



**CAMILA CRISTINA LAGE DE ANDRADE**

**ESTUDO COMPARATIVO DE ISOLADOS DE**  
*Cercospora coffeicola*: ANÁLISES  
MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E PROCESSO  
INFECCIOSO NA INTERAÇÃO COM CAFEEIRO

**LAVRAS – MG**

**2015**

**CAMILA CRISTINA LAGE DE ANDRADE**

**ESTUDO COMPARATIVO DE ISOLADOS DE *Cercospora coffeicola*:  
ANÁLISES MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E PROCESSO INFECCIOSO  
NA INTERAÇÃO COM CAFEEIRO**

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

Orientador

Dr. Eduardo Alves

Coorientadora

Dra. Sandra Marisa Mathioni

**LAVRAS – MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Andrade, Camila Cristina Lage de.

Estudo comparativo de isolados de *Cercospora coffeicola* :  
análises moleculares, bioquímicas e processo infeccioso na  
interação com cafeeiro / Camila Cristina Lage de Andrade. –  
Lavras : UFLA, 2015.

121 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Cercosporiose do tipo olho pardo. 3.  
Cercosporiose do tipo negra. 4. Estudos moleculares. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CAMILA CRISTINA LAGE DE ANDRADE**

**ESTUDO COMPARATIVO DE ISOLADOS DE *Cercospora coffeicola*:  
ANÁLISES MOLECULARES, BIOQUÍMICAS E PROCESSO INFECCIOSO  
NA INTERAÇÃO COM CAFEEIRO**

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

APROVADA em 4 de agosto de 2015

Dra. Sandra Marisa Mathioni Instituto de Biotecnologia de Delaware, EUA

Dr. César Botelho EPAMIG

Dra. Deila Magno Santos Botelho UFLA

Dra. Maria Ferreira UFLA

Dr. Eduardo Alves  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2015**

A Deus, pela vida e coragem para seguir em frente.

Aos meus pais Ronaldo e Maria da Conceição, pelo amor incondicional.

À minha irmã Bruna, pelo incentivo.

Ao Antonio, pelo companheirismo, apoio e amor.

À minha família e aos meus avós (*in memoriam*) José Garcia, Lair, Senhorinha e  
minhas avós Maria e Gena.

Ao Prof. Eduardo Alves, pela dedicação, oportunidades concedidas e pela  
confiança.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Deus, pelo conforto espiritual e por estar sempre do meu lado nos momentos de incertezas e angústia.

Aos meus pais, por sempre me incentivarem e abrirem mão de seus sonhos para a realização dos meus.

A minha irmã Bruna, por sempre estar ao meu lado e me dar força para sempre seguir em frente.

Ao Antonio, a Neneca e ao Fubá, pelo companheirismo, amor, paciência e incentivo.

A minha família, por todo apoio, confiança e dedicação.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade para a realização do Doutorado.

Ao Prof. Eduardo Alves, pela confiança, paciência, orientação e oportunidades concedidas.

À Dra Sandra Mathioni e Dra Nicole, pela coorientação, ensinamentos, dedicação e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduíche.

A todos aqueles professores e funcionários do DFP.

Aos amigos Silvino, Fabiano, Glauco, Leônidas, Melina, Rayssa, Josineide, Eliane, Maruzanete, Kátia, Larissa, Camila, Sandra, Ana, Brenda, Lívia, Manoel, Manu, Sueny, Gustavo, Iara, Rafa, Diogo, Iracema, Érica, Laís, Thiago, Terence, Khanh, Saritha e Bianca, pela paciência, apoio e amizade.

A Deila, Cláudia, Aline, Elisa, Sarah e Eloisa, pela amizade, colaboração, companheirismo e principalmente, paciência.

Aos meus grandes amigos de Viçosa, em especial, Jonas, Pati, Bruna, Carol, Carina, Renatinha, Wiler, Gabriel, Renata e Alberto pelo apoio, companheirismo e carinho.

Aos colegas do Laboratório Agronômica e amigos de Porto Alegre.

Aos estudantes e pesquisadores do DFP, colegas de departamento que compartilharam conhecimentos e ensinamentos.

*“Toda vez que pensar em desistir,  
lembre-se dos motivos que o fizeram chegar até aqui...”*

**Autor desconhecido**



## RESUMO GERAL

São escassos os estudos sobre diferentes sintomas de cercosporiose do cafeeiro: do tipo olho pardo (comum) (CC) e do tipo negra (CN), causados por *Cercospora coffeicola* em condições de campo. Objetivou-se, neste estudo, 1) caracterizar os isolados por estudos filogenéticos, avaliar a produção de cercosporina *in vitro*, agressividade e distribuição dos nutrientes nos tecidos foliares infectados pelos isolados; 2) avaliar a reprodutibilidade de lesões de CC e CN em casa de vegetação, por meio de estudos do processo infeccioso, utilizando microscopia eletrônica de varredura e PCR em tempo real; 3) investigar se as respostas de defesa bioquímicas do cafeeiro são semelhantes para CC e CN. O primeiro estudo foi realizado com oito isolados provenientes de diferentes regiões do Brasil, inoculados em duas cultivares de cafeeiro em casa de vegetação. Baseando-se na sequência de nucleotídeos dos genes fator de alongação e actina, observou-se que os isolados utilizados nos estudos filogenéticos agruparam-se em um único grupo similar à *C. coffeicola*. Observou-se diferença entre os isolados quanto ao período de incubação, área abaixo da curva da severidade da doença e produção da cercosporina *in vitro*, independente do tipo de lesão de cercosporiose. A distribuição dos nutrientes minerais no tecido assintomático e sintomático foi verificada em fragmentos de folhas por meio de microanálise de raios X. Houve gradiente de distribuição dos nutrientes: cálcio, potássio, magnésio e fósforo independente do tipo de lesão induzida pelos oito isolados. No segundo estudo, não houve diferença entre os dois isolados quanto à germinação, penetração, colonização e formação das lesões. Ambos os isolados induziram a expressão dos quatro genes do cafeeiro estudados, no entanto, o tempo da expressão variou entre eles dependendo do gene estudado e do gene controle utilizado como endógeno. Todas as lesões observadas em casa de vegetação foram de CC. No terceiro estudo, observou-se que os dois isolados ativaram as enzimas peroxidase, catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e fenilalanina amônia liase envolvidas no metabolismo antioxidante de folhas de cafeeiro de forma semelhante. Outras pesquisas devem ser realizadas para investigar as questões levantadas no presente estudo. Outros fatores, possivelmente, ambientais e nutricionais, ou mesmo alguma variabilidade genética entre os isolados podem estar envolvidos com a ocorrência dos diferentes sintomas observados.

Palavras-chave: Cercosporiose do tipo olho pardo (comum). Cercosporiose do tipo negra. *Coffea arabica* L.. Processo infeccioso. Metabolismo antioxidante. Cercosporina. Microanálise de raios X.

## GENERAL ABSTRACT

There are few studies on different symptoms of the “common” and the “black” brown eyespot (BE), in field conditions. Thus, the goals this study were 1) characterize strains by phylogenetic studies, to assess the cercosporin production in vitro, aggressiveness and distribution of nutrients in the leaves infected by strains; 2) to assess the reproducibility of lesion type of the “common BE” and the “black BE” disease in greenhouse conditions, through infection process using scanning electron microscopy and quantitative RT-PCR; 3) to investigate whether the biochemical defense response in coffee leaves is similarly induced by the common BE and the black BE. The first study, eight strains were collected from different regions of Brazil and were inoculated in two coffee cultivars under greenhouse conditions. Based on the nucleotide sequence of the elongation factor genes and actin, it was observed that the isolates used in phylogenetic studies grouped into one similar group to the *C. coffeicola*. It was observed that there was difference in the incubation period, area under the curve of disease severity and cercosporin production in vitro regardless of the lesion induced by strains. From these results, it can be suggested that there is difference in virulence between the strains. The distribution of mineral nutrients in the leaf tissue of symptomatic and asymptomatic coffee plants was accessed through X-ray microanalysis of leaf fragments. There was a nutrient distribution gradient for: calcium, potassium, magnesium and phosphorus independent of the type of lesion type induced each of the eight strains. In this second study, there was no difference between the two strains for germination, penetration, colonization, and lesion formation. Both strains were able to induce the expression of the four defense-related genes in coffee leaves; however there was variation in the timing of expression for each strain depending on the gene and on the endogenous control used in this study. All the lesions observed in the greenhouse were of the common BE type. In the third study, it was observed that activated the two strains peroxidase, catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and phenylalanine ammonia lyase involved in metabolism antioxidant similarly coffee leaves. Other research should be conducted to investigate the questions raised by these studies. Other factors possibly environmental and nutritional, or even some genetic variability among strains may be involved with the occurrence of different symptoms observed.

Keywords: Common brown eyespot. Black brown eyespot. *Coffea arabica* L.. Infection process. Antioxidant metabolism. Cercosporin. X-ray microanalysis.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1	<b>Importância da cultura</b> .....	15
2.2	<b>Doenças do cafeeiro</b> .....	15
2.3	<b>Cercosporiose do cafeeiro</b> .....	16
2.3.1	<b>Etiologia do fungo</b> .....	16
2.3.2	<b>Sintomatologia</b> .....	18
2.3.3	<b>Manejo da doença</b> .....	19
2.4	<b>Interação planta-patógeno</b> .....	20
2.4.1	<b>Mecanismos bioquímicos envolvidos na interação cafeeiro e <i>Cercospora coffeicola</i></b> .....	22
2.4.2	<b>Expressão de genes envolvidos nas respostas de defesa do cafeeiro</b> .....	25
2.4.3	<b>Genes relacionados à patogênese</b> .....	26
2.5	<b>Microanálise de raios X aplicada à sintomatologia de isolados de <i>Cercospora coffeicola</i></b> .....	28
2.6	<b>Caracterização dos isolados de <i>Cercospora</i> por meio de análises moleculares</b> .....	32
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	48
	<b>ARTIGO 1 Caracterização fisiológica e genética de isolados de <i>Cercospora coffeicola</i> provenientes de lesões de cercosporiose do tipo olho pardo e negra</b> .....	48
	<b>ARTIGO 2 Absence of greenhouse reproducibility of two distinct field lesions of cercospora leaf spot and the induction of defense responses in coffee leaves</b> .....	82
	<b>ARTIGO 3 Alterations on antioxidant metabolism in coffee leaves infected by <i>Cercospora coffeicola</i></b> .....	104

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de café, no entanto, vários fatores têm contribuído para reduzir a produtividade das lavouras cafeeiras, entre eles, as doenças de plantas. As duas doenças fúngicas do cafeeiro mais importantes são a ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br., e a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. Esta causa perdas de até 30% na produtividade e na qualidade da bebida (CARVALHO; CHALFOUN, 2001; LIMA; POZZA; SANTOS, 2012). Variações nos sintomas de cercosporiose podem ser observadas em condições de campo e gerar dúvidas na identificação correta do patógeno e manejo da doença. Os sintomas comuns da cercosporiose do tipo olho pardo são constituídos por pequenas manchas necróticas de coloração marrom arroxeada, com halo amarelado e com uma região central cinza claro (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; SOUZA et al., 2011). Já, os sintomas atípicos da doença, conhecidos como cercosporiose do tipo negra, são lesões irregulares bem escuras, quase negras, e maiores do que as lesões comuns (NELSON, 2008).

A disponibilidade de informações sobre o processo infeccioso de *Cercospora coffeicola* ainda é escassa, principalmente, no que se refere a isolados que causam diferentes tipos de lesões. Souza et al. (2011) e Souza, Maffia e Mizubuti (2012) estudaram o processo infeccioso e a variabilidade de isolados de *C. coffeicola* na cultivar Catuaí e Catucaí, porém detalhes da diferença de sintomas entre os mesmos não eram o escopo do trabalho. Os conídios do gênero *Cercospora* exibem variação no modo de germinação, penetração e esporulação em diferentes hospedeiros. A maioria penetra por meio

dos estômatos e não produzem apressórios (GUPTA et al., 1995; BABU et al., 2009).

As respostas de defesa do cafeeiro ao fungo *Hemileia vastatrix* já se encontram mais avançadas e permitiram a identificação de genes diferencialmente expressos durante essa interação (FERNANDEZ et al., 2004; RAMIRO et al., 2009). No caso da cercosporiose, há relatos na literatura que demonstram a expressão de proteínas relacionadas à patogênese em soja à *C. kikuchii* e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (UPCHURCH; RAMIREZ, 2010). Para a cercosporiose do cafeeiro, não se sabe se a planta responde de uma maneira diferente a isolados de *C. coffeicola* causando dois distintos sintomas de cercosporiose: comum e negra.

O gênero *Cercospora* produz a toxina cercosporina (DAUB; CHUNG, 2009), que é ativada na presença de luz e causa danos à membrana celular do hospedeiro, promovendo a peroxidação de lipídeos, perda de eletrólitos e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SHARMA et al., 2012; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2013). Com o objetivo de minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo e remover o excesso de ERO, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos (SCANDALIOS, 2005). Dentre os enzimáticos, destacam-se as enzimas peroxidases (POX), catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) e glutathione peroxidase (GPX) (SHARMA et al., 2012; CHOUDHURY et al., 2013). Outra importante enzima envolvida na defesa das plantas é a fenilalanina amônia liase (PAL). E da mesma forma, não se sabe se os mecanismos de defesa são ativados quando a planta de cafeeiro é infectada com isolados que causam dois distintos sintomas de cercosporiose.

