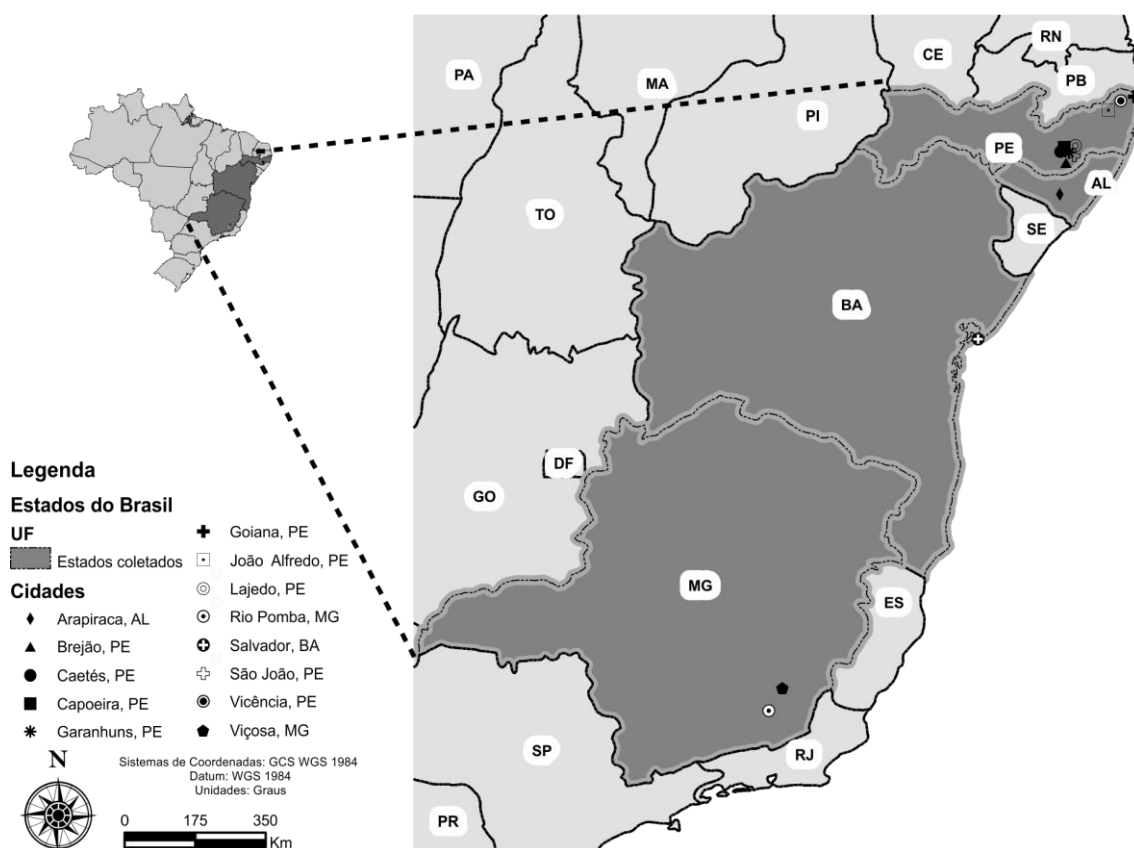


Figura 1. Locais de obtenção dos diferentes isolados de cercosporóides em mandioca.

A fim de caracterizar molecularmente os isolados, inicialmente foi feita uma análise filogenética utilizando as sequências do gene *TEF-1α* de 29 isolados (sendo 6 isolados obtidos de folhas de mandioca com sintomas de mancha branca, 13 de mancha parda e 10 de queima das folhas). Estes isolados foram separados em cinco grupos distintos (dados não mostrados). A partir desta análise prévia, foram selecionados representantes de cada grupo, dentre os isolados obtidos de folhas de mandioca com

sintomas de mancha branca (5 isolados), mancha parda (6 isolados) e queima das folhas (7 isolados), para o sequenciamento da região ITS.

Com as sequências obtidas, foi realizada a análise filogenética para dois conjuntos de dados: um contendo as sequências dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e de espécies de *Cercospora* provenientes de banco de dados, e outro contendo as sequências dos isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas, e sequências de *Passalora* do banco de dados. Para cada conjunto de dados, foi realizada a análise das regiões TEF-1 α (Fig.2 e 5) e ITS (Fig.3 e 6) separadamente, bem como a análise combinada das duas regiões (Fig.4 e 7).

A análise bayesiana de sequências TEF-1 α dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e outras espécies de *Cercospora* conteve 29 táxons com 313 caracteres, dos quais 30 foram informativos para parcimônia, 111 variáveis e 162 conservados. Os isolados B1, B2, B3, B4 e B7 ficaram mais próximos (70% de suporte), enquanto que o isolado B8 ficou um pouco mais afastado dos demais (100% de suporte). No entanto, não houve suporte para separá-los em clados distintos, o que sugere que a região TEF-1 α não foi eficiente para separar este grupo (Fig. 2).

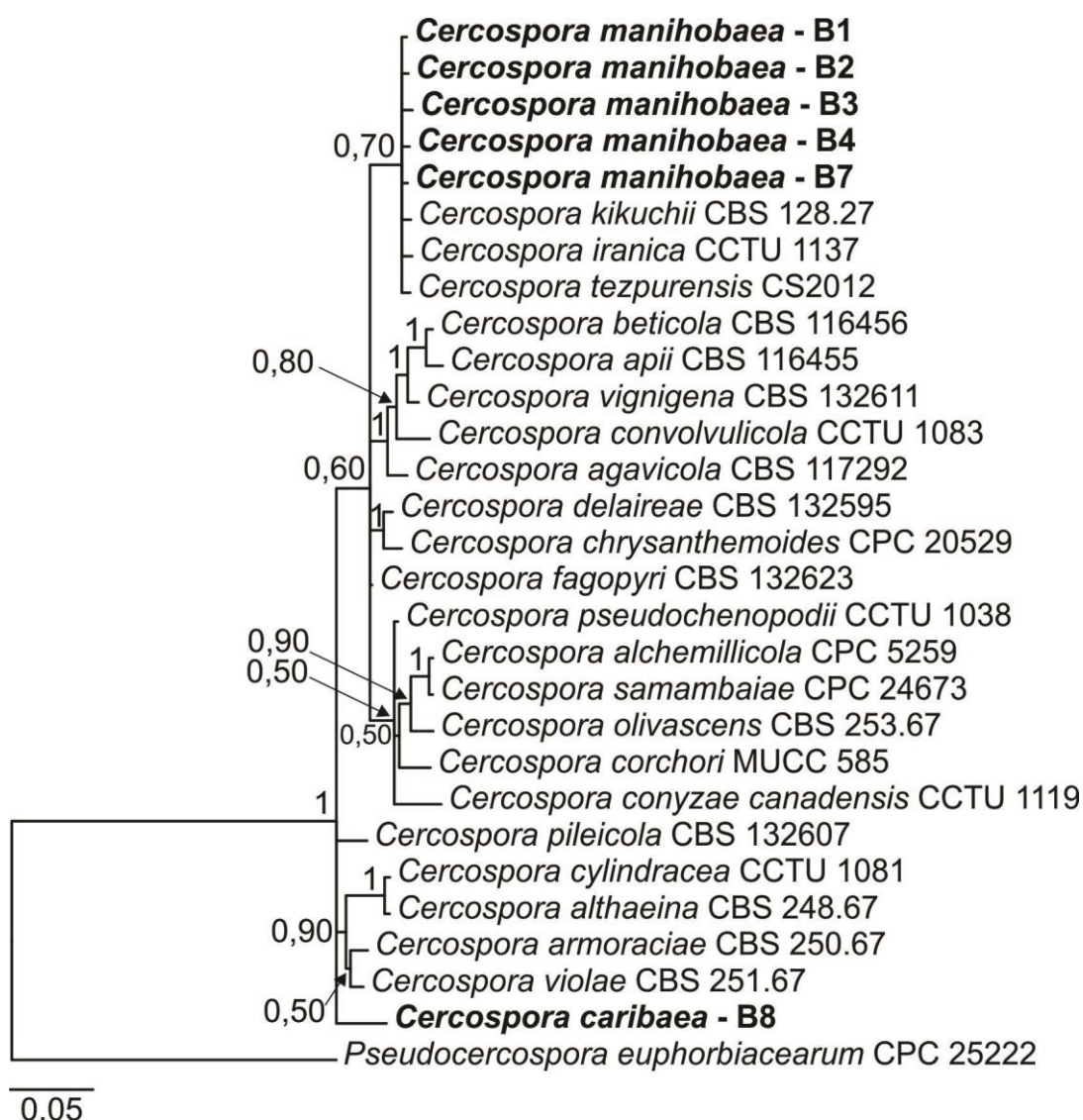


Figura 2. Árvore obtida de inferência bayesiana das sequências de TEF-1 α dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e de sequências de *Cercospora* da literatura. A espécie *Pseudocercospora euphorbiacearum* (CPC 25222) foi utilizada como outgroup.

A análise de sequências da região ITS incluiu 28 táxons, contendo 481 caracteres, dos quais dois foram informativos para parcimônia, 31 variáveis e 439 conservados. Os isolados não formaram grupos monofiléticos (Fig. 3). Embora a região ITS seja proposta como um código de barras padrão para estudos de relações filogenéticas dos fungos (SCHOCH et al., 2012), foi verificada uma resolução limitada para diferenciar as espécies de *Cercospora* neste estudo, o que também foi relatado em outros trabalhos (GROENEWALD et al., 2013; GROENEWALD et al., 2010; VALE,

2016). Groenewald et al. (2013) sugerem que outras regiões gênicas como ACT, CAL e HIS sejam mais eficientes para separar espécies do gênero *Cercospora*.