Na literatura, há relatos de variabilidade na agressividade dos isolados em populações de *C. coffeicola* dentro de campos de cultivo, independente da

região geográfica e condições de cultivo (MARTINS; MAFFIA; MIZUBUTI, 2008). Esse estudo foi informativo numa visão geral da população do patógeno, no entanto, são necessárias informações mais detalhadas sobre vários aspectos que podem originar variabilidade no patógeno e, assim, que possam estar influenciando a ocorrência de novos sintomas de cercosporiose em cafeeiros. Alguns estudos correlacionaram a produção da toxina cercosporina com a agressividade de isolados como um dos indicativos da variabilidade de isolados a diferentes condições nutricionais e ambientais (OKORI et al., 2004; CHOQUER et al., 2005; SOUZA; MAFFIA; MIZUBUTI, 2012). A correlação da agressividade com a produção da cercosporina e o modo de ação desta no hospedeiro foi comprovada pelo estudo de mutantes (CALLAHAN et al., 1999; CHOQUER et al., 2005; CHEN; LEE; CHUNG, 2007). Entretanto, não existem relatos de genes envolvidos com a produção de cercosporina em *C. coffeicola*, embora já se conheça que a severidade da cercosporiose do cafeeiro e a agressividade dos isolados estão correlacionadas com a intensidade de luz (SOUZA; MAFFIA; MIZUBUTI, 2012) e com as condições nutricionais do hospedeiro (POZZA et al., 2001; GARCIA JÚNIOR et al., 2003).

Enfim, sem conhecimento etiológico correto da doença para medidas de manejo bem definidas, produtores e pesquisadores ainda estão apoiados em especulações que existem somente na literatura sobre a ocorrência desses dois distintos sintomas de cercosporiose do tipo olho pardo e do tipo negra. Visando a compreender os fatores envolvidos com esses novos sintomas, os objetivos foram: caracterizar os isolados por estudos filogenéticos, avaliar a produção de cercosporina *in vitro*, agressividade e distribuição dos nutrientes nos tecidos foliares infectados pelos isolados; avaliar a reprodutibilidade de lesões de cercosporiose do tipo olho pardo e cercosporiose do tipo negra em casa de vegetação, por meio do estudo do processo infeccioso e as respostas de defesa da planta, utilizando, respectivamente, microscopia eletrônica de varredura e PCR

em tempo real; investigar se os mecanismos bioquímicos das respostas de defesa do cafeeiro são semelhantes para os isolados que causam esses dois tipos de lesão foliar.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da cultura

O cafeeiro (*Coffea* sp.), pertencente à família Rubiaceae, é amplamente cultivado em países tropicais. É uma das culturas mais tradicionais no Brasil, o qual se destaca como o maior produtor mundial. Entre as espécies de cafeeiro cultivadas, *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex. A. Froehner são as mais importantes economicamente, sendo que a espécie arábica na safra 2014/2015 produziu 33,1 milhões de sacas (ABRAHAO, 2010; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, USDA, 2014).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, Conab (2014), o cultivo do cafeeiro estende-se, principalmente, na região Sudeste onde estão os três principais estados produtores: Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. Sendo que, em Minas Gerais, está concentrada a maior área 1.238.270 hectares, predominando a espécie arábica com 98,87% no estado. E a área total estadual representa 54,25% da área cultivada com café no país.

### 2.2 Doenças do cafeeiro

Diversos fatores podem afetar a produtividade do cafeeiro, causando perdas significativas, como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais, pragas e doenças (OESTREICH-JANZEN, 2010). Dentre as principais doenças do cafeeiro, destacam-se a ferrugem alaranjada, causada por *Hemileia vastatrix* Berk. & Br; a cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke; a antracnose dos frutos, causada por *Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge, considerada praga quarentenária ausente (A1) no Brasil; a meloidoginose causada por *Meloidogyne* spp.; mancha-de-Phoma,



causada por *Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen, a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* Young, Dye & Wilkie (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005; PATRÍCIO et al., 2008).

### **2.3 Cercosporiose do cafeeiro**

A cercosporiose do cafeeiro, conhecida como mancha-de-olho pardo, mancha-circular, olho-de-pomba ou olho-pardo, é causada pelo fungo necrotrófico *Cercospora coffeicola* e é umas das doenças mais antigas e importantes do cafeeiro. A doença apresenta ocorrência endêmica, estando presente em todas as regiões cafeeiras do Brasil e do mundo (CARVALHO; CHALFOUN, 1997; GARCIA JÚNIOR et al., 2003). O fungo foi descrito em 1881, (COOKE, 1881), associado a folhas de cafeeiros oriundas da Jamaica. No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez em 1887 (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997). Entretanto, o fungo só foi responsável por causar grandes prejuízos a partir de 1971, nas regiões altas do Espírito Santo e Minas Gerais. Sob condições amenas de temperatura e alta umidade, as perdas na produção podem chegar até 30% (CARVALHO; CHALFOUN, 2001).

#### **2.3.1 Etiologia do fungo**

*Cercospora coffeicola* pertence à família Dematiaceae, classe dos Hyphomycetes, ordem Moniliales. Crous e Braun (2003) relataram a existência de fase sexual do patógeno, a qual corresponderia a *Mycosphaerella coffeicola*. No entanto, Martins, Maffia e Mizubuti (2008) relataram que não há trabalhos conclusivos que relacionam as duas espécies. O fungo forma conidióforos e conídios no centro das lesões em ambas as faces das folhas (ZAMBOLIM et al., 1997; MARTINS; MAFFIA; MIZUBUTI, 2008). Os conidióforos são

cilíndricos, septados e de coloração hialina a marrom, em conformação de esporodóquios. Na extremidade dos conidióforos formam-se os conídios que são hialinos e multisseptados, de extremidade afilada, com 100-270  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3-4  $\mu\text{m}$  de diâmetro (CHUPP, 1953).

O fungo pode sobreviver nas sementes e em folhas destacadas e permanecer viável por nove meses na superfície foliar, até que condições favoráveis à doença ocorram (GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997; CUSTÓDIO et al., 2011).

Temperaturas amenas entre 10 e 25°C e alta umidade relativa do ar favorecem a esporulação que ocorre comumente à noite ou em dias nublados e frios (ZAMBOLIM et al., 1997). Os conídios são dispersos pelo vento, água e insetos e, uma vez depositados nas folhas e na presença de alta umidade, serão emitidos tubos germinativos que penetram pelos estômatos e colonizam os espaços inter e intracelulares (ZAMBOLIM et al., 1997).

Em meio de cultura, a cor do micélio irá depender das condições de luminosidade, na presença desta, pode haver produção da toxina cercosporina, de cor vermelha. Em plantas infectadas, ocorre a formação dessa toxina durante o desenvolvimento da doença, sendo necessário para a ocorrência dos sintomas (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005). A cercosporina é incluída no grupo químico das perilenequinonas, o qual inclui compostos sintéticos e naturais de moléculas fotossensibilizadoras (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). Na presença de luz, a cercosporina torna-se excitada e é capaz de reagir com outras moléculas dentro da célula vegetal, sendo o oxigênio o principal alvo de reação. Esse, ao reagir com a cercosporina promove a formação de espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que são altamente tóxicos, podendo interagir e danificar o DNA, proteínas e membranas, provocando a morte da célula (DAUB; CHUNG, 2007). Daub, Herrero e Chung (2005) verificaram que a cercosporina provoca morte das células do hospedeiro, permitindo que o fungo

tenha acesso aos nutrientes nos espaços intercelulares, por meio da peroxidação dos lipídeos da membrana celular.

### 2.3.2 Sintomatologia

Os sintomas comuns da cercosporiose do tipo olho pardo são observados nas folhas, as quais apresentam pequenas manchas de cor marrom escura, apresentando no centro uma lesão cinza claro, com anel arroxeadado ou amarelado em volta, com aspecto de um halo (Figura 1A). Os sintomas nas folhas levam a uma redução na fotossíntese, causando desfolha e, conseqüentemente, diminuição na produtividade. Também ocorrem sintomas nos frutos, levando a depreciação da qualidade da bebida, em razão da seca dos frutos (GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997; SOUZA et al., 2011; LIMA; POZZA; SANTOS, 2012).

Tem sido hipotetizado que a ocorrência de novos sintomas nas plantas de cafeeiro seja decorrente das variações genéticas no patógeno ou a alterações ambientais como maiores altitudes (NELSON, 2008). Esse mesmo autor verificou sintomas nas folhas diferentes dos descritos anteriormente. As folhas apresentavam lesões irregulares bem escuras, quase negras (Figura 1B). A princípio, desconfiou-se tratar de uma raça de *C. coffeicola*, porém, foram realizados isolamentos de *Cercospora* de folhas de cafeeiro e verificou-se que havia colônias de diferentes colorações, umas escuras e a maioria de cor roxa. No entanto, todo o isolamento proveniente de lesões escuras convencionou-se chamar de cercosporiose do tipo negra. Especulações na literatura, por meio de observações no campo, relatam que as condições na qual prevaleciam os sintomas de cercosporiose do tipo negra poderiam estar a folhas que estavam amareladas pela ocorrência de deficiência de fósforo (MATIELLO; ALMEIDA, 2013). Logo, o fungo poderia ter maior facilidade de infecção das folhas, uma

vez que as lesões de cercosporiose do tipo negra tem tamanho maior que as lesões típicas. Caso a manifestação de diferentes sintomas no campo seja ocasionada por alterações genéticas no patógeno, será um indício de que o patógeno poderá se tornar ainda mais virulento e os danos causados poderão ser ainda maiores. Esses desafios destacam a necessidade de estudos direcionados ao conhecimento do processo de patogênese de *C. coffeicola* e das respostas de defesa do cafeeiro ao nível bioquímico e molecular durante a interação.

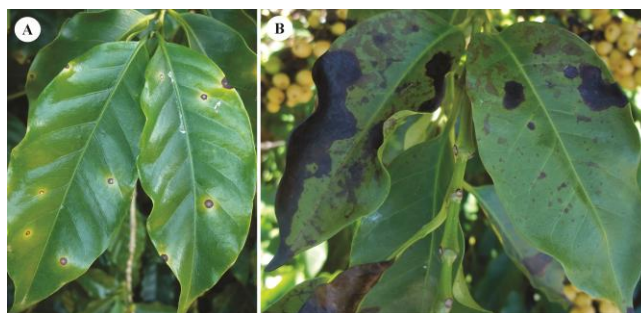


Figura 1 Sintomas de cercosporiose observados em folhas de cafeeiro em condições de campo. A) Cercosporiose do tipo olho pardo (comum): pequenas manchas marrons com presença de halo amarelado; B) Cercosporiose do tipo negra: lesões irregulares escuras quase negras e ausência do halo amarelado

### 2.3.3 Manejo da doença

O principal método de controle da doença é o químico, no qual se utiliza fungicidas protetores e sistêmicos, no entanto, o manejo da nutrição mineral, por meio da adubação correta e equilibrada pode também reduzir a intensidade da doença (POZZA et al., 2004; MARSCHNER, 2012; SOUZA; MAFFIA; MIZUBUTI, 2012).

A utilização indiscriminada de fungicidas tem causado danos ao meio ambiente e seres vivos (AMARAL et al., 2008; ABRAHÃO et al., 2009). Assim, um dos maiores desafios para os pesquisadores tem sido determinar métodos

eficientes de controle, que apresentam baixo impacto ambiental. A utilização de cultivares com resistência a patógenos é uma alternativa bastante promissora, porém, apesar de algumas cultivares apresentarem menor suscetibilidade, ainda não existem cultivares de cafeeiros resistentes a cercosporiose (PATRÍCIO; BRAGHINI; FAZUOLI, 2010; DELL'ACQUA et al., 2011). Além disso, a utilização intensiva de fungicidas pode levar à seleção de raças resistentes de patógenos e, conseqüentemente, à quebra da resistência genética de hospedeiros (SILVA et al., 2010). Portanto, outras medidas de manejo da doença podem ser utilizadas, tais como escolher o local de plantio, evitando regiões elevadas e de grande ocorrência de chuvas, adequado espaçamento de plantio e não realizar o plantio de cafeeiro com outras espécies do gênero *Coffea* (NELSON, 2008).

#### **2.4 Interação planta-patógeno**

Em cafeeiro, o fungo *C. coffeicola* utiliza uma estratégia de colonização necrotrófica, invadindo as células, matando-as e nutrindo-se das mesmas. O processo inicia-se com a germinação bipolar do conídio na parte abaxial da folha, formando um tubo germinativo, o qual não se diferenciara em apressório (SOUZA et al., 2011). O tubo germinativo direciona-se para a abertura estomática ou ferimentos, por onde irá penetrar na epiderme. Segundo Souza et al. (2011), não há evidências da penetração direta, porém, em trabalhos realizados por Castaño (1956), a penetração também pode ocorrer de forma direta em folhas jovens, mas não nas folhas velhas. *Cercospora coffeicola* coloniza a câmara subestomática e invade os tecidos adjacentes de forma inter e intracelular (SOUZA et al., 2011). Os sintomas começam a desenvolver-se na superfície abaxial das folhas com aspecto de várias manchas castanhas circundadas por halos amarelados. Com a evolução dos sintomas, as manchas tornam-se necróticas. A lesão, normalmente, apresenta um centro branco com

um anel marrom no centro circundado por um halo amarelo. As lesões de cercosporiose do tipo comum diferenciam-se do tipo negra na qual as folhas infectadas apresentam lesões irregulares bem escuras, quase negras (NELSON, 2008; MATIELLO; ALMEIDA, 2013). O fungo produz a toxina cercosporina que, ao ser ativada pela luz, reage com oxigênio dentro da célula e gera as espécies reativas de oxigênio que têm as membranas como alvo de atuação, ocasionando a peroxidação de lipídeos e redução na integridade das membranas, perda de conteúdo citoplasmático e, conseqüentemente, morte celular (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). O rompimento das membranas celulares do hospedeiro pela ação da toxina fornece, provavelmente, os nutrientes para o crescimento e esporulação do patógeno (KUYKENDALL; UPCHURCH, 2004). Os conidióforos emergem da superfície abaxial da folha, isoladamente ou em grupos (fascículos), por meio ou em torno dos estômatos.

Na interação planta-patógeno, a maioria dos eventos está envolvida com o estabelecimento das relações parasíticas ou com a resistência da planta hospedeira que ocorrem a nível celular, bioquímico e molecular (JONES; DANG, 2006). Dessa forma, essa interação tem sido observada por meio de estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares. Para a visualização dos processos de infecção que ocorrem em nível celular, são utilizados os Microscópios de Luz (ML), Microscópios Laser Confocal (MLC), Microscópios Eletrônicos de Varredura (MEV) e Transmissão (MET). Bonde, Melching e Bromfiel (1976) e Koch, Ebrahin-Nesbat e Hoppe (1983) utilizaram a ML, MEV e MET, respectivamente, para estudar o desenvolvimento de *Pachopsora pachyrhizi* em cultivares de soja suscetíveis e descreveram os vários eventos que ocorrem nessa interação.

Para o patossistema *C. coffeicola* – cafeeiro, esses estudos permitirão identificar se há diferença no processo de patogênese dos isolados que causam diferentes sintomas nas plantas de cafeeiro.

### 2.4.1 Mecanismos bioquímicos envolvidos na interação cafeeiro e *Cercospora coffeicola*

A compreensão dos processos de sinalização das respostas de defesa é complexa e pode distinguir vários estímulos ambientais, a partir da resistência basal a diferentes patógenos, bem como a resistência a patógenos específicos e, até mesmo, variações genéticas dentro da população de patógenos (CHEN; LYNGKJ; COLLINGE, 2013).

As plantas sob condições de estresse, como o ataque de patógenos, induzem a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) (MAGBANUA et al., 2007). As ERO apresentam importante papel na interação planta patógeno (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2013). No metabolismo normal das plantas, ocorre a produção de ERO, porém em condições de estresse ocorre um desequilíbrio entre a produção e a eliminação das mesmas (MITTLER, 2002; NEILL et al., 2002). Alguns fungos necrotróficos, como os do gênero *Cercospora* (fungos que matam a célula do hospedeiro depois de colonizar) produzem toxinas denominadas de cercosporina que, na presença da luz, causam danos à membrana celular do hospedeiro, promovendo a peroxidação de lipídeos, perda de eletrólitos e formação de ERO, sendo que as principais geradas são: o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) (DAUB; HANGARTER, 1983; SHARMA et al., 2012; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2013). A cercosporina tem se mostrado muito tóxica a vários tipos de organismos, incluindo bactérias, fungos e animais (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005). E alguns patógenos necrotróficos podem se sobressair nesse ambiente rico em ERO, explorando os mecanismos de defesa do hospedeiro para sua patogenicidade (THINES et al., 2006).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é uma ERO envolvida em diversas funções dentro da célula, tais como atuação direta no patógeno e no hospedeiro,

sinalização das respostas de defesa, formação de ligações cruzadas entre proteínas e carboidratos na parede celular, as quais torna a planta resistente à degradação por enzimas líticas e toxinas não seletivas produzidas pelo patógeno (MEHDY et al., 1996). Esse processo de estresse oxidativo causa peroxidação de lipídeos nas membranas celulares e danos a pigmentos, proteínas e ácidos nucleicos (APEL; HIRT, 2004). O  $H_2O_2$  pode estar envolvido na supressão do crescimento de patógenos biotróficos. Enquanto que, para patógenos necrotróficos como *Cercospora*, esses fungos podem ignorar a presença desse radical ou podem requerê-lo para o processo infeccioso, sugerindo outros papéis desse radical na defesa do fungo, tais como a sinalização (OROZCO-CARDENAS; NARVAEZ-VASQUEZ; RYAN, 2001; NIKRAFTAR et al., 2013).

Com o objetivo de minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo e remover o excesso de ERO, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa não enzimáticos e enzimáticos (SCANDALIOS, 2005). O sistema antioxidante não enzimático envolve os compostos fenólicos, a glutatona, o ascorbato, os tocoferóis, os alcaloides, os carotenoides e os flavonoides, (APEL; HIRT, 2004). Enquanto que o sistema enzimático é formado pelas enzimas peroxidase (POX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona-S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPX) (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002; MITTLER, 2002; SHARMA et al., 2012; CHOUDHURY et al., 2013). Vários trabalhos têm relatado o aumento da atividade desse sistema de defesa antioxidante das plantas em resposta a estresses induzidos por agentes bióticos e abióticos (SHARMA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014). A SOD representa a primeira linha de defesa das plantas, essa enzima promove a dismutação do radical  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , o qual é, posteriormente, detoxificado pelas enzimas POX, CAT, APX, GPX e GR. A APX na reação de catalisação utiliza o ascorbato como agente redutor, gerando



H<sub>2</sub>O e aldeído malônico (MDA) (APEL; HIRT, 2004; CHOUDHURY et al., 2013). A CAT catalisa a dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>(WILLIAMSON; SCANDALIOS, 1992).

As peroxidases (POX) estão relacionadas com o processo de proteção antioxidativa, o qual catalisa a oxidação de componentes celulares como o peróxido de hidrogênio, além de promover o aumento na síntese de lignina que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos. Também participam da suberização do tecido, catabolismo de auxina e regulação da senescência (KVARATSKHELIA; WINKEL; THORNELEY, 1997; HIRAGA et al., 2001).

A fenilalanina amônia liase (PAL) catalisa a reação de desaminação de *L*-fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico, a qual é a primeira etapa envolvida na rota dos fenilpropanoides que é de grande importância para a produção de compostos fenólicos, ácido salicílico e derivados de lignina com potencial antimicrobiano, além de algumas fitoalexinas (SCHUSTER; RETEY, 1995; TSUGE et al., 2004; BORGES et al., 2012).

Os estudos existentes relacionando patógenos fúngicos com ERO envolvem, em sua maioria, fungos do gênero *Colletotrichum*, *Pyricularia*, *Hemileia* e *Alternaria* e, recentemente, espécies diferentes do gênero *Cercospora sojina*, (SILVA et al., 2008; DEBONA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014; POLANCO et al., 2014; TAHERI et al., 2014).

Não há estudos na literatura que relatam a atividade de enzimas antioxidantes durante a resistência basal do cafeeiro à *Cercospora coffeicola* e considera-se a importância dessa interação para observar se há diferenças nas respostas de defesa do cafeeiro a isolados que causam diferentes sintomas de cercosporiose.

#### 2.4.2 Expressão de genes envolvidos nas respostas de defesa do cafeeiro

A análise da expressão gênica é fundamental para o estudo das rotas metabólicas de sinalização, as quais são envolvidas com processos celulares de desenvolvimento. Genes supostamente envolvidos em rotas de sinalização dos fenilpropanóides e respostas de defesa do cafeeiro à *Hemileia vastatrix* já foram identificados: *CaWRKY1* (proteínas *WRKY* são um grupo de fatores de transcrição que atuam como reguladores na defesa basal e na resistência sistêmica adquirida), *CaGT* (codificam uma glicosiltransferase envolvida na síntese de ácido salicílico), *CaPR1b* (é considerado um marcador molecular do ácido salicílico), *CaPR1e* e *CaPR10* (proteínas relacionadas com a patogênese), *Ca13-LOX* (lipoxigenase, também envolvido na biossíntese do jasmonato), *CaPAL* (fenilalanina amônia-liase, enzima precursora da rota dos fenilpropanóides), *CaCHS* (chalcona sintase, envolvida na biossíntese de flavonóides), *CaPOD* (peroxidase), *CaRLK* (codifica um receptor de quinases), proteínas TIR-NBS-LRR, dentre outras (FERNANDEZ et al., 2004; GUZZO; HARAKAVA; TSAI, 2009; RAMIRO et al., 2009; DINIZ et al., 2012).

Estudos realizados por Guzzo, Harakava e Tsai (2009) verificaram a expressão de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida em cafeeiro por meio da qRT-PCR, sugerindo que esses genes poderão ser úteis como marcadores genéticos em programas de melhoramento e que genes envolvidos nas respostas de defesa em outras espécies de plantas também foram encontrados em plantas de cafeeiro.

Embora vários métodos sejam utilizados para quantificar a expressão gênica, a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é considerada uma técnica padrão pela sua sensibilidade e especificidade (BUSTIN et al., 2005). A PCR quantitativa em tempo real constitui-se de uma tecnologia avançada da era da genômica e vários fatores têm contribuído para a transformação desta numa

principal ferramenta de pesquisa. Dentre esses, possibilitar ensaios homogêneos, evitando a necessidade de processamento pós-PCR, e permitindo a comparação direta entre RNAs que diferem, amplamente, em sua abundância, além de ser uma técnica quantitativa (GINZINGER, 2002).

A análise da expressão gênica, por meio da qRT-PCR pode consistir em uma ferramenta molecular útil para o estudo de possíveis marcadores genéticos do cafeeiro em resposta à *Cercospora coffeicola*.

### **2.4.3 Genes relacionados à patogênese**

Existem determinados genes nos fungos que codificam para proteínas que conferem patogenicidade, por meio de uma sequência completa de eventos que ocorrem durante a infecção, incluindo aqueles que são requeridos para a formação de apressório, penetração direta na planta hospedeira e produção de toxinas (IDNURM; HOWLETT, 2001; KAHMANN; BASSE, 2001).

Várias modificações morfológicas e fisiológicas ocorrem no patógeno durante a interação com o hospedeiro e resultam de um complexo mecanismo de regulação gênica (LIANG; PARDEE, 1992). Há relatos na literatura da ocorrência de genes específicos para cada tipo de interação e também a presença de genes conservados entre interações patogênicas e simbióticas (GÜMIL et al., 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Dessa forma, a patogenicidade de um fungo é controlada por diversos genes, sendo que alguns deles podem exercer papel essencial na interação com a planta hospedeira. A ausência de um determinado gene na planta pode implicar na incapacidade do fungo reconhecer, penetrar ou colonizar o hospedeiro e resultar em isolados não patogênicos ou avirulentos.

O gênero *Cercospora* apresenta genes que estão envolvidos na determinação da patogenicidade e formação de lesões em plantas de tabaco e

que foram caracterizados por meio da deleção (CHOQUER et al., 2005; 2007; DEKKERS et al., 2007). Entre esses genes, estão aqueles envolvidos na produção da toxina cercosporina a qual é afetada por fatores fisiológicos e genéticos, sendo a luz fator fundamental para a produção dessa toxina (YOU; LEE; CHUNG, 2008). A capacidade de produção da cercosporina, bem como a virulência e taxa de crescimento apresentaram variação entre os isolados de *Cercospora piaropi* Tharp (TESSMANN; CHARUDATTAN; PRESTON, 2008). Estudos têm sido realizados para elucidar os mecanismos envolvidos na acumulação e no modo de ação da toxina. A biossíntese da cercosporina via acetato tem sido demonstrada em muitos trabalhos utilizando o  $^{14}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$  (THINES et al., 2006).

Em algumas espécies, mutantes deficientes na produção e autorresistência à cercosporina têm sido investigados por meio da deleção sítio dirigida de genes (CHUNG et al., 2003). Esses genes incluem: *CFP* (*cercosporin facilitator protein*, que codifica um transportador *MFS*, denominado *major facilitator-like protein gene*) requerido para o transporte da toxina para fora do micélio (CALLAHAN et al., 1999) em *Cercospora kikuchii* T. Matsumoto & Tomoy e *Cercospora nicotianae* Ellis & Everh. (UPCHURCH et al., 2005). A produção pelo fungo de um policetídeo sintase *CTB1* e *CTB3* (codifica para uma *O-methyltransferase* e *FAD-dependent monooxygenase*) são requeridos para a biossíntese da cercosporina que foram identificados e caracterizados em *C. nicotianae* (CHOQUER et al., 2005; DEKKERS et al., 2007) e também o gene *ATR1* que codifica para um transportador *ABC* em *C. nicotianae* (AMNUAYKANJANASIN; DAUB, 2009).