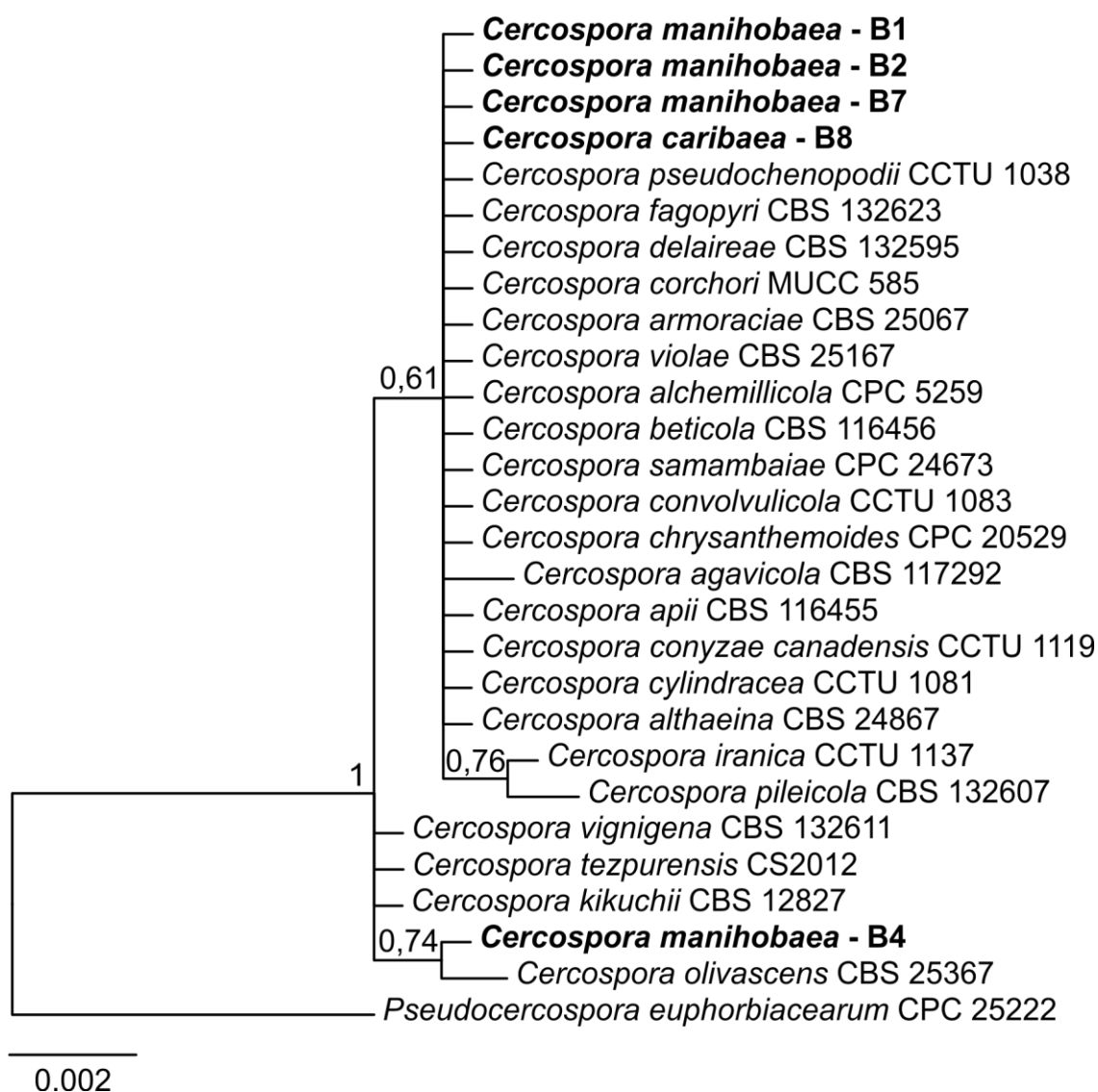


Figura 3. Árvore obtida de inferência bayesiana das sequências da região ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e de sequências de *Cercospora* da literatura. A espécie *Pseudocercospora euphorbiacearum* (CPC 25222) foi utilizada como *outgroup*.

A análise combinada de diferentes regiões gênicas tem sido bastante utilizada para a identificação molecular de espécies, inclusive do gênero *Cercospora* (GROENEWALD et al., 2006; MONTENEGRO-CALDERO'N et al., 2011). Neste estudo, a análise combinada dos conjuntos de dados de TEF-1 α e ITS incluiu 28 táxons,

contendo 794 caracteres, dos quais 32 foram informativos para parcimônia, 142 variáveis e 601 conservados. A árvore obtida nesta análise foi similar com a topologia da árvore obtida para TEF-1 α , sendo que os isolados formaram um único grupo monofilético com 100% de suporte. Não foi verificada a formação de subgrupos monofiléticos com suporte confiável, sugerindo a necessidade de outras regiões gênicas no estudo destas espécies (Fig. 4).

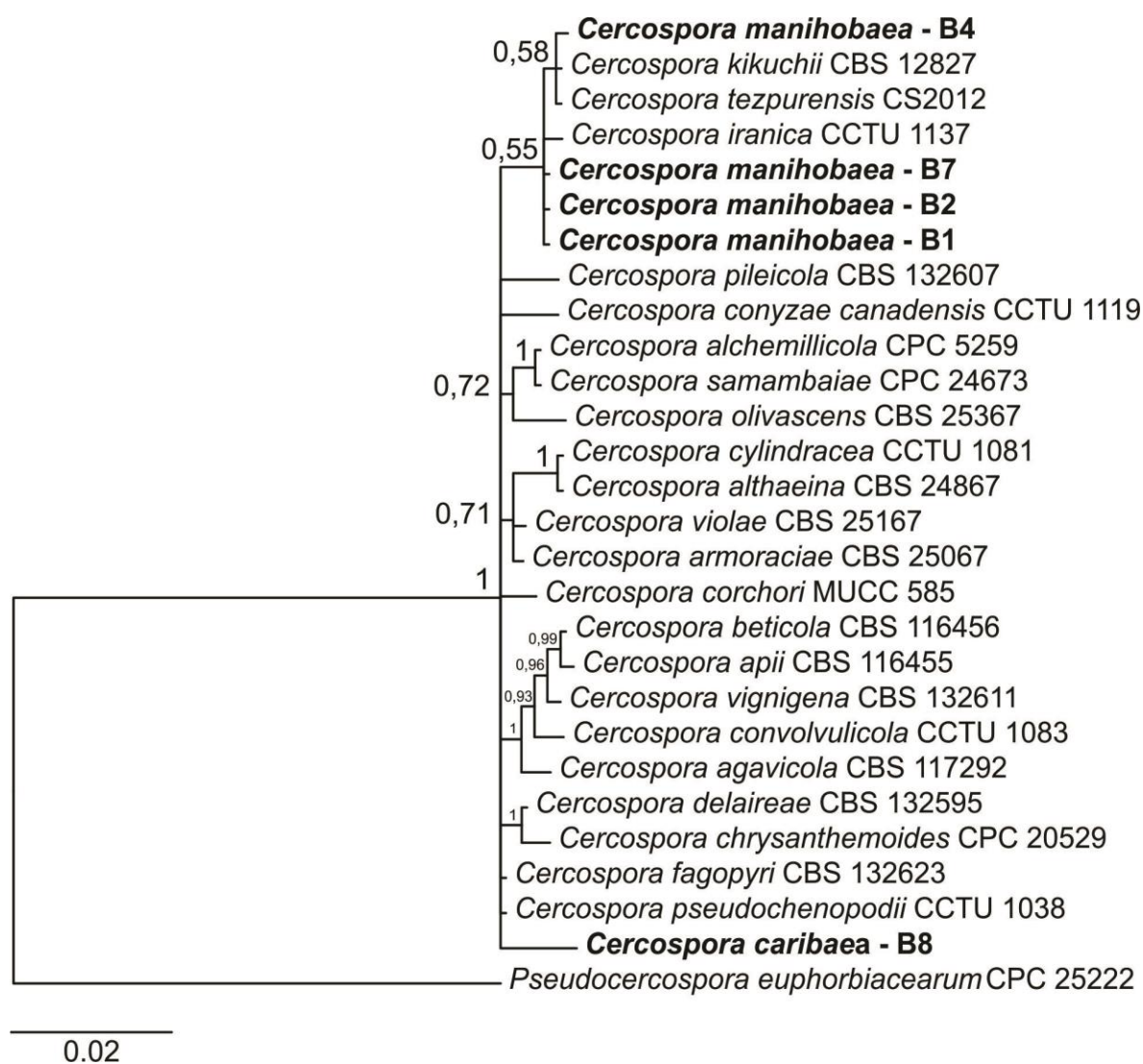


Figura 4. Árvore obtida de inferência bayesiana da análise combinada de sequências de TEF-1 α e ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha branca e de sequências de *Cercospora* da literatura. A espécie *Pseudocercospora euphorbiacearum* (CPC 25222) foi utilizada como *outgroup*.

Para os isolados de *Passalora* obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas, a análise de sequências TEF-1 α conteve 25 táxons com 555 caracteres, dos quais

62 foram informativos para parcimônia, 222 variáveis e 299 conservados. Foi verificada a formação de grupos monofiléticos dos isolados provenientes dos diferentes sintomas, com três clados distintos. Foi formado um clado separando os isolados obtidos de sintomas de mancha parda dos isolados de queima das folhas com 100% de probabilidade posterior, com exceção do isolado P13, que se mostrou distinto dos demais (Fig. 5).