Chen, Lee e Chung (2007) descobriram a existência de outros seis genes: *CTB2*, *CTB4*, *CTB5*, *CTB6*, *CTB7* e *CTB8* que codificam polipeptídeos que, provavelmente, também estão envolvidos na biossíntese da cercosporina. Trabalhos realizados por Keller, Turner e Bennett (2005) verificaram que os

genes que codificam para a biossíntese da cercosporina estão num único cluster denominado de *CTB*. A função dos genes *CTB5*, *CTB6* e *CTB7* as quais codificam proteínas similares a FAD/FMN- ou NADPH dependente de oxirredutases e desidrogenases ainda deve ser elucidada (CHEN; LEE; CHUNG, 2007). A deleção sítio dirigida dos genes *CTB3*, *CTB5*, *CTB6* e *CTB7* afetou a produção de cercosporina nos isolados mutantes, os quais apresentaram menor número de lesões em plantas de fumo inoculadas com *C. nicotianae* quando comparadas com o isolado selvagem, confirmando a hipótese de que a cercosporina está envolvida com a virulência do fungo (CHEN; LEE; CHUNG, 2007; DEKKERS et al., 2007).

Embora Souza; Maffia e Mizubuti (2012) verificassem correlação entre a produção de cercosporina e a virulência de diferentes isolados de *C. coffeicola* infectando folhas de cafeeiros, não há estudos sobre os genes envolvidos na biossíntese da cercosporina para essa espécie fúngica. Assim, ressalta-se a importância do estudo da virulência entre os isolados, identificação e caracterização de genes envolvidos na biossíntese de cercosporina em *C. coffeicola* durante a interação com o cafeeiro.

## **2.5 Microanálise de raios X aplicada à sintomatologia de isolados de *Cercospora coffeicola***

A microanálise de raios X (MAX) é uma técnica que analisa os elementos químicos ao microscópico. O sistema pode ser aplicado na superfície de amostras não tratadas, fornecendo assim, a determinação da distribuição e quantificação dos elementos em vários materiais (MCCULLY et al., 2010; CHEN et al., 2014).

A técnica consiste no bombardeamento de feixes de elétrons na amostra e os raios X emitidos possibilita a identificação dos elementos. Há dois tipos de

detectores que podem realizar a medida do comprimento de onda ou dos raios X, sendo denominados, respectivamente, de Espectroscopia por Comprimento de onda – WDS e Espectroscopia por Energia Dispersiva – EDS, sendo este o mais utilizado (ECHLIN, 2001; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). A técnica de EDS utiliza a energia de um fóton que está relacionado com a energia eletromagnética, o processo é rápido e os comprimentos de onda são analisados de forma simultânea (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Essa técnica também permite a obtenção de um mapa, contendo os elementos encontrados na superfície da região analisada (BELAN et al., 2015). A relevância da técnica para a Fitopatologia é que, junto com a microscopia eletrônica de varredura, possibilita a observação da morfologia detalhada de células e tecidos infectados ou não por patógenos (BELAN, 2014).

A microanálise também possibilita a identificação e quantificação de diferentes elementos químicos encontrados em diferentes amostras de origem celular, subcelular e fisiológica (FREY, 2007). Diante disso, pode-se compreender a interação de diferentes elementos químicos com o progresso da doença causado por diferentes patógenos.

A composição mineral dos tecidos vegetais é influenciada por diversos fatores: espécie, variedade, estágio vegetativo, idade da planta, variações climáticas, disponibilidade de água e nutrientes no solo, estado fitossanitário da planta, tipo e manejo de solo e interações entre os nutrientes. Assim, a avaliação do estado nutricional da planta é fundamental para garantir o equilíbrio fisiológico e fitossanitário (INGESTAD; AGREN, 1995; MARTINEZ et al., 2003; POZZA; POZZA, 2012; MARSCHNER, 2012; TAIZ; ZIEGER, 2013). Os nutrientes minerais são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e microrganismos e contribuem também na interação planta patógeno, podendo afetar positivamente ou negativamente a resposta da planta a

doença (SPANN; SCHUMANN, 2013). No entanto, a interação entre os nutrientes e patógenos ainda não estão bem elucidadas.

Segundo Spann e Schumann (2013) patógenos podem imobilizar nutrientes em tecidos infectados ou no solo além de interferir na translocação e disponibilidade de nutrientes, induzindo deficiências, toxicidades e suscetibilidade nas plantas à infecção. Alguns estudos já relataram a influência dos nutrientes em vários patossistemas (POZZA et al. 2001; GARCIA JÚNIOR et al. 2003; POZZA et al. 2004; LIMA et al. 2010).

Blanchette (1984) iniciou as pesquisas demonstrando a interação do elemento mineral manganês com fungos causadores de podridão em madeiras utilizando a técnica de MAX, verificou que esse elemento pode regular a penetração do fungo na parede celular da planta. Em um estudo semelhante, Belan et al. (2015) verificaram a influência de nutrientes, principalmente, cálcio e potássio em folhas de cafeeiro infectadas com diferentes patógenos utilizando a MAX e concluíram que a técnica foi eficiente para compreender as relações patógeno e hospedeiro e, conseqüentemente, auxiliar no manejo das doenças.

Com relação ao patossistema cafeeiro e *C. coffeicola*, a técnica de MAX só havia sido utilizada para observar o mapeamento do silício na superfície das folhas correlacionando-o com a redução dos sintomas de cercosporiose (POZZA et al., 2004). Entretanto, os autores não analisaram a localização desse elemento nos tecidos infectados e nem quais nutrientes poderiam estar envolvidos na diferença de sintomas ocasionada por diferentes isolados provenientes do campo.

Da mesma forma, Cruz et al. (2014) estudaram o efeito do silício na resistência do feijoeiro à infecção por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Bri. & Cav. Utilizando a análise morfológica em MEV, combinada ao mapeamento dos elementos químicos presentes na superfície das folhas de feijoeiro, os autores demonstraram acúmulo de silício, potássio e enxofre nas

folhas supridas com silício, reduzindo os sintomas de antracnose nas nervuras das plantas.

MAX também pode ser utilizada para detectar os mecanismos de ataque de patógenos às plantas, tais como os fatores de virulência produzidos pelos mesmos. Rio et al. (2008) observaram que o fungo *Moniliophthora perniciosa* Stahel produz cristais de oxalato de cálcio e que, com o auxílio da MAX, foi possível determinar a composição do cristal e isso poderia auxiliar no manejo da doença, ou seja, plantas transgênicas expressando a enzima oxalato descarboxilase.

O conhecimento sobre diferentes sintomas causados por diferentes isolados provenientes do campo necessita de mais informações, principalmente, no que se refere à dinâmica dos nutrientes em diferentes cultivares suscetíveis à *C. coffeicola*. De acordo com Pozza et al. (2001) e Souza et al. (2012) a cercosporiose é influenciada por altos teores de potássio combinados com baixos teores de nitrogênio, fósforo e cálcio. E sabe-se que há especulações na literatura de que a ocorrência de diferentes sintomas pode estar associada a plantas cultivadas em regiões de altas altitudes e apresentando deficiência nutricional, principalmente, de nitrogênio e fósforo (NELSON, 2008; MATIELLO; ALMEIDA, 2013). Assim, a compreensão da influência dos nutrientes minerais na interação cafeeiro e *C. coffeicola* poderá auxiliar na elaboração de adequadas estratégias de manejo para esse patossistema, além de elucidar diferenças observadas nos sintomas causados por esses isolados.



## 2.6 Caracterização dos isolados de *Cercospora* por meio de análises moleculares

A identificação e caracterização de espécies fúngicas são de grande importância para a diagnose de doenças em plantas e para o conhecimento aprofundado de um determinado patógeno.

O gênero *Cercospora* tem sido amplamente caracterizado dependendo da associação com o hospedeiro, ou seja, as espécies de *Cercospora* foram descritas como novas quando encontradas em diferentes hospedeiros (CHUPP, 1954; ELLIS, 1971). Vários táxons incluindo *Cercospora apii* Fresen., *Cercospora beticola* Sacc., *Cercospora canescens* Ellis & G. Martin e *Cercospora zebrina* Pass. ocorrem em famílias de plantas que ainda não foram relatadas na literatura e que apresentam uma ampla gama de hospedeiros (CROUS; BRAUN, 2003; LARTEY; CAESAR-TONTHAT; CAESAR, 2005; BAKHSHI; ARZANLOU; BABAI-AHARI, 2012; GROENEWALD et al., 2013).

Tradicionalmente, os caracteres morfológicos tais como tamanho e forma de conídios, conidióforos, presença ou ausência de micélio externo são amplamente utilizados na taxonomia do gênero *Cercospora* (CHUPP, 1954; BAKHSHI et al., 2015). Entretanto, o tamanho do conídio é bem similar em várias espécies dentro desse gênero (WELLES, 1933). Em estudos realizados por Crous e Braun (2003), foram identificadas 659 espécies pertencentes ao gênero *Cercospora*, sendo que 281 não foram reconhecidos com base em características morfológicas e sintomas. Portanto, foram desenvolvidas ferramentas moleculares para identificação e caracterização de espécies fúngicas baseadas em relações filogenéticas e variações de táxons (HIBBETT et al., 2007). Análises filogenéticas de vários genes, isto é, espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer*) (ITS), fator de alongação (EF1-alfa),  $\beta$ -tubulina,

actina, calmodulina e histona constituem marcadores moleculares para a identificação de espécies de *Cercospora* (GROENEWALD; GROENEWALD; CROUS, 2005; BAKHSHI et al., 2015). As regiões ITS são conservadas no DNA que auxiliam no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies (CHEN et al., 2004). De acordo com Goodwin, Dunkle e Zismann (2001), isolados de *Cercospora* que diferem por dois ou mais nucleotídeos podem ser consideradas espécies distintas, utilizando sequências das regiões ITS. Groenewald, Groenewald e Crous (2005) verificaram que as sequências do gene da região da calmodulina foram os mais relevantes para diferenciar espécies de *C. beticola* e *C. apii* que causam cercosporiose em aipo e em beterraba, respectivamente. E Bakhshi et al. (2015) observaram que a região do gene da calmodulina e histona foram as mais importantes e efetivas para distinguir várias espécies de *Cercospora*, tais como: *C. apii*, *C. beticola*, *C. flagellaris* Ellis & G. Martin, *C. convolvulicola* M. Bakhshi e *C. iranica* M. Bakhshi.

Martins, Maffia e Mizubuti (2008) estudaram isolados de *C. coffeicola* provenientes de três regiões de Minas Gerais e observaram que a variabilidade genética dos isolados está relacionada à compatibilidade vegetativa. Os autores relatam que esta não está relacionada com a região geográfica em que os isolados foram obtidos ou com o sistema de plantio em Minas Gerais. Mas, há a necessidade de estudos mais específicos para a caracterização de isolados, utilizando marcadores morfológicos e moleculares.

Muitas espécies de *Cercospora* podem ser caracterizadas pela produção de metabólitos fitotóxicos denominados de cercosporina (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). Embora, essa toxina possa estar envolvida com a virulência do fungo, esta não é considerada como fator de patogenicidade universal, em razão de não ser produzida por todas as espécies (UPCHURCH et al., 1991; DUNKLE; LEVY, 2000). Segundo Fajola (1978), a produção de

cercosporina é realizada por espécies “verdadeiras” pertencentes ao gênero *Cercospora* e que a não produção dessa toxina possa estar associado a outros gêneros relacionados.

A importância da cercosporiose tem aumentado em todas as regiões produtoras de café no Brasil, principalmente, em Minas Gerais, onde foi observada a ocorrência de dois sintomas distintos dessa doença. Não se sabe se estão ocorrendo variações genéticas do patógeno ou variações ambientais e nutricionais (NELSON, 2008; MATIELLO; ALMEIDA, 2013). Sabe-se que estudos envolvendo a resistência do cafeeiro a esse fungo são escassos e não foram realizados ainda estudos de herança da resistência (DELL'ACQUA et al., 2011). Além disso, não há relatos se há mais de uma espécie fúngica infectando o cafeeiro. Diante disso, há a necessidade de estudos moleculares para confirmar se há a ocorrência de variações genéticas nos isolados de *Cercospora* capazes de causar diferentes sintomas.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, A. A. et al. Influência de safras agrícolas e tratamentos fungicidas no café cereja descascado e bóia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p.1919-1925, 2009. Edição Especial. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000700038>>. Acesso em: 14 dez. 2014.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, Mar. 2010.
- AMARAL, D. R. et al. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 425-431, Nov. 2008.
- AMNUAYKANJANASIN, A.; DAUB, M. E. The ABC transporter ATR1 is necessary for efflux of the toxin cercosporin in the fungus *Cercospora nicotianae*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, n. 2, p. 146-158, Feb. 2009.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, Ohio, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.
- BABU, A. M. et al. Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 1, p. 57-62, Jan. 2009.
- BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A. Morphological and molecular characterization of *Cercospora zebrina* from black bindweed in Iran. **Plant Pathology and Quarantine**, v. 2, p. 125-130, Sept. 2012.
- BAKHSHI, M. et al. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. **Persoonia**, Leiden, v. 34, n. 1, p. 65-86, Dec. 2015.

BELAN, L. L. **Detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em sementes, Microanálise de raios x e desenvolvimento de escala diagramática para a mancha aureolada do cafeeiro.** 2014. 128 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

BELAN, L. L. et al. Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. **Australasian Plant Pathology**, Berlin, v. 44, n. 1, p. 105-111, Jan. 2015.

BLANCHETTE, R. A. Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 6, p. 725-730, Mar. 1984.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIEL, K. R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 11, p. 290-1294, May 1976.

BORGES, A. et al. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 1, p. 1216-1220, May 2012.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real time RT-PCR e a perspectiva. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, June 2005.

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

CARVALHO, V. D. de; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, jun. 1997.

CARVALHO, V. L.; CHALFOUN, S. M. *Cercospora*: doença do cafeeiro também chamada de “olho pardo” ou “olho de pomba”. Lavras: UFLA, 2001. (Informe Tecnológico, 026).

CASTAÑO, A. J. J. Mancha de hierro del cafeto. **Cenicafé**, Chinchiná, v. 82, p. 313–327, 1956. (Boletim Informativo).

CHEN, S. et al. Quantitative X-ray elemental imaging in plant materials at the subcellular level with a transmission electron microscope: applications and limitations. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 3160-3175, Apr. 2014.

CHEN, C. A. et al. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian Corals. **Zoological Studies**, Taipei, v. 43, n. 4, p. 759-771, June 2004.

CHEN, H. Q.; LEE, M. H.; CHUNG, K. R. Functional characterization of three genes encoding putative oxidoreductases required for cercosporin toxin biosynthesis in the fungus *Cercospora nicotianae*. **Microbiology**, San Diego, v. 153, n. 8, p. 2781-2790, Aug. 2007.

CHEN, Y. J.; LYNGKJ, M. F.; COLLINGE, D. B. Future prospects for genetically engineering disease-resistant plants. In: SESSA, G. (Ed.). **Molecular plant immunity**. [S. l.]: Wiley-Blackwell, 2013. 304 p.

CHOUDHURY, S. et al. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, n. 4, p. e23681, Feb.2013.

CHOQUER, M. et al. Deletion of a MFS transporter-like gene in *Cercospora nicotianae* reduces cercosporin toxin accumulation and fungal virulence. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 3, p. 489–494, Jan. 2007.

CHOQUER, M. et al. The *CTB1* gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin toxin biosynthesis and fungal virulence in *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 5, p. 468-476, May2005.

CHUNG, K. R. et al. The CRG1 gene required for resistance to the singlet oxygen-generating cercosporin toxin in *Cercospora nicotianae* encodes a putative fungal transcription factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 302, n. 2, p. 302-310, Mar.2003.

CHUPP, C. A. **Monograph of the fungus Genus *Cercospora***. Ithaca: Publicado pelo autor, 1954. 667 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

COOKE, M. C. *Cercospora coffeicola*. **Grevillea**, v. 9, p. 99, 1881.

CROUS, P. W.; BRAUN, U. ***Mycosphaerella* and its anamorphs**: 1. Names published in *Cercospora* and *Passarola*. Centraalbureau voor Schimmelcultures: The Netherlands, 2003.

CRUZ, M. F. A. et al. Aspectos microscópicos da interação feijoeiro - *Colletotrichum lindemuthianum* mediados pelo silício. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 3, p. 284-291, maio 2014.

CUSTÓDIO, A. A. P. et al. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1067-1076, Nov. 2011.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. **Cercosporin**: a photoactivated toxin in plant disease. 2007. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/cercosporin/>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis. In: DEISING, H. B. (Ed.). **Plant relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. v. 5, p. 201-219.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.38, n. 1, p. 461-490, 2000.

DAUB, M. E.; HANGARTER, R. P. Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, Cercosporin. **Plant Physiology**, Washington, v. 73, n. 1, p. 855-857, 1983.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Photoactivad perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 197-206, Sept. 2005.

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. R. Reactive oxygen species in plant pathogenesis: the role of perylenequinone photosensitizers. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 970-989, Sept.2013.

DEBONA, D. et al. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 12, p. 1121-1129, Dec. 2012.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DEKKERS, K. L. et al. The *Cercospora nicotianae* gene encoding dual O-methyltransferase and FAD-dependent monooxygenase domains mediates cercosporin toxin biosynthesis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 5, p. 444-454, Oct. 2007.

DELL' ACQUA, R. et al. Variabilidade *in vitro*, *in vivo* e molecular de isolados de *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 313-326, Sept. 2011.

DINIZ, I. et al. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 141-157, Dec. 2012.

DUNKLE, L. D.; LEVY, M. Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 5, p. 486-490, May 2000.

ECHLIN, P. Biological X-ray microanalysis: the past, present practices, and future prospects. **Microscopy and Microanalysis**, New York, v. 7, n. 1, p. 211-219, 2001.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

FAJOLA, A. O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 13, n. 2, p. 157-164, 1978.

FERNANDEZ, D. et al. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 6, p. 527-536, Nov. 2004.

FREY, B. Botanical X-ray microanalysis in cryoscanning electron microscopy. In: KUO, J. (Ed.). **Electron microscopy: methods and protocols**. 2<sup>nd</sup> ed. Totoya, New Jersey: Humana, 2007. p. 529-541. (Methods in Molecular Biology, 369).

GARCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 286-291, maio 2003.



GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 30, n. 6, p. 503-512, June2002.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. 3<sup>rd</sup> ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 184-200.

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, July2001.

GROENEWALD, J. Z. et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, n. 1, p. 115-170, June2013.

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 8, p. 951-959, Aug.2005.

GÜMIL, S. et al. Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Stanford, v. 102, n. 1, p. 8066-8070, May2005.

GUPTA, V. P. et al. Observations on the surface ultrastructure of conidial stage of *Cercospora moricola* and its infection process in mulberry. **Sericologia**, New Delhi, v. 35, p. 123-128, 1995.

GUZZO, S. D.; HAKAKAVA, R.; TSAI, S. M. Identification of coffee genes expressed during systemic acquired resistance and incompatible interaction with *Hemileia vastatrix*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 10, p. 625-638, Mar. 2009.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 509-547, Mar. 2007.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 1, p. 462-468, Dec. 2001.

IDNURM, A.; HOWLETT, B. J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 241-255, July2001.

INGESTAD, T.; AGREN, G. I. Plant nutrition and growth: basic principles. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 168/169, n. 1, p. 15-20, 1995.

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

JONES, J. D.; DANG, J. L. The plant immune system. **Nature**, Stuttgart v. 444, p. 323- 329, Nov. 2006.

KAHMANN, R.; BASSE, C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, n. 4, p. 374-380, Aug.2001.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 12, p. 937–947, Dec. 2005.

KOCH, E., EBRAHIN-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 106, p. 302-320, 1983.

KUYKENDALL, L.; UPCHURCH, R. Expression in sugar beet of the introduced cercosporin toxin export (CFP) gene from *Cercospora kikuchii*, the causative organism of purple seed stain in soybean. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 9, p. 723-727, May2004.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R. N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 4, p. 1237-1245, 1997.

LARTEY, R. T.; CAESAR-TONTHAT, T. C.; CAESAR, A. J. Safflower: a new host of *Cercospora beticola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 8, p. 797–801, Aug. 2005.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v. 257, p. 967-971, 1992.

- LIMA, L. M. D. et al. Relação nitrogênio/potássio com mancha de Phoma e nutrição de mudas de cafeeiro em solução nutritiva. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 223–228, ago.2010.
- LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; SANTOS, F. S. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 4, p. 209-211, Feb. 2012.
- LIN, C. H.; YANG, S. L.; CHUNG, K. R. The YAP1 homolog mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 8, p. 942-952, Aug.2009.
- MAGBANUA, Z. V. et al. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 20, n. 6, p. 697-706, June2007.
- MARSCHNER, H. **The mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic, 890p, 2012.
- MARTINEZ, H. E. P. et al. Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 6, p. 703-713, jun. 2003.
- MARTINS, R. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Genetic variability of *Cercospora coffeicola* from organic and conventional coffee plantings, characterized by vegetative compatibility. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, n. 11, p. 1205–1211, 2008.
- MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R. Cercospora negra associada à deficiência de fósforo em cafeeiros. **Procafé online**, 2013. Disponível: <<http://www.fundacaoprocafe.com.br/>>. Acesso em: 29 jul. 2014.
- MCCULLY, M. E. et al. Cryo-scanning electron microscopy (CSEM) in the advancement of functional plant biology: energy dispersive X-ray microanalysis (CEDX) applications. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 37, p. 1011–1040, 2010.
- MEHDY, M. et al. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 98, n. 2, p. 365-374, Oct. 1996.

- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.
- NASCIMENTO, K. J. T. et al. Soybean resistance to *Cercospora sojina* infection is reduced by silicon. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 104, n. 11, p. 1183-1191, 2014.
- NEILL, S. J. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237-47, Dec. 2002.
- NELSON, S. C. Cercospora leaf spot and berry blotch of coffee. **Plant Disease**, PD-41, June 2008. Disponível em: <<http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-41.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- NIKRAFTAR, F. et al. Tomato partial resistance to *Rhizoctonia solani* involves antioxidative defense mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 81, n. 1, p. 74–83, Jan. 2013.
- OESTREICH-JANZEN. Chemistry of coffee in comprehensive natural products II: chemistry and biology. **The Science of Coffee**, Illy, 2010. Disponível em: <<http://www2.illy.com/wps/wcm/connect/us/illy/>>. Acesso em: 5 jan. 2014.
- OKORI, P. et al. Interactive effects of host, pathogen and mineral nutrition on grey leaf spot epidemics in Uganda. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 2, p. 119–128, Feb. 2004.
- OLIVEIRA, J. T. A. et al. Role of antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and pr proteins in the compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2014.
- OROZCO-CARDENAS, M. L.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 179–191, Jan. 2001.
- PATRÍCIO, F. R. A.; BRAGHINI, M. T.; FAZUOLI, L. C. Resistência de plantas de *Coffea arabica*, *C. canephora* e híbridos interespecíficos à cercosporiose. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 883-890, Dec. 2010.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, Feb. 2008.

POLANCO, L. R. et al. Photosynthetic gas exchange and antioxidative system in common bean plants infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and supplied with silicon. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 35-42, Jan. 2014.

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 185-188, mar. 2004.

POZZA, A. A. A. et al. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 53-60, jan. 2001.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: MACHADO, A. K. F. M. et al. (Org.). **Avanços na otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário**. 1. ed. São Carlos: Suprema Gráfica e Editora, 2012. v. 1, p. 259-282.

RAMIRO, D. A. et al. Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 944-955, July 2009.

RIO, M. C. S. et al. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. **Current Microbiology**, New York, v. 56, n. 4, p. 363-370, Jan. 2008.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, July 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661-686, June 2005.

SCHUSTER, B.; RÉTEY, J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, n. 18, p. 8433-8437, Aug.1995.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Columbus, v. 1, p. 1-26, Feb. 2012.

SILVA, M. B. et al. Extratos de plantas e seus derivados no controle de doenças e pragas In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J de.; PALLINI FILHO, A. (Coord.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: EPAMIG, 2010. p. 33-54.

SILVA, M. C. et al. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, n. 3, p. 29-38, Jan. 2008.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, June 2011.

SOUZA, A. G. C.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 10, p. 540-546, July2012.

SPANN, T. M.; SCHUMANN, A. W. **Mineral nutrition contributes to plant disease and pest resistance**. 2013. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

TAHERI, P. et al. Oxidative burst and enzymatic antioxidant systems in rice plants during interaction with *Alternaria alternata*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 140, n. 4, p. 829-839, Dec. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 719 p.

TESSMANN, D. J.; CHARUDATTAN, R.; PRESTON, J. F. Variability in aggressiveness, cultural characteristics, cercosporin production and fatty acid profile of *Cercospora piaropi*, a biocontrol agent of water hyacinth. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 957-966, May2008.

THINES, E. et al. Genetics of phytopathology: secondary metabolites as virulence determinants of fungal plant pathogens. **Progress in Botany**, Berlin, v. 67, p. 132-59, 2006.

TSUGE, S. et al. Involvement of phosphoglucose isomerase in pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 5, p. 478-484, May 2004.

UPCHURCH, R. G. et al. Expression of the cercosporin transporter, *CFP*, in tobacco reduces frog-eye lesion size. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 20, p. 1543-1550, Oct. 2005.

UPCHURCH, R. G. et al. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 10, p. 2940-2945, Oct. 1991.

UPCHURCH, R. G.; RAMIREZ, M. E. Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 75, n. 1, p. 64-70, Dec. 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Production, supply and distribution online**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em: 6 jan. 2014.

WELLES, C. G. Taxonomic studies on the genus *Cercospora* in the Philippine Islands. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 12, p. 195-218, 1933.

WILLIAMSON, J. D.; SCANDALIOS, J. G. Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. **The Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 351-358, May 1992.

YOU, B. J.; LEE, M. H.; CHUNG, K. R. Production of cercosporin toxin by the phytopathogenic *Cercospora* fungi is affected by diverse environmental signals. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, n. 4, p. 259-269, Apr. 2008.

ZAMBOLIM, L. et al. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças. In: VALE, F. X. R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas cultivadas: grandes culturas**. Viçosa, MG: Departamento de Fitopatologia, 1997. v. 1, p. 83-180.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.



**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS****ARTIGO 1 Caracterização fisiológica e genética de isolados de *Cercospora coffeicola* provenientes de lesões de cercosporiose do tipo olho pardo e negra**

Artigos submetidos ou em processo de submissão em periódicos.