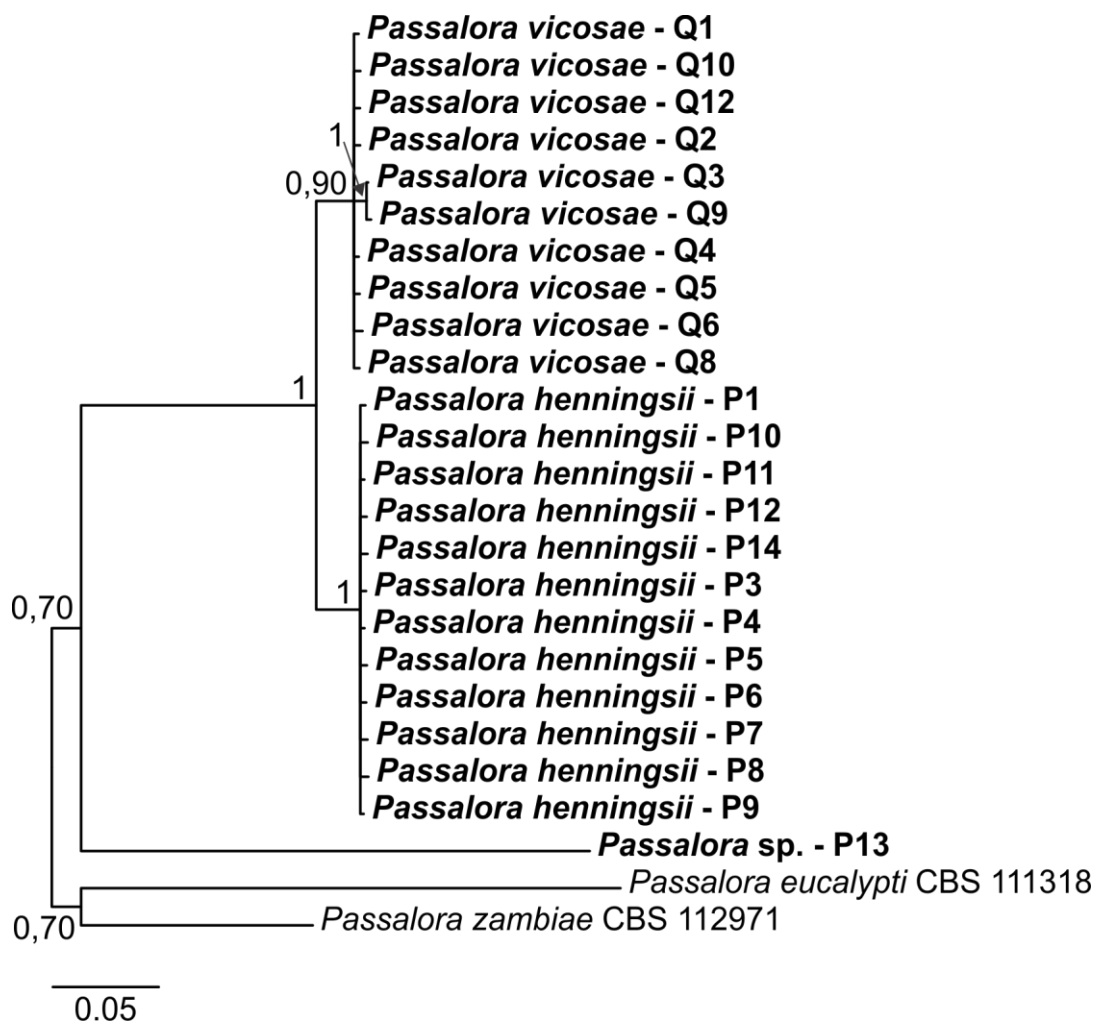


Figura 5. Árvore obtida de inferência bayesiana das sequências da região TEF-1 α dos isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas. As espécies *Passalora eucalypti* (CBS 111318) e *Passalora zambiae* (CBS 112971) foram utilizadas como outgroup.

A análise de sequências da região ITS dos isolados de *Passalora* incluiu 24 táxons, contendo 582 caracteres, dos quais 118 foram informativos para parcimônia, 250 variáveis e 317 conservados. Verificou-se que não houve separação entre os isolados obtidos de lesões de queima das folhas e os isolados de *P. henningsii* da

literatura e os isolados obtidos de lesões de mancha parda (100 % de suporte) (Fig. 6). Este resultado demonstra a dificuldade em separar os isolados associados às diferentes doenças na mandioca, com base apenas na análise de sequências da região ITS.

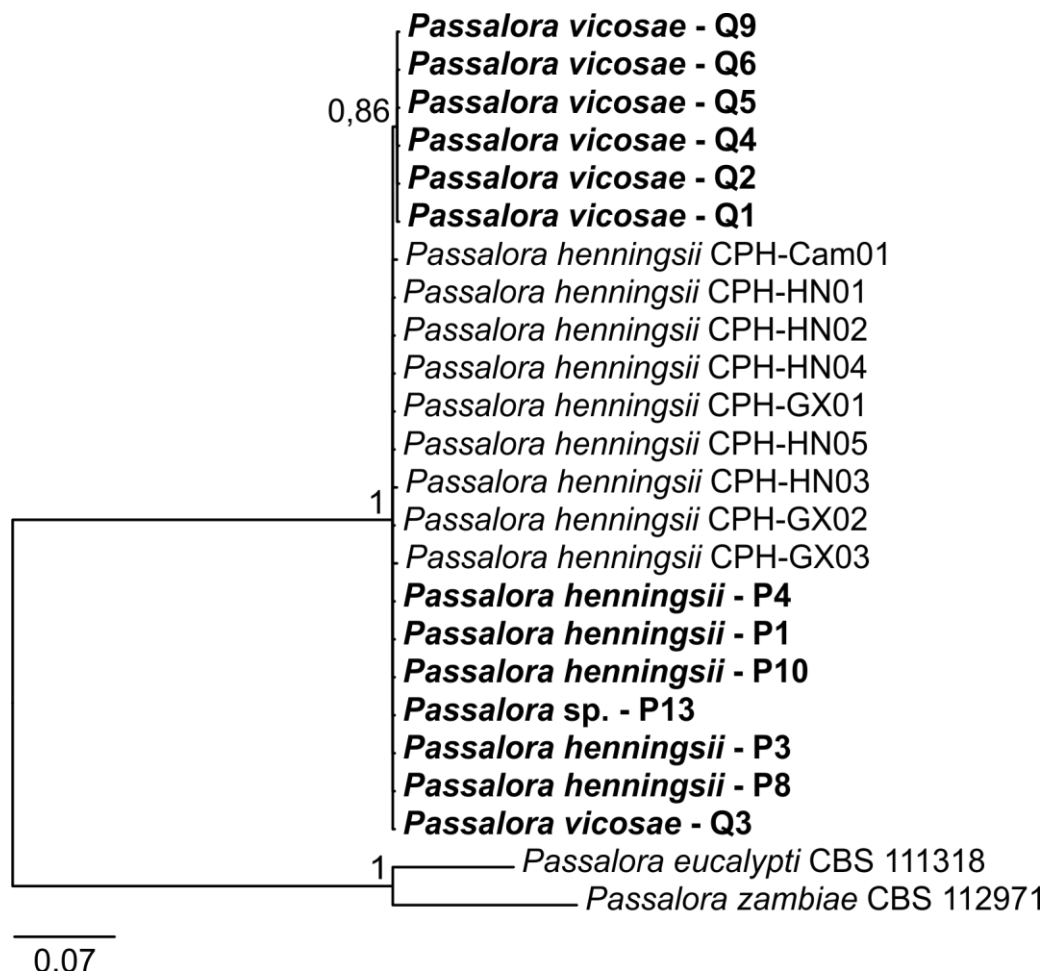


Figura 6. Árvore obtida de inferência bayesiana de sequências da região ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas. As espécies *Passalora eucalypti* (CBS 111318) e *Passalora zambiae* (CBS 112971) foram utilizadas como outgroup.

A análise combinada dos conjuntos de dados de TEF-1 α e ITS destes isolados (mancha parda e queima das folhas) incluiu 28 táxons e conteve 1137 caracteres, dos quais 180 foram informativos para parcimônia, 472 variáveis e 616 conservados. A árvore obtida foi similar com a topologia das árvores geradas com sequências da região TEF-1 α e ITS separadamente. Isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas formaram um grupo monofilético (100% de suporte) (Fig. 7). Neste caso, o

isolado P13 diferiu dos demais (100% de suporte), como verificado na análise de sequências de TEF-1 α .

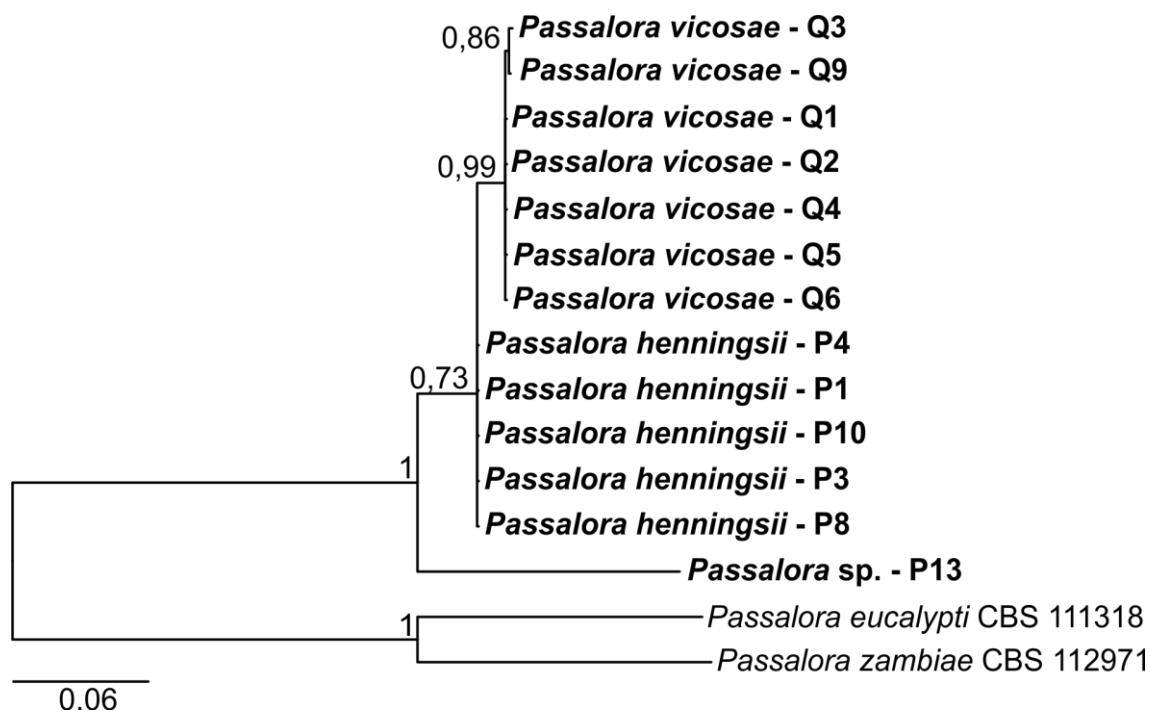


Figura 7. Árvore obtida de inferência bayesiana da análise combinada de sequências de TEF-1 α e ITS dos isolados obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas. As espécies *Passalora eucalypti* (CBS 111318) e *Passalora zambiae* (CBS 112971) foram utilizadas como *outgroup*.