Camila C. Lage Andrade<sup>1</sup>, Silvino Intra Moreira<sup>1</sup>, Deila M. Santos Botelho<sup>1</sup>,  
Leônidas Leoni Belan<sup>1</sup>, Sarah S. Costa Guimarães<sup>1</sup>, Paula A. Souza Vale<sup>2</sup>,  
Eduardo Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Biologia Molecular, Universidade Federal de Lavras, MG 37200-000, Brasil

Autor para correspondência: E. Alves, e-mail: ealves@dfp.ufla.br

Preparado em concordância com as normas do periódico “**Journal of  
Phytopathology**”

(Versão preliminar – em processo de submissão)

## Resumo

Apesar dos grandes danos que *Cercospora coffeicola* causa à produção de café no Brasil, há a ausência de informações sobre diferentes lesões em folhas de cafeeiro: cercosporiose do tipo olho pardo (comum CC) e cercosporiose do tipo negra (CN). No entanto, ainda não foi possível explicar os fatores envolvidos com essa variabilidade nas lesões causadas pela doença. Assim, o objetivou-se, nesse estudo, foi caracterizar os isolados por meio de estudos, filogenéticos, avaliara agressividade, produção da cercosporina *in vitro*, identificar a presença de genes relacionados à produção de cercosporina e observar a distribuição de nutrientes nos tecidos foliares com sintomas da doença. Os isolados foram inoculados em mudas de cafeeiro das cultivares Iapar 59 e Mundo Novo 376/4, em condições de casa de vegetação, e avaliou-se o período de incubação (PI) da doença, a área abaixo da curva do progresso da severidade da doença (AACPSD) e produção de cercosporina *in vitro* (PC). Filogeneticamente, os isolados pertencem ao grupo *Cercospora coffeicola*. Mudas inoculadas com os oito isolados apresentaram sintomas de CC. Houve diferença significativa entre os isolados quanto ao PI, AACPSD, PC, e foram encontrados a presença de genes que codificam para a PC. Houve variação nos teores de cálcio, potássio, magnésio e fósforo nos tecidos foliares em torno das lesões da doença, em ambas as cultivares, independente do tipo de lesão. É possível que outros fatores ambientais, nutricionais e/ou genéticos estejam envolvidos com a ocorrência de sintomas de CN.

**Palavras-chave:** cercosporiose do tipo olho pardo, cercosporiose do tipo negra, *Coffea arabica*, microanálise de raios X, cercosporina.

## **Introdução**

A cafeicultura é uma das atividades agrícolas mais importantes para o Brasil, o qual é o maior produtor e exportador de café (*Coffea arabica* L.) do mundo (Conab 2015). No entanto, vários fatores têm contribuído para reduzir a produtividade das lavouras cafeeiras, dentre eles, as doenças de plantas. Dentre as doenças de etiologia fúngica, destaca-se a cercosporiose do cafeeiro, cujo agente etiológico é *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. Os sintomas comuns da cercosporiose são manchas marrons e arredondadas, circundadas com halo amarelado e uma região central acinzentada (Godoy et al. 1997; Souza et al. 2012). Entretanto, uma variação dos sintomas foi observada em condições de campo, gerando especulações de que outros fatores estariam envolvidos para a ocorrência dos novos sintomas (Nelson 2008; Matiello e Almeida 2013). Esses sintomas atípicos foram designados como cercosporiose do tipo negra, pois apresentavam lesões irregulares escuras, quase negras, e maiores do que as lesões comuns (Matiello e Almeida 2013).

Para avaliar a possível causa dessa diferença de sintomas, foram coletados isolados de várias regiões de Minas Gerais para que estes pudessem ser caracterizados de forma a observar a possibilidade da ocorrência de novas espécies. Conforme relatado por Bakhshi et al. (2015) e Groenewald et al. (2013) há regiões gênicas importantes que podem ser úteis para diferenciar espécies de *Cercospora*. Há relatos na literatura sobre variabilidade de *C. coffeicola*, independente da região geográfica e condições de cultivo (Martins et al. 2008). No entanto, é necessário mais informações sobre quais os fatores, bióticos ou abióticos, condicionam a essa variabilidade dos sintomas de cercosporiose do tipo negra em folhas de cafeeiros. Alguns estudos avaliaram a correlação entre a produção da toxina cercosporina por isolados do gênero *Cercospora*, com a virulência de isolados, como um dos indicativos de variabilidade (Choquer et al. 2005; Souza et al. 2012). Por outro lado, outros

estudos utilizando isolados mutantes de *C. coffeicola*, descobriram genes envolvidos com a produção da cercosporina e o modo de ação desta no hospedeiro (Callahan et al. 1999; Choquer et al. 2005; Chen et al. 2007). Entretanto, não existem relatos de genes envolvidos com a produção de cercosporina em *C. coffeicola*, embora já se conheça que a severidade da cercosporiose do cafeeiro e a virulência dos isolados estejam correlacionadas com a intensidade de luz e com as condições nutricionais do hospedeiro (Pozza et al. 2001; Júnior et al. 2003; Souza et al. 2012).

De fato, as condições nutricionais e ambientais são fatores condicionais para a ocorrência da cercosporiose do cafeeiro (Pozza et al. 2001). Alguns autores obtiveram resultados promissores ao correlacionarem a aplicação de potássio e cálcio com a intensidade dessa doença (Júnior et al. 2003; Pozza et al. 2004). Essa interação *Cercospora*/cafeeiro, diferentes sintomas de cercosporiose e nutrição mineral necessitam de mais estudos. Conhecer o efeito dos nutrientes sobre a resposta das plantas à infecção patogênica pode auxiliar em estratégias de manejo dessa doença (Belan et al. 2015). Diante dessas questões sobre a variabilidade dos sintomas de cercosporiose, os objetivos, neste estudo, foram: (i) caracterizar os isolados por meio de estudos filogenéticos; (ii) avaliar a agressividade, produção de cercosporina *in vitro* associado com a identificação da presença de genes envolvidos na produção de cercosporina *in vitro*; (iii) observar a distribuição de nutrientes nos tecidos foliares.

## **Material e Métodos**

### **Preparo das mudas e condições de crescimento**

Mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) com seis meses de idade (4 pares de folhas) das cultivares “Iapar 59” e “Mundo Novo 376/4”. Essas cultivares são classificadas como suscetíveis a *C. coffeicola* (Patricio et al. 2010). As mudas

foram produzidas em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### **Obtenção dos isolados de *C. coffeicola***

Os conídios de *C. coffeicola* foram retirados diretamente de lesões de folhas de cafeeiros apresentando sintomas de cercosporiose do tipo comum (CC) e cercosporiose do tipo negra (CN). Foram obtidos oito isolados provenientes de diferentes regiões cafeeiras do Brasil (Tabela 1). Foi realizada a cultura monospórica dos isolados em meio ágar água 2% (20 g de ágar e 1000 mL de água destilada) e confirmada a identidade desses, por meio de microscopia de luz e chaves taxonômicas (Crous e Braun 2003). Posteriormente, os isolados foram repicados para meio de cultura V8<sup>®</sup> (100 mL de V8<sup>®</sup>, 2 g de CaCO<sub>3</sub>, 17 g de ágar e 1000 mL de água destilada) e depositados na Coleção Micológica de Lavras (CML), localizada no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

**Tabela 1** Isolados de *Cercospora coffeicola* obtidos de diferentes tipos de sintomas de cercosporiose em diferentes cultivares de cafeeiro e origens no Brasil

<b>Número dos isolados (CML)</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Localidade</b>	<b>Tipo de cercosporiose</b>
CML 2984	Desconhecida	Município de Bonfinópolis, MG	Olho pardo (comum)
CML 2985	Topázio MG 1190	Município de Três Pontas, MG	Negra
CML 2986	Topázio MG1190	Lavras, MG	Olho pardo (comum)
CML 2987	Catuaf vermelho IAC 144	Patrocínio, MG	Negra
CML 2988	Desconhecida	Marechal Floriano, ES	Olho pardo (comum)
CML 2989	Araponga MG1	Município de Turmalina, MG	Olho pardo (comum)
CML 2990	Catuaf vermelho IAC 144	Município de Bonfinópolis, MG	Negra
CML 2991	Catuaf	Município de Aguani, MG	Olho pardo (comum)

### **Caracterização genética dos isolados**

Para o isolamento do DNA, discos de micélio (5 mm) de cada isolado crescido em meio BDA foram transferidos para erlenmeyers de 100 mL contendo meio completo líquido (Jeanns 1989), e incubados a temperatura de 25°C por 3 dias consecutivos sob agitação constante (100 rpm). Posteriormente, os micélios foram filtrados para remoção do meio de cultura, congelados com nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. A extração do DNA genômico foi realizada, utilizando 100 mg de crescimento fúngico homogeneizado com o kit DNA Wizard (Promega, Madison, USA), segundo as recomendações do fabricante. A qualidade e a quantidade de DNA foi mensurado em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, New Hampshire, USA).

Inicialmente, parte da sequência gênica do *translation elongation factor I- $\alpha$*  (EF1- $\alpha$ ) foi determinada para todos os isolados coletados utilizando o par de primers EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') e EF1-986R (5'-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC-3') (O'Donnell et al. 1998). As condições da reação foram 94°C por 1 min, seguida por 34 ciclos a 94°C por 30 s, 58°C por 45 s e 72°C por 1 min, com extensão final de 72°C por 5 min. Para o gene da actina foram utilizados os primers ACT-512F (5'-ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC-3') e ACT-783R (5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT-3'). As condições da reação foram 95°C por 4 min, seguida por 35 ciclos a 95°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C por 45 s, com extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% e submetidos à purificação utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

O produto da reação de PCR foi enviado para a Macrogen, Rockville, Maryland, EUA. O método de Sanger foi utilizado no sequenciamento dos genes EF1- $\alpha$  e actina.

Os eletroferogramas gerados foram analisados, utilizando-se o programa SeqAssem (Hepperle 2004) e as sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank do NCBI, com o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>). Nas análises filogenéticas sequências de referência do FSSC correspondentes ao EF1- $\alpha$  e ACT, previamente depositadas no GenBank, foram acrescentadas às análises. As análises filogenéticas foram realizadas de forma individual (EF1- $\alpha$  600 pb) e (ACT 300 pb) e combinadas (900 pb). Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos foram gerados, utilizando-se a ferramenta CLUSTALW (Thompson et al. 1994), implementado pelo programa MEGA 5 e foram corrigidos manualmente. A análise filogenética foi realizada com base no método de *maximum likelihood partial deletion*, por meio do programa MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Sequências de *Septoria provencialis* foram utilizadas como *outgroup*, com base nos resultados obtidos por Groenewald et al. (2013).

### **Inoculação em mudas de cafeeiro**

Seis discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram removidos da borda de meio contendo crescimento micelial e transferidos para erlemayers de 25 mL, contendo 10 mL de meio V8 (10% de suco de tomate V8). Estes foram mantidos por agitação 110 rpm a 25°C por 4 dias. O crescimento fúngico foi vertido sobre ágar água 2% em placas de Petri, que foram mantidas abertas em BOD a 25°C, sob luz contínua. Após 4 dias, foram adicionados 5 mL de água destilada esterilizada; e foi realizada a raspagem e filtragem da suspensão, seguida da quantificação da concentração de conídios (Adaptado de Souza et al. 2011). A concentração da suspensão de conídios utilizada foi ajustada para  $5 \times 10^4$  conídios/mL para todos os isolados.

Plantas de cafeeiro de ambas as cultivares foram inoculadas via atomização da suspensão de conídios até o ponto de escoamento primeiro e no



segundo par das folhas (ápice para a base) na superfície abaxial, utilizando um pulverizador manual. Posteriormente, as plantas foram mantidas em câmara úmida na casa de vegetação com temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $89\pm 5\%$  por 48 horas. Após esse período, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $86\pm 5\%$ . A temperatura e umidade relativa foram monitoradas, utilizando o datalogger (HT-500, Instrutherm, São Paulo, Brasil).

### **Delineamento experimental**

O experimento foi realizado em duas épocas (duas vezes) para a validação dos resultados.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial  $2\times 8$ , consistindo de duas cultivares de cafeeiro (Iapar 59 e Mundo Novo 376/4) e oito isolados de *C. coffeicola*. O delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições, sendo cada unidade experimental composta de um vaso com três mudas.

### **Avaliação do período de incubação e da área abaixo da curva de progresso da severidade da doença**

A ocorrência e o progresso da doença foram avaliados no primeiro par de folhas totalmente expandidas do ápice para a base das mudas. O PI definido como o intervalo de tempo entre a inoculação e o aparecimento das primeiras lesões necróticas com halo clorótico, foi avaliado a cada 24 horas após inoculação. A severidade da doença foi avaliada em cinco tempos, com intervalo de dois dias, utilizando a escala diagramática proposta por Custódio et al. (2011), e a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) foi calculada de acordo com Shaner e Finney (1977).

### **Microanálise de raios X (MAX)**

Discos de folhas de (5 mm) (primeiro par de folhas totalmente expandidas do ápice para a base das mudas) foram coletados aos 28 dias após inoculação com os oito isolados de *C. coffeicola*. Discos de folhas saudáveis foram utilizados como controle. Os fragmentos foram transferidos para microtubos contendo 1 mL de fixativo Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7,2; CaCl<sub>2</sub> 0,001 M), por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes, durante 10 minutos, em tampão cacodilato 0,05 M e desidratadas em uma série crescente de concentração de etanol (30%, 50%, 75%, 90% e 95%) por 10 min e de 100%, por três vezes durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituir o etanol por CO<sub>2</sub> e complementar a secagem (Baltec, model CPD 030; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Quatro espécimes obtidos de cada amostra foram montados em suportes de alumínio stubs com fita dupla face de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com uma camada de carbono para a observação em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 040 acoplado ao sistema de detecção de MAX: EDS X-Flash Detector 5010 (Bruker) e analisadas, utilizando o software ESPRIT 1.9 (Bruker). Foi realizada a quantificação da distribuição dos elementos minerais, ao longo de uma linha (100 pontos), traçada sobre as amostras representando áreas com tecidos assintomáticos (50 pontos) até tecidos sintomáticos (50 pontos). As imagens foram geradas e capturadas sob as condições de trabalho de 20 kV, 8,5 mm de distância e Kcps acima de 4. Os dados da quantificação dos nutrientes minerais (%) por ponto foram tabulados, utilizando o software Microsoft® Excel® 2010. Foram selecionados os nutrientes que apresentaram variação na distribuição nos tecidos amostrados.

### **Determinação da produção de cercosporina *in vitro***

Para cada isolado, discos de micélio (0,5 cm de diâmetro) foram retirados da borda da colônia crescida em meio de cultura V8, e transferidos para o centro de uma placa de Petri, contendo meio batata dextrose ágar (BDA) (20 g de batata dextrose, 20 g de ágar e 1000 mL de água destilada esterilizada). Posteriormente, os isolados foram incubados em câmara de crescimento do tipo BOD a 25°C com lâmpadas fluorescentes com intensidade luminosa de 276,3  $\mu\text{mol/s/m}^2$  sob fotoperíodo de 24 horas. Depois de 7 dias, discos de micélio foram retirados do meio de cultura BDA e a cercosporina foi extraída utilizando KOH 5M e quantificada na absorbância de  $A_{480}$ , utilizando o espectrofotômetro Gen5™ (BioTek® Instruments, Winooski, EUA) (Choquer et al. 2005).

### **Identificação da presença de genes relacionados à produção da cercosporina**

O DNA genômico foi obtido conforme descrito acima. As sequências dos genes de interesse foram obtidas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os primers foram desenhados utilizando o IDT Primer Designer Tool. As sequências dos primers estão listadas na Tabela 2.

As reações foram realizadas utilizando 1  $\mu\text{L}$  de DNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,3  $\mu\text{L}$  de cada primer (10  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de GoTaq® Hot Start Colorless Hot Master Mix (Promega, Madison, USA), no volume total de 20  $\mu\text{L}$ . As condições de amplificações foram: 95°C por 2 min., seguida por 30 ciclos a 95°C por 40 s, 58°C por 35 s e 72°C, variando de 2 a 5 min, 72°C por 5 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados com GelRed™ e visualizados sob luz UV em fotodocumentador (Alphamager HP Imaging System). As imagens geradas foram processadas utilizando o software Corel Draw X6.

**Tabela 2** Sequência de nucleotídeos para PCR utilizadas neste estudo

<b>Gene</b>	<b>Primer Sequence (5' – 3')</b>	<b>(NCBI) Accession Number</b>	<b>Amplicon Length (bp)</b>
CTB1-For	ATGGAAGATGGAGCGCAGATGC	AY649543.1	5.034
CTB1-Rev	GGCTATCAGTGCCGACACAC	AY649543.1	5.034
CTB1-For	TCTCGGCCGCTGGAGGTAAC	AY649543.1	4.172
CTB1-Rev	CAAACCATCTCGCATGTGCTCAAC	AY649543.1	4.172
CTB3-For	ATGATGCAGTTCCAACGCGATCTTG	DQ355149.2	2.559
CTB3-Rev	TGCTGCCAACCTCACTCCTCC	DQ355149.2	2.559
CTB6-For	CTGGGCGACGAGATGGTCTTGG	DQ991508.1	1.699
CTB6-Rev	GCAATGGAGTATGAGACAGTCCGC	DQ991508.1	1.699
CTB8-For	CGTCGACACGCGACTTCGG	DQ991510.1	2.148
CTB8-Rev	GCGCTCGCGATGCAAGAC	DQ991510.1	2.148
CPF-For	GATCTGTGCACGCCACGTTG	AF091042.1	3.236
CPF-Rev	GCCTCTGAGCCACACTCTG	AF091042.1	3.236

### **Análises estatísticas**

Os dados do PI e da AACPSD de cada época de realização do experimento foram submetidos individualmente à análise de variância, e a variância dos dados comparados conforme proposto por Pimentel-Gomes (2009), para verificar a possibilidade de análise conjunta dos dados. Quando atendidas as condições para análise conjunta, os dados combinados foram avaliados quanto às pressuposições da análise de variância ( $p = 0,05$ ). Os dados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial, utilizando-se o software “R” v.3.1.3, e a significância das interações verificadas por teste F ( $p=0,05$ ). Quando o teste F foi significativo para o fator “cultivares”, estes foram comparados por teste t ( $p = 0,05$ ), e quando significativo para o fator “isolados” esses foram comparados por Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os dados dos tratamentos da microanálise de raios X, considerando o tecido assintomático mais o tecido sintomático foram comparados, em relação à testemunha, utilizando o teste de Dunnett ( $p=0,05$ ).

### **Resultados**

#### **Caracterização genética dos isolados**

Os oito isolados testados agruparam-se em um único grupo monofilético com *bootstrap support* de 89% com o grupo *Cercospora* sp. “P” que infecta o cafeeiro (Fig. 1).

#### **PI e AACPSD**

Não houve interação significativa entre os níveis dos fatores isolados e cultivares de cafeeiro para a variável PI (Tabela 3). Já, para a variável AACPSD houve interação significativa entre os níveis dos fatores (Tabela 4).

**Tabela 3** Resumo da análise de variância para variável período de incubação (PI) da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica*)

Fontes de variação (PI)	GL	Valores de F
Isolados (I)	7	15,63**
Cultivares (C)	1	30,66**
I×C	7	1,33 <sup>ns</sup>
CV (%)	9,87	

<sup>a</sup>Níveis de probabilidade: <sup>ns</sup> = não significativo, \*\* = 0,05

**Tabela 4** Análise de variância do efeito dos isolados e cultivares na área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD)

Fontes de variação (AACPSD)	GL	Valores de F
Isolados (I)	7	52,41**
Cultivares (C)	1	31,12**
I×C	7	8,91**
CV (%)	18,09	

<sup>a</sup>Níveis de probabilidade: <sup>ns</sup> = não significativo, \*\* = 0,05

Houve diferença significativa entre os níveis dos fatores cultivar e isolados, para a variável PI ( $p \leq 0,05$ ), no entanto não houve padrão de comportamento quanto ao PI para isolados de CC e CN (Fig. 1). O PI da cercosporiose foi menor em folhas de cafeeiro inoculadas com os isolados CML 2985 (CN), CML 2984 (CC), CML 2986 (CC) e CML 2988 (CC), independente da cultivar (Fig. 2A), com média de 12,55 dias entre esses isolados. Já, o isolado CML 2990 (CN) proporcionou PI de 17,97 dias, maior que todos os demais isolados. Com relação às cultivares de cafeeiro, a cultivar Iapar 59 (I) proporcionou menor PI, independente do isolado de *C. coffeicola* (Fig. 2B).

Na cultivar I, os isolados CML 2987 (CN), CML 2988 (CC) e CML 2986 (CC) apresentaram maior AACPSD, seguidos dos isolados CML 2989

(CC) e CML 2984 (CC). Os isolados CML 2985 (CN) e CML 2991 (CC) não diferiram estatisticamente entre si para a AACPSD. Enquanto que, o isolado CML 2990 (CN) apresentou menor AACPSD quando comparado aos outros isolados (Tabela 5).

Na cultivar Mundo Novo 376/4 (MN), o isolado CML 2988 (CC) apresentou maior AACPSD quando comparado aos outros isolados. Não houve diferença significativa para AACPSD entre os isolados CML 2987 (CN), CML 2986 (CC) e CML 2984 (CC). Os isolados CML 2989 (CC) e CML 2990 (CN) apresentaram menor AACPSD e não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 5).

Os isolados CML 2987 (CN) e CML 2986 (CC) apresentaram maior AACPSD quando inoculados na cultivar I, enquanto que os demais isolados não apresentaram diferença significativa com relação a cultivar (Tabela 5).

**Tabela 5** Área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) obtida a partir de seis avaliações da severidade de *Cercospora coffeicola*, considerando oito isolados (CML 2984 – CML 2991) e duas cultivares (Iapar 59 e Mundo Novo 376/4) de cafeeiro

<b>ISOLADOS</b>								
<b>AACPSD</b>	<b>CML 2987</b>	<b>CML 2988</b>	<b>CML 2986</b>	<b>CML 2989</b>	<b>CML 2984</b>	<b>CML 2985</b>	<b>CML 2991</b>	<b>CML 2990</b>
Iapar 59	176,99 Aa	154,42 Aa	152,13 Aa	134,01 Ba	116,05 Ba	96,87 Ca	80,16 Ca	19,85 Da
Mundo Novo 376/4	133,07 Bb	171,88 Aa	114,60 Bb	23,69 Eb	111,55 Ba	85,64 Ca	61,43 Da	20,23 Ea

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas e minúsculas, na linha e coluna, respectivamente, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ )



### Microanálise de raios X

Houve gradiente de distribuição dos nutrientes cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e fósforo (P) entre os tecidos foliares assintomáticos e sintomático para as cultivares Iapar 59 (I) e Mundo Novo 376/4 (MN) infectadas com os oito isolados de *C. coffeicola* (Tabela 6). Houve diferença entre as cultivares quanto aos teores de cálcio nos tecidos foliares infectados com seis isolados. Desses, maiores concentrações de Ca foram encontradas na cultivar I quando inoculada com os isolados CML 2986 (CC), CML 2991 (CN), CML 2985 (CN) e CML 2989 (CC) (Tabela 6). Comparando-se entre os isolados, houve variabilidade do teor de Ca entre os tecidos infectados por esses em ambas as cultivares, no entanto, verifica-se que o isolado CML 2987 (CN) proporcionou menor teor de Ca em ambas as cultivares, porém não diferiu estatisticamente do controle na cultivar I.

Maiores concentrações de K e Mg foram encontradas nos tecidos foliares quando os isolados CML 2986 (CC) e CML 2991 (CC) infectaram a cultivar I (Tabela 6). Seguidos dos isolados CML 2989 (CC), CML 2985 (CN) e CML 2984 (CC) que não apresentaram diferenças entre si (Tabela 6). A cultivar I apresentou menor concentração de K e Mg quando inoculada com o isolado CML 2987 (CN) (Tabela 6).

A cultivar MN apresentou maior concentração de K, Mg e P quando inoculada com o isolado CML 2990 (CN) (Tabela 6), seguido dos isolados CML 2991 (CC), CML 2985 (CN), CML 2984 (CC), CML 2988 (CC) e CML 2987 (CN) que não apresentaram diferenças quanto à concentração de K e Mg (Tabela 6). A cultivar MN apresentou menor concentração de K e Mg quando inoculada com o isolado CML 2989 (CC) (Tabela 6).

Maiores concentrações de P foram encontradas quando o isolado CML 2986 (CC) foi inoculado na cultivar I (Tabela 6). A cultivar I apresentou maior concentração de P quando inoculada com os isolados CML 2991 (CC), CML

2989 (CC) e CML 2985 (CN), seguidos dos isolados CML 2984 (CC), CML 2990 (CN) e CML 2988 (CC) que não apresentaram diferenças quanto à concentração desse nutriente (Tabela 6). A cultivar I apresentou menor concentração de P quando inoculada com o isolado CML 2987 (CN) (Tabela 6). A cultivar MN apresentou maior concentração de P quando inoculada com os isolados CML 2991 (CC), CML 2986 (CC), CML 2985 (CN), CML 2984 (CC), CML 2988 (CC) e CML 2987 (CN) (Tabela 6). A cultivar MN apresentou menor concentração de P quando inoculada com o isolado CML 2989 (CC) (Tabela 6).

Comparando as plantas saudáveis (controle) com as plantas inoculadas com os oito isolados observou-se que houve diferenças na concentração de cálcio, potássio, magnésio e fósforo para as duas cultivares em estudo para todos os isolados (Fig. 3 e 4). No entanto, quando o isolado CML 2987 (CN) foi inoculado na cultivar I não se observou diferença com relação ao controle para todos os nutrientes em estudo (Fig. 3).