As análises filogenéticas baseadas nas sequências de TEF-1 α e na análise combinada (TEF-1 α e ITS) auxiliaram na identificação dos agentes causais das três manchas foliares da mandioca, porém se verifica a necessidade de estudos envolvendo outras regiões gênicas.

Aliados a observações dos sintomas e de algumas características morfológicas dos isolados, os resultados permitiram classificá-los em cinco táxon, revelando um rico patossistema, ainda pouco explorado.

Um isolado representativo de cada táxon foi utilizado para a caracterização morfológica e avaliação da patogenicidade. A seguir, são apresentadas as características morfológicas destes isolados, Tabela 3 (em anexo):

✓ **Isolado B2 - Obtido de lesões de mancha branca (Fig. 8)**

Conidióforo pigmentado, longo e septado, com 5-6,8 x 166-336,3 μm . Conídios hialinos, multi-septados, aciculares, retos a curvos, com base truncada e ponta aguda, nas dimensões de 3,3-4,2 x 134-235,3 μm , multi-septado. As colônias apresentaram crescimento rápido (39,1-42,1 mm de diâmetro após 15 dias de crescimento a 25 °C), formato circular, com bordas transparentes, micélio compacto e aéreo, coloração branco-acinzentada e às vezes verde-olivácea, com reverso preto e bordas alaranjadas. Não apresentou esporulação em meio BDA. As características morfológicas do isolado B2 foram semelhantes às descritas para a espécie *Cercospora manihobae* (VIÉGAS, 1945).

Esta espécie tem sido associada à doença conhecida como mancha preta e só havia sido encontrada em folhas caídas, mas nunca *in vivo* (VIÉGAS, 1945). Em nosso estudo, apesar de ter sido obtida de folhas necróticas com a presença deste fungo, as lesões também foram observadas em folhas em bom estado (Figura 11), indicando que não se trata apenas de um fungo oportunista, mas sim de um patógeno em mandioca.

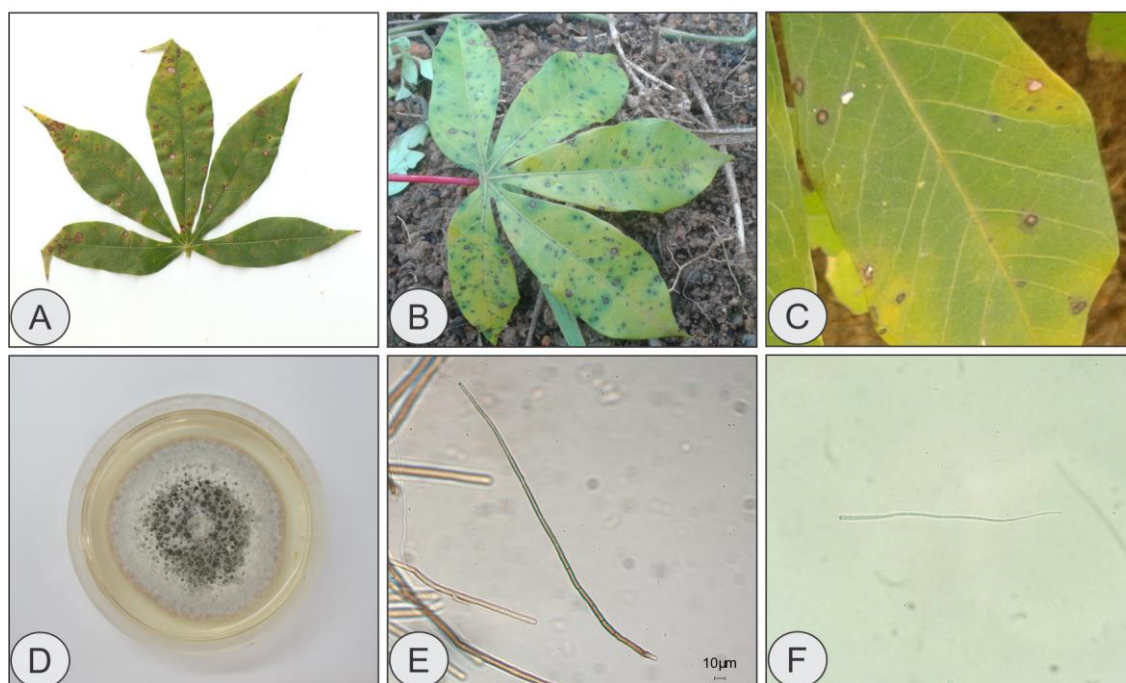


Figura 8. Mancha branca da mandioca – *Cercospora manihobae*. Folhas apresentando sintomas da doença (A e B); detalhe da lesão (C); colônia em meio BDA, com 30 dias de idade (D); conidióforo (E); conídio hialino e filiforme (F).

✓ **Isolado B8 – Obtido de lesões de mancha branca (Fig. 9)**

O isolado apresentou conidióforos de coloração escura, com 3,2-6,3 x 54,4-203 μm , e conídios hialinos, cilíndrico-obclavados, nas dimensões de 4,2-9,8 x 12,5-39,9 μm , com cicatriz proeminente, apresentando de 1 a 4 septos. As colônias apresentaram crescimento médio (29,8-39,3 mm de diâmetro em 30 dias a 25 °C), formato circular, micélio aéreo, com dobras proeminentes, liso, coloração branca, reverso na coloração branco alaranjada. Não houve esporulação em meio BDA. As características morfológicas de B8 coincidem com as características descritas para *Cercospora caribaea* (VIÉGAS, 1941; CHUPP, 1954; TERI, 1978).

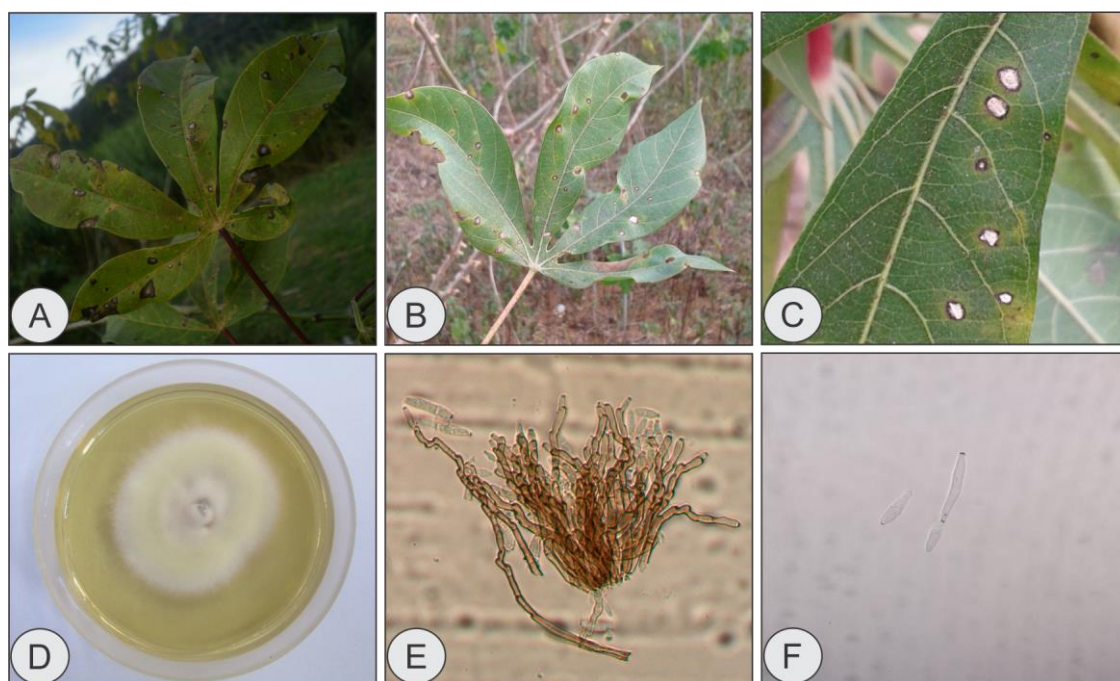


Figura 9. Mancha branca da mandioca – *Cercospora caribaea*. Folhas apresentando sintomas da doença (A e B); detalhe da lesão com centro claro (C); colônia em meio BDA, com 16 dias de idade (D); conidióforo (E); detalhe de conídios simples e em cadeia (F).

✓ **Isolado P3 - Obtido de lesões de mancha parda (Fig. 10)**

O isolado apresentou conidióforos agregados e septados, com coloração pálida, nas dimensões de 4-6 x 30-60 μm . Foram observados conídios cilíndricos, nas dimensões 5-8,8 x 16,2-56,1 μm , de coloração pálida-olivácea, com extremidades

arredondadas, base curta obcônica, ligeiramente curvos, apresentando de 1 a 7 septos. As colônias apresentaram crescimento lento (9,2-12,8 mm de diâmetro após 30 dias a 25 °C), com formato circular, margens onduladas, superfície lisa, opaca, coloração cinza-verde olivácea e reverso verde escuro, com micélio aéreo escasso. Apesar da escassa esporulação em meio BDA, foram encontrados alguns conídios em colônias velhas. As características morfológicas de P3 foram semelhantes às relatadas na literatura para *P. henningsii* (CHUPP, 1954; TERI, 1978; CROUS e BRAUN, 2003; PEI et al., 2014).

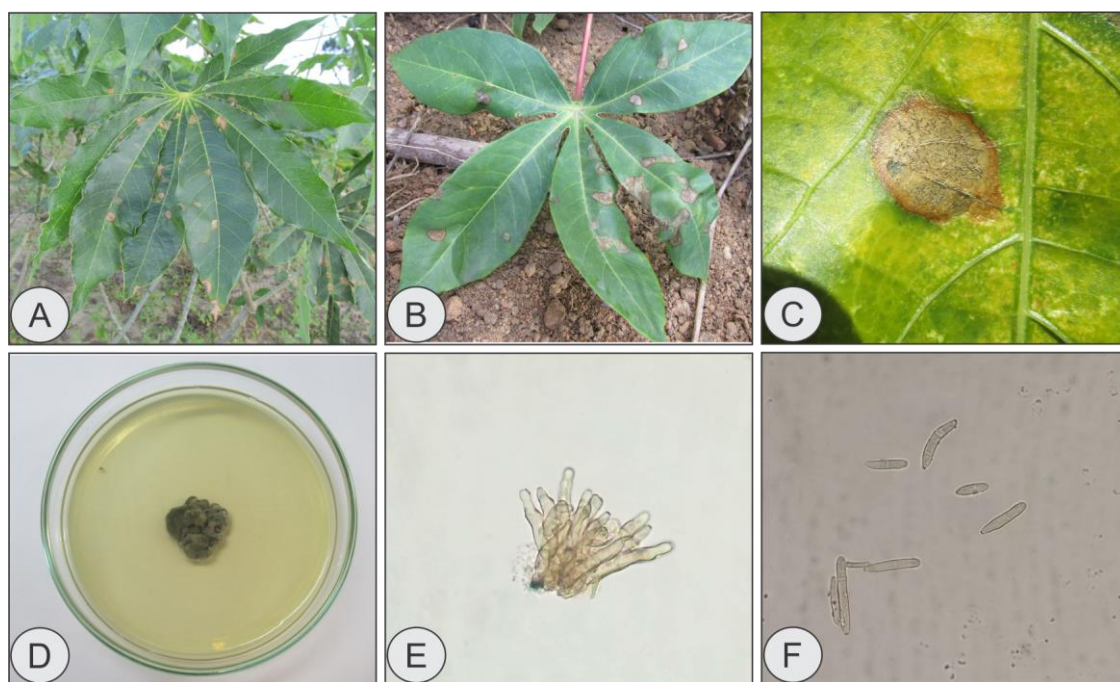


Figura 10. Mancha parda da mandioca - *Passalora henningsii*. Folhas apresentando sintomas da doença (A e B); detalhe da lesão com estruturas do patógeno (C); colônia em meio BDA, com 30 dias de idade (D); conidióforo (E); conídios (F).

✓ **Isolado P13 - Obtido de lesões de mancha parda (Fig. 11)**

Apresentou conídios hialinos, curtos, nas dimensões de 2,7-7,4 x 7,0-89,3 µm, com 1-9 septos, cicatriz pouco proeminente, formato obclavado, porção basal obcônica, extremidade obtusa. As colônias apresentaram crescimento médio (35,9-37,6 mm de diâmetro em 30 dias a 25 °C), formato circular, bordas transparentes, micélio aéreo, coloração e reverso preto. Foi observada esporulação em meio BDA, em culturas velhas

(de 30 dias). As características morfológicas do isolado P13 foram semelhantes às descritas para *Passalora* sp. (VIEGAS, 1941; 1945; CHUPP, 1954; CROUS e BRAUN, 2003)

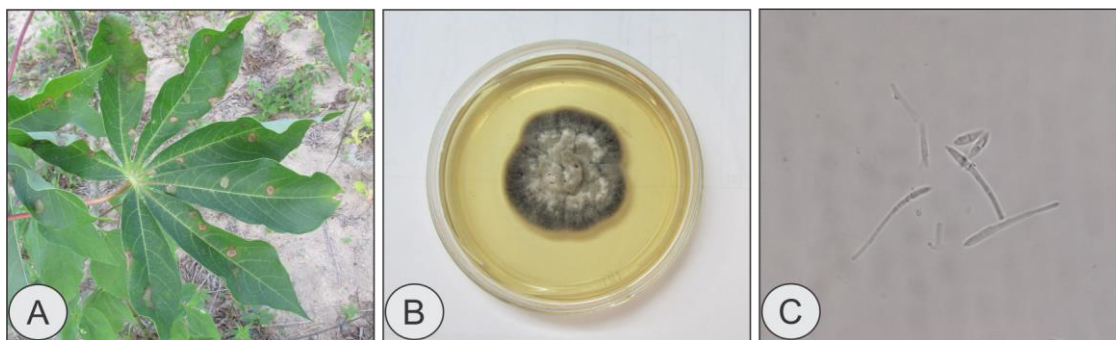


Figura 11. Mancha parda da mandioca – *Passalora* sp. Folhas com lesões da doença (A); colônia em meio BDA, com 30 dias idade (B); conídios (C).

✓ **Isolado Q3 - Obtido de lesões de queima das folhas (Fig. 12)**

O isolado apresentou conidióforos septados, de coloração marrom-avermelhada, apresentando 4,2-7 x 50,5-108,8 μm . Foram observados conídios com formato cilíndrico, arredondado nas pontas, com cicatriz proeminente, nas dimensões 4,4-9,2 x 17-102 μm , apresentando de 1 a 9 septos. As colônias apresentaram crescimento lento (8-9,5 mm de diâmetro após 30 dias a 25 °C), formato circular, com bordas arredondadas, micélio aéreo, coloração branco-cinza olivácea e reverso na coloração marrom-alaranjada. Não foi capaz de esporular em meio BDA. As características morfológicas de Q3 foram semelhantes às descritas para *Passalora vicosa* (CHUPP, 1954; SILVA, 2016).

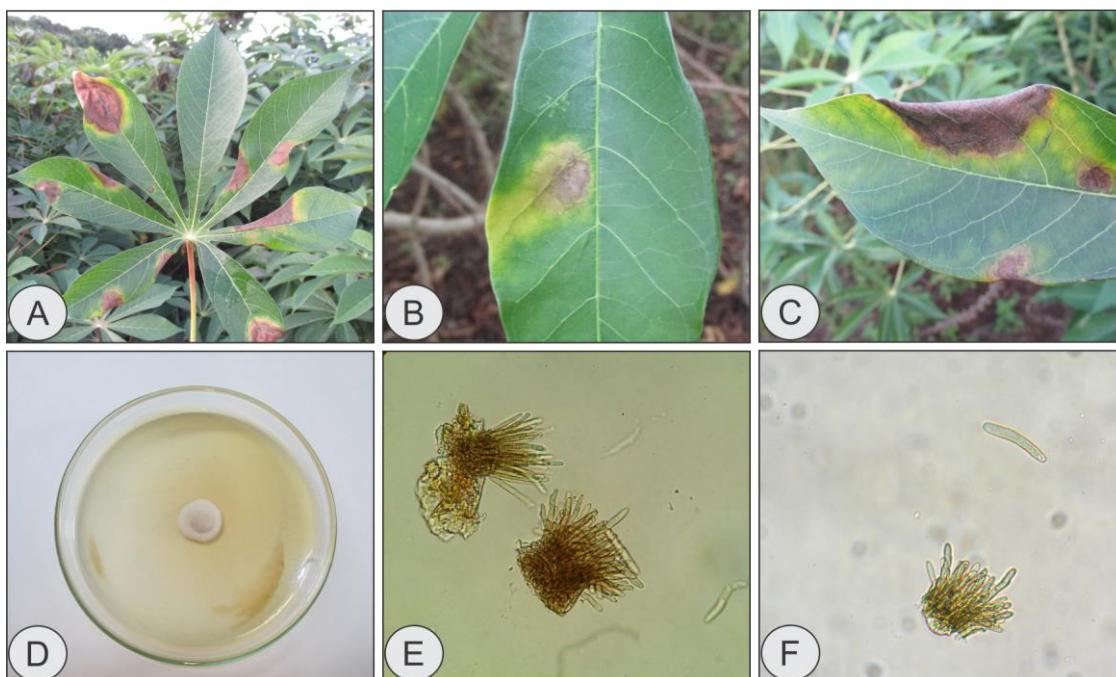


Figura 12. Queima das folhas da mandioca - *Passalora vicosa*. Folha apresentando sintomas da doença (A); detalhe do amarelecimento em lesões iniciais (B) e no bordo das folhas (C); colônia em meio BDA, com 30 dias de idade (D); conidióforos e conídios (E e F).

Além da caracterização morfológica, foi avaliada a patogenicidade dos isolados representativos: *Cercospora manihobae* (B2), *Cercospora caribaea* (B8), *Passalora henningsii* (P3), *Passalora* sp. (P13) e *Passalora vicosa* (Q3). Todos os isolados foram capazes de causar lesões necróticas quando as folhas de plantas de mandioca foram inoculadas com discos de micélio (Tabela 1; Fig. 13). Somente para os isolados de *Cercospora manihobae* (B2), *Cercospora caribaea* (B8) e *Passalora henningsii* (P3) foi possível comprovar a patogenicidade utilizando suspensão de conídios. Para os isolados *Passalora* sp. (P13) e *Passalora vicosa* (Q3), apesar das tentativas de inoculação, não houve sucesso, provavelmente devido à alta temperatura e baixa umidade relativa apresentada na região nos últimos meses, o que pode ter inviabilizado o desenvolvimento dos patógenos em campo.

Tabela 1. Reação dos diferentes isolados inoculados em plantas e folhas destacadas de mandioca

Espécies	Inoculação com suspensão de conídios	Sintomas	Inoculação com discos de micélio	Sintoma (necrose)
<i>Cercospora manihobaea</i> (B2)	+	+ (Fig. 13A)	+	+ (Fig. 13B)
<i>Cercospora caribaea</i> (B8)	+	+ (Fig. 13 C)	+	+ (Fig. 13D)
<i>Passalora henningii</i> (P3)	+	+ (Fig. 13 E)	+	+ (Fig. 13F)
<i>Passalora</i> sp. (P13)			+	+ (Fig. 13G)
<i>Passalora vicosa</i> (Q3)			+	+ (Fig. 13 H e I)

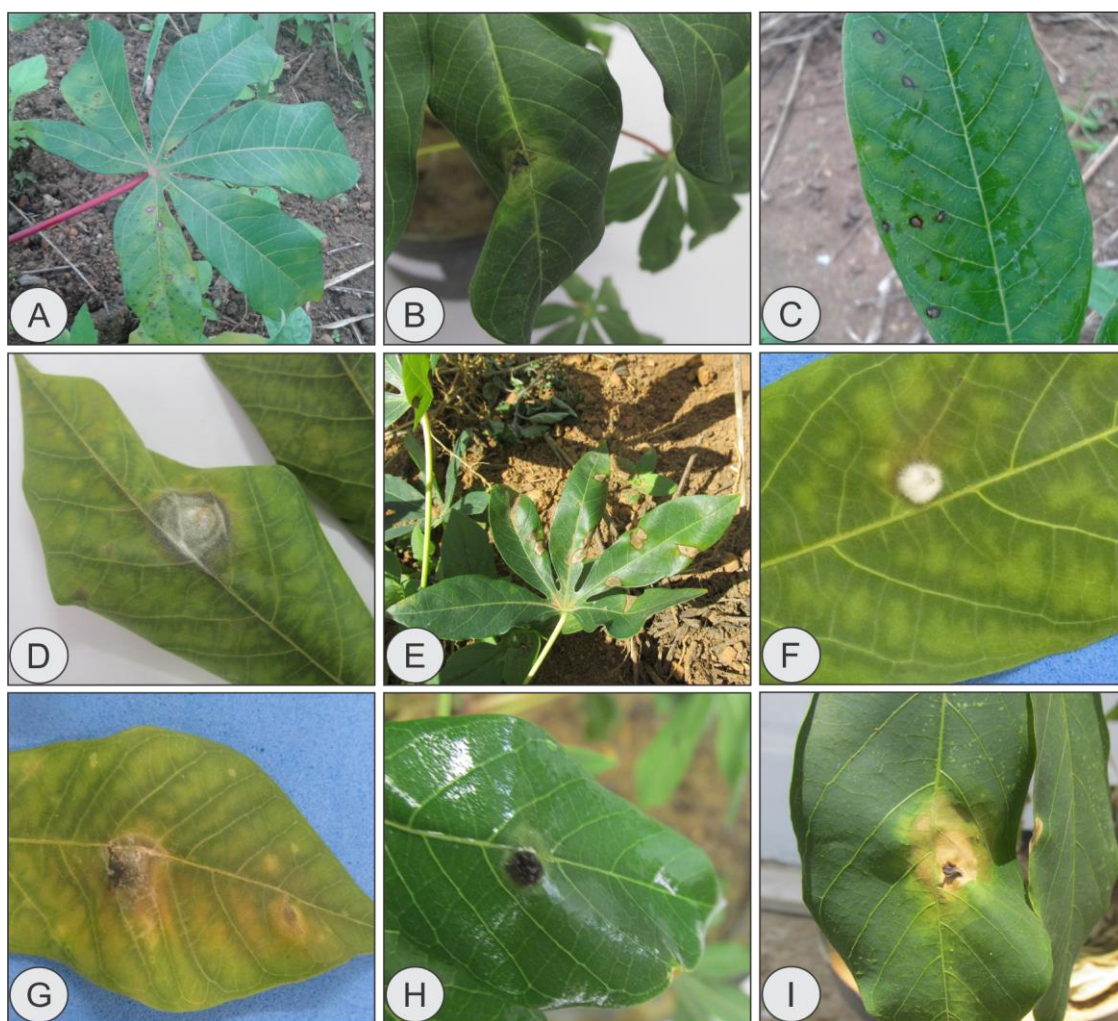


Figura 13. Folhas de mandioca apresentando sintomas após a inoculação com suspensão de conídios dos isolados B2 (A), B8 (C) e P3(E) e com discos de micélio dos isolados B2 (B), B8 (D), P3 (F), P13 (G), Q3 (H, I).

Neste estudo, foi verificado que não é possível separar o grupo *Cercospora* apenas com a análise dos dados moleculares das regiões ITS e TEF-1 α . Por outro lado, com base nos dados morfológicos, os isolados B1, B2, B3, B4 e B7, obtidos de lesões de mancha branca, puderam ser atribuídos à espécie *Cercospora manihobae*, uma vez que as características morfológicas foram semelhantes às descritas por Viégas (1945) e Chupp (1954) para esta espécie. O isolado B8, embora atualmente seja classificado dentro do gênero *Passalora*, mostrou-se mais próximo a espécies do gênero *Cercospora* baseado nas análises moleculares realizadas. Além disso, análises morfológicas sugerem que corresponda à espécie *Cercospora caribaea*.

Com relação aos isolados obtidos de lesões de mancha parda, os resultados mostraram que P1, P3, P4, P8 e P10 pertencem à espécie *P. henningsii*, tanto pela análise filogenética quanto morfológica. Porém, o isolado P13 apresentou características morfológicas bastante distintas de *P. henningsii* e das demais espécies de *Passalora* atualmente conhecidas infectando mandioca (CROUS e BRAUN, 2003). Além disso, pela análise filogenética com sequências combinadas das regiões ITS e TEF-1 α , este isolado diferiu dos demais obtidos de lesões de mancha parda e queima das folhas e de outras espécies de *Passalora*. Portanto, são necessários estudos com outras regiões gênicas e análises morfológicas mais aprofundadas para elucidar esta questão.

Por fim, os isolados obtidos de lesões de queima das folhas (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6 e Q9) foram morfolologicamente identificados como *Passalora vicosae*. No entanto, pela análise molecular, foi possível apenas agrupá-los como pertencentes ao gênero *Passalora*, uma vez que ainda existe uma carência de sequências deste gênero no GenBank, impossibilitando uma comparação.

Na literatura, apenas quatro espécies de cercosporóides têm sido associadas a doenças na cultura da mandioca, sendo escassos os dados moleculares a seu respeito (VIÉGAS, 1941; 1945; CHUPP, 1954, LOZANO e BOOTH, 1976; TERI, 1978; CROUS e BRAUN, 2003). Este é um dos primeiros estudos envolvendo a caracterização molecular de patógenos em mandioca, e os dados sugerem a existência de um complexo de espécies associadas às manchas foliares na cultura.

4 CONCLUSÕES

- Enquanto a região ITS mostrou-se limitada para diferenciar este grupo de patógenos, sequências TEF-1 α mostraram-se promissoras para a caracterização molecular de cercosporóides na cultura da mandioca;
- As análises filogenéticas e morfológicas sugerem que mais de um patógeno esteja associado ao mesmo sintoma;
- Os isolados obtidos de folhas de mandioca com sintomas de mancha parda foram identificados como *Passalora henningsii* e *Passalora* sp.;
- Os sintomas de mancha branca foram associados a duas diferentes espécies, *Cercospora caribaea* e *Cercospora manihobaea*;
- Os isolados obtidos de folhas de mandioca com sintomas de queima das folhas foram identificados como *Passalora vicosae*;
- Este estudo contribuiu para o melhor entendimento da etiologia das doenças causadas por cercosporóides na cultura da mandioca.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 922.
- ANDRADE, K. M. **Caracterização de fungos Cercosporiídes associados à vegetação de mata atlântica e cercanias no Estado do Rio de Janeiro**. 2016. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2016.
- AYESU-OFFEI.; ANTWI-BOASIAKO. Production of Microconidia by *Cercospora henningsii* Allesch, Cause of Brown Leaf Spot of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and Tree Cassava (*Manihot glaziovii* Muell.-Arg.). **Annals of Botany**, London, v. 78, p. 653-657, 1996.
- BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Is morphology in *Cercospora* a reliable reflection of generic affinity. **Phytotaxa**, Auckland, v. 213, n. 1, p. 22–34, 2015.
- BANITO, A.; VERDIER, V.; KPÉMOUA, K. E.; WYDRA, K. Assessment of major cassava diseases in Togo in relation to agronomic and environmental characteristics in a systems approach. **African Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 9, p. 418-428, 2007.
- BATISTA, M. F.; XAVIER, J. J. B. N.; LOURD, M. **Doenças da Mandioca**. Manaus: EMBRAPA-UEPAE de Manaus, 1981. 4 p. (EMBRAPA-UEPAE de Manaus. Comunicado Técnico, 23).
- BORGES, M. F.; FUKUDA, W. M. G.; ROSSETTI, A. G. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1559-1565, 2002.
- BRAUN, U.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C. Cercosporoid fungi (*Mycosphaerellaceae*) 3. Species on monocots (Poaceae true grasses). **IMA Fungus**, v. 6, n. 1, p. 25–97, 2015.
- BRAUN, U.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C. Cercosporoid fungi (*Mycosphaerellaceae*) 5. Species on dicots (*Anacardiaceae* to *Annonaceae*). **International Mycological Association Fungus**, Madrid, v. 7, n. 1, p. 161–216, 2016.
- BRAUN, U.; NAKASHIMA, C.; CROUS, P. W. Cercosporoid fungi (*Mycosphaerellaceae*) 1. Species on other fungi, *Pteridophyta* and *Gymnospormar*. **International Mycological Association Fungus**, Madrid, v. 4, n. 2, p. 265-345, 2013.
- BREKELBAUM, T.; BELLOTI, A.; LOZANO, J. C. **Proceedings cassava protection workshop**. Cali: Centre International de Agricultura Tropical, 1977, p. 253.

BRIOSIO, P. S.; POZZER, L.; MONTANO, H. G.; PIMENTEL, J. P. **Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia**. Parte 1- aplicações em fitopatógenos e vetores, v. 9, p. 79-118, 2001.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, p. 553–556, 1999.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine e Hygiene**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.

CENÓZ, P. J.; BURGOS, A. M.; LÓPEZ, A. E. Factores ambientales que afectan la calidad de raíces en mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Horticultura Argentina**, Mandoza, v. 26, p. 5-9, 2007.

CHUPP, C. **A Monograph of the fungus genus *Cercospora***. New York: Published by the author, 1954. p. 667.

CIAT. **Descripcion de las enfermedades de la yuca**: guia de estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema. Cali, Colombia, 1982, 35 p.

CONAB. Conjuntura nacional da cultura da mandioca do mês de janeiro. **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2017, p. 19.

CROUS, P. W.; KANG, J. C.; BRAUN, U. A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequences and morphology. **Mycologia**, v. 93, p. 1081-1101, 2001.

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

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 12.1-12.21, 2015.

CROUS, P. W.; BRAUN, U. **Mycosphaerella and its anamorphs**: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2003. p. 571.

CROUS, P. W.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 58, p. 1–32, 2007.

CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J.; GUARRO, J.; CHEEWANGKON, R.; VAN DER BANK, M.; SWART, W.; STCHIGEL, A. M.; CANO-LIRA, J. F.; ROUX, J.; MADRID, H.; DAMM, U.; WOOD, A. R.; SHUTTLEWORTH, L. A.; HODGES, C. S.; MUNSTER, M.; YÁÑEZ-MORALES, M. J.; ZÚÑIGA-ESTRADA, L.; CRUYWAGEN, E. M.; HOOG, G. S.; SILVERA, C.; NAJAFZADEH, J.; DAVISON, E. M.; DAVISON, P. J.; BARRETT, M. D.; BARRETT, R. L.; MANAMGODA, D. S.; MINNIS, A. M.; KLECZEWSKI, N. M.; FLORY, S. L.; CASTLEBURY, L. A.;

CLAY, K.; HYDE, K. D.; MAÚSSE-SITOE, S. N.; CHEN, S.; LECHAT, C.; HAIRAUD, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; PAWŁOWSKA, J.; WILK, M.; SLIWINSKA-WYRZYCHOWSKA, A.; MEṬRAK, M.; WRZOSEK, M.; PAVLIC-ZUPANC, D.; MALEME, H. M.; SLIPPERS, B.; CORMACK, W. P. M.; ARCHUBY, D. I.; GRÜNWALD, N. J.; TELLERÍA, M. T.; DUEÑAS, M.; MARTÍN, M. P.; MARINCOWITZ, S.; DE BEER, Z. W.; PEREZ, C. A.; GENÉ, J.; MARIN-FELIX, Y.; GROENEWALD, J. Z. Fungal Planet description sheets. **Persoonia**, Leiden, v. 31, p. 154–213, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Faostat**, 2017. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 15 fev. 2017.

FERREIRA, J.; NASCIMENTO, G.; NEVES, Y.; GOMES, F.; NASCIMENTO, L. Levantamento de doenças e avaliação da incidência e severidade da mancha branca em mandioca na região do Alto Juruá, Acre. **Enciclopédia Biosfera**, Goiana, v. 8, p. 712-723, 2012.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology Saint Paul**, v. 91, n. 7, p. 648-658, 2001.

GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H. D.; PARK, J. H.; JAMA, A. N.; GROENEWALD, M.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 75, p. 115–170, 2013.

GROENEWALD, J.Z., GROENEWALD, M., BRAUN, U., CROUS, P.W., *Cercospora* speciation and host range. In: LARTEY, R.T., et al. (Eds.), **Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet and Related Species**. APS Press, St. Paul, USA, p. 21 e 37, 2010.

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, p. 951-959, 2005.

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J.Z.; BRAUN, U.; CROUS, P.W. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola*, and description of *C. apiicola*, a novel species from celery, **Mycologia**, v. 98, p. 275-285, 2006.

GUATIMOSIM, E.; SCHWARTSBURD, P.B.; BARRETO, R.W.; CROUS, P.W. Novel fungi from an ancient niche: cercosporoid and related sexual morphs on ferns. **Persoonia**, Leiden, v. 37, p. 106–141, 2016.

HOWELER, R.; LUTALADIO, N.; THOMAS, G. **Cassava** - A guide to sustainable production intensification. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. p. 130.

HUANG, F.; GROENEWALD, J.Z.; ZHU, L.; CROUS, P. W.; LI, H. Cercosporoid diseases of Citrus. **Mycologia**, New York, v. 107, p. 1151–1171, 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acesso em: 15 fev. 2017.

LIMA, M. H. D.; LOUREIRO, E. S.; KASSAB, S. O.; SILVA, A. S. Eficiência de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas de Bemisiatuberculata (Bondar, 1923) (Hemiptera: Aleyrodidae) em cultivo de mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v. 8, p. 47-56, 2012.

LIU, Z.; BRAUN, U.; CROUS, P. W.; SI, J.; ZHANG Y. Taxonomy and phylogeny of cercosporoid fungi (*Mycosphaerellaceae*) from China 1. **Phytotaxa**, Auckland, v. 278, n. 3, p. 212-224, 2016.

LOZANO, J. C. **Descripción de las enfermedades de la yuca**. Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Colômbia, 1980. 30 p.

LOZANO, J. C. Outbreaks of cassava diseases and losses induced. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p.7-14, 1989.

LOZANO, J. C.; BOOTH, R. H. Diseases of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Pest Articles e News Summaries**, London, v. 20, p. 30-54, 1974.

LOZANO, J. C.; BOOTH, R. H. **Diseases of cassava** (*Manihot esculenta* Crantz). Calia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1976. p. 45

MADDISON, W.P.; MADDISON, D. R. Mesquite: a molecular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>. 2011.

MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P.; OLIVEIRA, S. A. S. Doenças da Mandioca. In: HIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. eds. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p. 515-522.

MEGHVANSI, M. K.; KHAN, M. H.; GUPTA, R.; VEER, V. Identification of a new species of *Cercospora* causing leaf spot disease in *Capsicum assamicum* in northeastern India. **Research in Microbiology**, Paris, v. 164, p. 894-902, 2013.

MELO, G. S. **Recomendações práticas para o controle de doenças de mandioca, no Estado de Pernambuco**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 1986. (Comunicado técnico, 9).

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. in **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop** (GCE), New Orleans, p. 1-8. 2010.

MONTENEGRO-CALDERÓN, J.G., MARTÍNEZ-A´LVAREZ, J.A., VIEYRA-HERNÁNDEZ, M.T., RANGEL-MACÍAS, L.I., RAZZO-SORIA, T., CHA´VEZ-

HERRERA, R., PONCE- NOYOLA, P., LEAL-MORALES, C.A., Molecular identification of two strains of *Cercospora rodmanii* isolated from water hyacinth present in Yuriria lagoon, Guanajuato, Mexico and identification of new hosts for several other strains. **Fungal Biology**, v. 115, p. 1151-1162, 2011.

MSIKITA, W., B. JAMES, E. NNODU, J. LEGG, K. WYDRA, AND F. OGBE. **Disease control in cassava farms**. Nigeria: International Institute of Tropical Agriculture, 2000. 15 p.

MYCOBANK. **International mycological association**. Disponível em: <http://www.mycobank.org>. Acesso em 20 de fev. de 2017.

NGUANHOM, J.; CHEEWANGKOON, R.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; TO-ANUN, C.; CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of *Cercospora* spp. from Northern Thailand. **Phytotaxa**, Auckland, v. 233, n. 1, p. 27–48, 2015.

NYLANDER, J. A. A. **MrModeltest v. 2.2**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 95, p. 2044 – 2049, 1998.

PALOMAR, M. K.; MARTINEZ, M. A. Reaction of cassava plants to brown leaf spot infection. **Annals Tropical Research**, v. 10, p. 1-8, 1988.

PEI, Y.; SHI, T.; LI, C.; LIU, X.; CAI, J.; HUANG, G. Distribution and pathogen identification of cassava brown leaf spot in China. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 3461-3473, 2014.

PINTO, F. C. Aspectos da Cadeia produtiva da mandioca em Feira de Santana no distrito de Maria Quitéria (povoado de Lagoa Grande e Olhos D'água das Moças). **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 43, p. 157-173, 2010.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Syst Biol**, v. 53, p. 793–808, 2004.

QUAEDVLIEG, W., BINDER, M., GROENEWALD, J. Z., SUMMERELL, B. A., CARNEGIE, A. J., BURGESS, T. I., & CROUS, P. W. Introducing the Consolidated Species Concept to resolve species in the *Teratosphaeriaceae*. **Persoonia**, Leiden, v. 33, p. 1-40, 2014.

RAMBAUT A. 2009. **FigTree version 1.3.1** [computer program] <http://tree.bio.ed.ac.uk>

RAMIRO, J. **Deteção molecular de fungos fitopatogênicos associados às sementes de soja**. 2015. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências: Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo. 2015.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 43, p. 304-311, 1996.

RAYNER, R.W. **A mycological colour chart**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1970. 34 p.

REDDY, P. P. **Plant protection in tropical root and tuber crops**. New york: Springer. 2015. p. 336.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; TESLENKO, M. MrBayes v.3.2: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, n. 19, v. 12, p. 1572-1574, 2011.

SANTOS, R. P.; CARMO, M. G. F.; PARRAGA, M. S.; MACAGNAN, D.; LOPES, C. A. Avaliação de cultivares de mandioca, para consumo *in natura*, quanto à resistência à mancha parda da folha. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 232-237, 2004.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; CONSORTIUM, F. B. Nuclear ribosomal *internal transcribed spacer* (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SENA, M. G. C. Aspectos sociais. In: SOUZA, L. S.; FARIAS, A. R. N.; MATTOS, P. L. P.; FUKUDA, W. M. G. **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 433-454.

SILVA, H.S.A.; ANDRADE, E. C. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da mandioca no Brasil. In: HAMADA, R. C. E.; BETTIOL, W. ed. **Impacto das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2011, p. 263-272.

SILVA, M. **Exploring fungal diversity: *Passalora*, *Pseudocercospora*, *Sirosporium* and *Zasmidium* on brazilian plants**. 2016. 103p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

SILVA, M. F.; CAVALCANTE, M. A.; LIMA, D. M.; POROCA, D. M. Influência de fatores climáticos e idade da planta na ocorrência de cercosporiose em mandioca (*Manihot esculenta*). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, n. 13, p. 51-53, 1988.

SOUZA, J. S.; OTSUBO, A. A. Perspectivas e potencialidades de mercados para os derivados de mandioca. In: OTSUBO, A.A.; MERCANTE, F. M.; MARTINS, C. de S. (Coord.). **Aspectos do Cultivo da Mandioca em Mato Grosso do Sul**. Dourados/Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste/UNIDERP, 2002. p. 13-30.

SOUZA, L. S.; FIALHO, J. F. **Sistema de produção de mandioca para a região do cerrado**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 61 p.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D. et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2016.

TERI, J.; THURSTON, H.; LOZANO, J. Effect of brown leaf spot and *Cercospora* leaf blight on cassava productivity. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 57, n. 3, p. 239-243, 1980.

TERI, J. M. **Brown leaf spot and cercospora leaf blight of cassava: epidemiology and importance**. 1978. 101 f. Tese (Doutorado em Filosofia) - Faculty Graduate school of Cornell University, New York, 1978.

TERI, J. M. THURSTON, H. D.; LOZANO, J. C. The *Cercospora* leaf diseases of cassava. CIAT. In: BREKELBAUM, T.; BELLOTI, A.; LOZANO, J. D. ed. **Proceedings of cassava protection workshop**. Cali: Annual Report, 1978, p. 101-116.

TERRY, E. R.; OYEKAN, J. O. Cassava diseases of Africa reviewed. **Span**, v. 19, n. 3, p. 116-118, 1976.

TREMACOLDI, C. R. Manejo das principais doenças da cultura da mandioca no estado do Pará. In: MODESTO JUNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. (ed.). **Cultura da mandioca**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. p. 197.

VALE, P. A. S. **Caracterização de *Cercospora coffeicola* por filogenia molecular multigênica**. 2016. 64 f. Dissertação (Biotecnologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

VALLE, T. L.; LORENZI, J. O. Variedades melhoradas de mandioca como instrumento de inovação, segurança alimentar, competitividade e sustentabilidade: contribuições do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 15-34, 2014.

VIÉGAS, A. P. Alguns fungos do Brasil: *Cercospora*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 1-160, 1945.

VIÉGAS, A. P. Manchas das folhas da mandioca, produzidas por *Cercosporas*. **Bragantia**, Campinas, p. 233-248, 1941.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; ET, A. L. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T.J. **A guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WYDRA, K.; VERDIER, V. Occurrence of cassava diseases in relation to environmental, agronomic and plant characteristics. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 93, p. 211-226, 2002.

Anexos

Tabela 2. Informações sobre os isolados utilizados nesse estudo

Código	Espécie	Hospedeiro	Número de Acesso Genbank	
			ITS	TEF-1 α
B1	<i>Cercospora caribae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
B2	<i>Cercospora caribae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
B3	<i>Cercospora caribae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
B4	<i>Cercospora caribae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
B8	<i>Passalora manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
CBS 128.27	<i>Cercospora kikuchii</i>	<i>Glycine max</i>	DQ835070	DQ835088
Cs 2012	<i>Cercospora tezpurenensis</i>	-	KC351743	KC513746
CCTU 1137	<i>Cercospora iranica</i>	<i>Vicia faba</i>	KJ886513	KJ886352
CBS 132607	<i>Cercospora pileicola</i>	<i>Pilea pumila</i> (= <i>P. mongolica</i>)	JX143634	JX143393
CCTU 1119	<i>Cercospora conyzae-canadensis</i>	<i>Conyza canadenses</i>	KJ886445	KJ886284
CPC 5259	<i>Cercospora alchemillicola</i>	<i>Alchemilla mollis</i>	JX143525	JX143279
CPC 24673	<i>Cercospora samambaiae</i>	<i>Thelypteris dentata</i>	KT037514	KT037474
CBS 253.67	<i>Cercospora olivascens</i>	<i>Aristolochia clematidis</i>	JX143632	JX143391
CCTU 1081	<i>Cercospora cylindracea</i>	<i>Lactuca serriola</i>	KJ886449	KJ886288
CBS 248.67	<i>Cercospora althaeina</i>	<i>Althaea rósea</i>	JX143530	JX143284
CBS 251.67	<i>Cercospora violae</i>	<i>Viola tricolor</i>	JX143737	JX143496
CBS 250.67	<i>Cercospora armoraciae</i>	<i>Armoracia rusticana</i> (= <i>A. lapathifolia</i>)	JX143545	JX143299
MUCC 585	<i>Cercospora corchori</i>	<i>Corchorus olitorius</i>	JX143584	JX143342
CBS 116456	<i>Cercospora beticola</i>	<i>Beta vulgaris</i>	AY840494	AY840494
CBS 116455	<i>Cercospora apii</i>	<i>Apium graveolens</i>	AY840519	AY840486
CBS 132611	<i>Cercospora vignigena</i>	<i>Vigna unguiculata</i> (= <i>V. sinensis</i>)	JX143734	JX143493
CBS 117292	<i>Cercospora agavicola</i>	<i>Agave tequilana</i> var. azul	AY647237	AY966897
CBS 132595	<i>Cercospora delaireae</i>	<i>Delairea odorata</i>	JX143587	JX143345
CPC 20529	<i>Cercospora chrysanthenopodes</i>	-	KC005779	KC005814
CBS 132623	<i>Cercospora fagopyri</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i>	JX143594	JX143352
CCTU 1038	<i>Cercospora pseudochenopodii</i>	<i>Chenopodium</i> sp.	KJ886516	KJ886355
CPC 25222	<i>Pseudocercospora euphorbiacearum</i>	<i>Dalechampia</i> sp.	KT290145	KT290199
CPH-Cam01	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847952	-
CPH-HN01	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847944	-
CPH-HN02	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847945	-
CPH-HN03	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847946	-
CPH- HN04	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847947	-
CPH-HN05	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847951	-

CPH- GX01	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847948	-
CPH- GX02	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847949	-
CPH- GX03	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	FR847950	-
CBS 111318	<i>Passalora eucalypti</i>	<i>Eucalyptus saligna</i>	GU269845	KF903445
CBS 112971	<i>Passalora zambiae</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	AY725523	KF903156
P1	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P3	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P4	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P5	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P6	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P7	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P8	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P9	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P10	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P11	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P12	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P13	<i>Passalora</i> sp.	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
P14	<i>Passalora henningsii</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q1	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q2	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q3	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q4	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q5	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q6	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q8	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q9	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q10	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-
Q12	<i>Passalora vicosae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	-	-

Fonte: CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC = Coleção de Pedro Crous, Holanda; CCTU: Coleção de Cultura da Universidade de Tabriz, Tabriz, Irã; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture.

Tabela 3. Quadro resumo das características de conídios e conidióforos de cercosporóides associados às manchas foliares da mandioca, descritas na literatura e obtidas neste estudo

Espécie	Dimensão do conídio (µm)	Septos	Dimensão do conidióforo (µm)	Referências
Mancha Parda				
<i>C. henningsii</i>	4-7 x 30-85	2-8	3,5-5 x 10-50	Chupp (1954)
<i>P. henningsii</i>	5-8,8 x 16,2-56,1	1-7	4-6 x 30-60	Neste estudo (P3)
<i>Passalora</i> sp.	2,7-7,4 x 7,0-89,3	1-9	-	Neste estudo (P13)
Queima das Folhas				
<i>C. vicosae</i>	4-6 x 25-100	3-11	4-6 x 50-150	Chupp (1954)
<i>P. vicosae</i>	4,4-9,2 x 17-102	1-9	4,2-7 x 50,5-108,8	Neste estudo (Q3)
Mancha Branca				
<i>C. caribaea</i> *	4-8 x 20-90	1-6	3,5-5 x 50-200	Chupp (1954)
<i>P. manihotis</i>	4,2-9,8 x 12,5-39,9	1-4	3,2-6,3 x 54,4-203	Neste estudo (B8)
Mancha Preta/Mancha branca				
<i>C. manihobae</i>	3,5-5 x 80-270	Multi	4-6 x 70-1000	Chupp (1954)
<i>C. manihobae</i>	3,3-4,2 x 134-235,3	Multi	5-6,8 x 166-336,3	Neste estudo (B2)

*Atualmente descrita como *Passalora manihotis*.