**Tabela 6** Distribuição dos nutrientes cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e fósforo (P) no tecido foliar (assintomático e sintomático) de folhas de café cultivares Iapar 59 e Mundo Novo 376/4 inoculadas com isolados (CML 2984 - CML 2991) de *Cercospora coffeicola*

Cálcio (Ca)								
MAX	CML 2986	CML 2991	CML 2985	CML 2989	CML 2990	CML 2988	CML 2984	CML 2987
Iapar 59	30,58 Aa	27,66 Aa	27,34 Aa	26,32 Aa	23,41 Bb	21,45 Ba	20,19 Bb	9,29 Cb
Mundo Novo 376-4	22,65 Ab	22,53 Ab	26,69 Ba	19,77 Ab	33,48 Aa	22,48 Aa	29,34 Ba	29,28 Ba
CV(%)	18,9							
Potássio (K)								
MAX	CML 2986	CML 2991	CML 2989	CML 2985	CML 2984	CML 2990	CML 2988	CML 2987
Iapar 59	14,72 Aa	12,97 Aa	9,75 Ba	9,47 Bb	9,16 Bb	7,63 Cb	6,82 Cb	3,50 Db
Mundo Novo 376-4	10,66 Cb	13,87 Ba	6,83 Db	12,80 Ba	14,83 Ba	17,12 Aa	13,78 Ba	14,29 Ba
CV(%)	16,71							
Magnésio (Mg)								
MAX	CML 2986	CML 2991	CML 2989	CML 2985	CML 2984	CML 2990	CML 2988	CML 2987
Iapar 59	13,70 Aa	12,55 Aa	11,28 Ba	11,28 Ba	8,74 Bb	10,93 Bb	8,98 Cb	3,89 Db
Mundo Novo 376-4	11,67 Bb	13,07 Ba	7,73 Cb	12,66 Ba	12,80 Ba	17,54 Aa	13,30 Ba	13,78 Ba
CV(%)	16,73							
Fósforo (P)								
MAX	CML 2986	CML 2991	CML 2989	CML 2985	CML 2984	CML 2990	CML 2988	CML 2987
Iapar 59	11,18 Aa	9,70 Ba	8,88 Ba	9,33 Ba	6,67 Cb	7,69 Cb	7,11 Cb	3,13 Db
Mundo Novo 376-4	10,37 Ba	9,86 Ba	6,33 Cb	9,53 Ba	11,07 Ba	14,15 Aa	9,88 Ba	11,35 Ba
CV(%)	16,13							

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas e minúsculas, na linha e coluna, respectivamente, diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). CV: coeficiente de variação (%)

### **Produção de cercosporina de *in vitro***

Não houve padrão entre os isolados provenientes de lesões de cercosporiose do tipo olho pardo (comum CC) e cercosporiose do tipo negra (CN) quanto a produção de cercosporina (Fig. 2). O isolado CML 2987 (CN), seguido do isolado CML 2985 (CN) produziram maiores quantidades de cercosporina *in vitro*. No entanto, o isolado CML 2990 (CN) também proveniente de lesões de cercosporiose do tipo negra, produziu a menor quantidade entre os isolados (Fig. 2).

### **Genes que codificam para a produção de cercosporina *in vitro***

Os isolados CML 2984 (CC), CML 2986 (CC), CML 2987 (CN), CML 2988 (CC), CML 2990 (CN) e CML 2991 (CC) apresentaram os genes que codificam para a produção da cercosporina: *Cercosporin Toxin Biosynthesis (CTB)* *CTB1*, *CTB3*, *CTB 6*, *CTB 8* e *Cercosporin Facilitator Protein (CPF)* (Fig. 5). Enquanto que, o isolado CML 2985 (CN) apresentou apenas os genes *CTB6*, *CTB8* e *CPF* (Fig. 6).

### **Discussão**

Nesse estudo, foram investigados fatores envolvidos na reprodutibilidade em casa de vegetação de lesões de cercosporiose do tipo olho pardo (comum CC) e lesões de cercosporiose do tipo negra (CN), ocorrendo em folhas de cafeeiro em condições de campo. Filogeneticamente, baseando-se nas sequências dos dois genes em estudo: fator de alongação e actina, os oito isolados pertencem ao grupo *Cercospora coffeicola*. Os oito isolados em estudo apresentaram diferenças entre eles quanto ao PI, AACPSD, produção de cercosporina *in vitro* e distribuição dos elementos minerais em ambas as cultivares (Iapar 59 e Mundo Novo 376/4) de cafeeiro, independente do tipo de sintoma causado em condições de campo. Os isolados também não apresentaram

características comuns dentro do grupo proveniente de lesões de CC e CN. No entanto, todos os isolados produziram lesões CC, ou olho-pardo, em ambas as cultivares em casa de vegetação. Logo, há outros fatores que condicionam a ocorrência de cercosporiose do tipo negra em condições de campo. Alguns trabalhos na literatura relatam a ocorrência de diferenças na intensidade da cercosporiose quando cafeeiros são inoculados com diferentes isolados provenientes de diferentes regiões (Patrício et al. 2010; Dell'Acqua et al. 2011; Souza et al. 2012). Esses autores atribuem esses fatos a uma possível variabilidade genética entre os isolados de *C. coffeicola*.

Em vários patógenos, a virulência está correlacionada com a habilidade de produzir toxina (Horbach et al. 2011). No presente estudo, houve também variação entre os isolados quanto à produção de cercosporina *in vitro*. Dos oito isolados testados, o CML 2987 (CN) e CML 2990 (CN) apresentaram maior e menor PI, e AACPSD, respectivamente, o que pode ser correlacionado com a produção de cercosporina *in vitro*, podendo ser considerados mais e menos virulentos em ambas as cultivares de cafeeiro. Resultados semelhantes também foram encontrados por Almeida et al. (2005), Choquer et al. (2005) e Souza et al. (2012) que observaram correlação entre a produção da cercosporina e a virulência de isolados: *C. nicotianae* e *C. coffeicola*. A variabilidade encontrada na produção de cercosporina entre os isolados do presente estudo também já ocorreu em outras espécies de *Cercospora*, conforme relatado por Jenks et al. (1989) e Almeida et al. (2005). Essa variabilidade também foi identificada dentro do grupo de isolados proveniente de lesões CC e CN.

No presente estudo, a microanálise de raios X (MAX) possibilitou identificar diferença dos nutrientes cálcio (Ca), potássio (K), magnésio (Mg) e fósforo (P) entre os tecidos das cultivares de cafeeiro e isolados de *C. coffeicola*. Em outros estudos envolvendo o mesmo patossistema, Pozza et al. (2004)

utilizaram a MAX apenas para detectar a distribuição do silício na superfície da folha associada com a redução da cercosporiose do cafeeiro.

A cultivar Mundo Novo quando inoculada com o isolado CML 2987 (CN) que proporcionou maior AACPSD apresentou maior quantidade de Ca nos tecidos. Possivelmente, devido o fungo *Cercospora* ser necrotrófico e produzir a cercosporina que atua na membrana plasmática da célula do hospedeiro, promovendo a ruptura da mesma, há maior acúmulo de cálcio nos tecidos dessa cultivar. Da mesma forma, Belan et al. (2015) também observaram maior quantidade de cálcio em tecidos necróticos de cafeeiros infectados com *C. coffeicola*, em relação aos tecidos assintomáticos. De acordo com Taiz e Zeiger (2006), a maior concentração de cálcio em tecidos necróticos é devido à ruptura da membrana e ao deslocamento do cálcio do vacúolo para o citoplasma, afim de atuar como mensageiro secundário, controlando os processos de transcrição das células e reações de defesa das plantas. O nível de cálcio citosólico aumenta em resposta ao reconhecimento da planta a elicitores, raça específica de patógenos ou mecanismos de ataque (Grant e Mansfield 1999; Reddy e Reddy 2002).

Conforme demonstrado no presente estudo, o isolado CML 2986 (CC) quando inoculado na cultivar Iapar 59 apresentou menor PI e maior AACPSD e, conseqüentemente, o aparecimento das lesões necróticas durante o processo de colonização e infecção do mesmo poder ter aumentado a permeabilidade das membranas e, conseqüentemente, maior concentração de potássio nos tecidos foliares (King et al. 2011; Choi et al. 2013). O potássio encontrado no tecido necrótico pode estar envolvido nas reações de defesa das plantas, osmorregulação, síntese de carboidratos e proteínas e transporte de outros nutrientes por meio da membrana (Taiz e Zeiger 2006; Amtmann et al. 2008; Marschner e Marschner 2012).

Alto teor de magnésio foi encontrado quando o isolado CML 2990(CN) foi inoculado na cultivar Mundo Novo, possivelmente, devido esse isolado

apresentar menor AACPSD e, conseqüentemente, menor degradação de clorofila. O íon magnésio ( $Mg^{+2}$ ) ativa enzimas que catalisam processos como respiração, síntese de DNA e RNA e parte do anel aromático da molécula de clorofila e da lamela média (Taiz e Zeiger 2006). Esse nutriente também influencia na suscetibilidade ou resistência a fitopatógenos (Huber e Graham 1999, Huber et al. 2012).

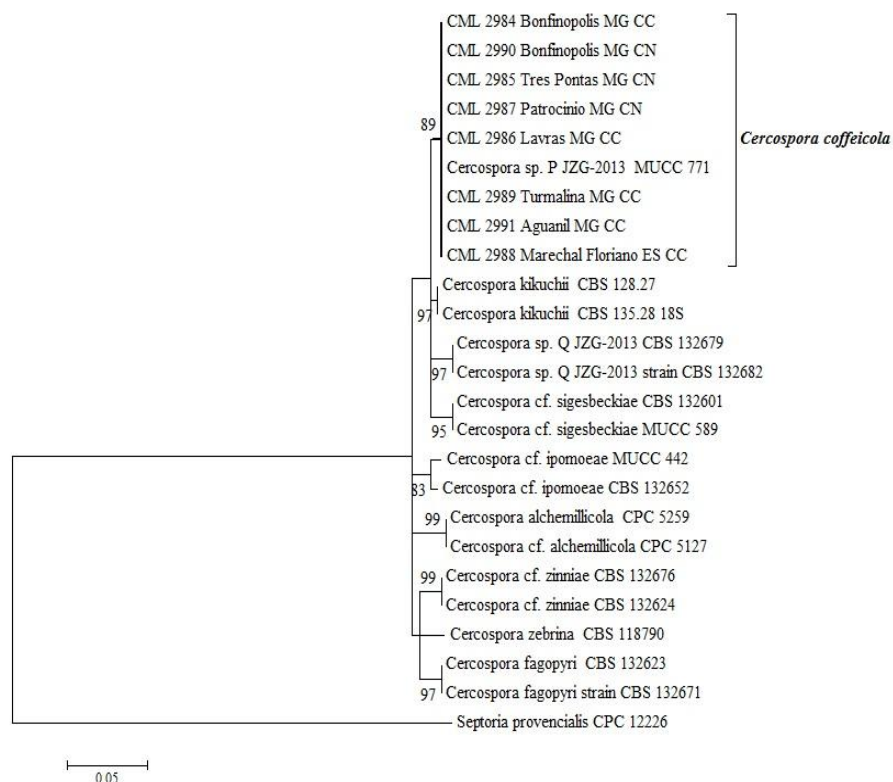
Com relação ao fósforo, a cultivar Mundo Novo apresentou maior quantidade desse nutriente quando inoculada com a maioria dos isolados em estudo. O fósforo contribui para reduzir a incidência e a severidade das doenças que podem alterar a qualidade e a produtividade de diversas culturas (Better Crops 1999). O potássio e o fósforo auxiliam na redução da mancha púrpura e mancha cinzenta (*Cercospora kikuchii* e *Cercospora zea maydis*) em sementes de soja e milho, respectivamente. Em geral, os nutrientes podem afetar a suscetibilidade das plantas a doenças por influenciar nas atividades metabólicas. E o patógeno, ao infectar, pode alterar a fisiologia das plantas com relação à absorção de nutrientes, assimilação, translocação e utilização (Spann e Schumann 2013).

Não foram encontradas características comuns para os grupos de isolados de *Cercospora coffeicola* provenientes de lesões do tipo olho pardo e do tipo negra, quanto à manifestação de sintomas após inoculação artificial, à produção de cercosporina, à distribuição de nutrientes em tecidos foliares e às análises filogenéticas.

### **Agradecimentos**

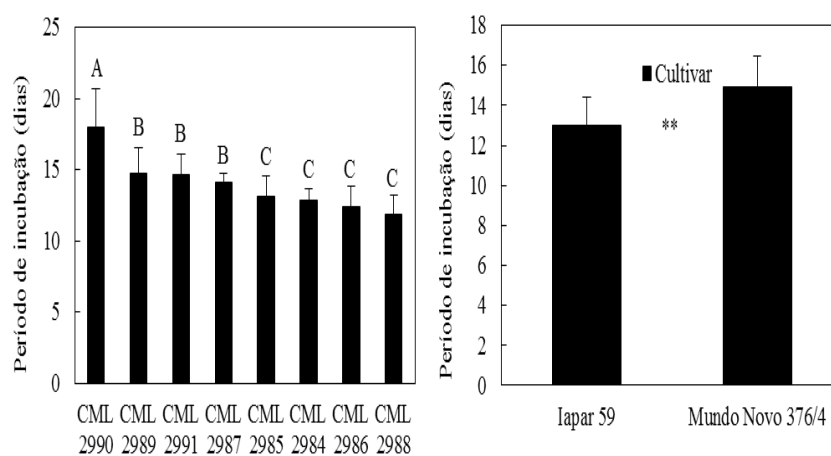
Agradecemos o apoio financeiro e bolsas de estudo fornecidas por instituições de fomento e estimuladoras de pesquisa: CNPq, CAPES, FAPEMIG, INCT-CAFÉ e UFLA.

## Figuras

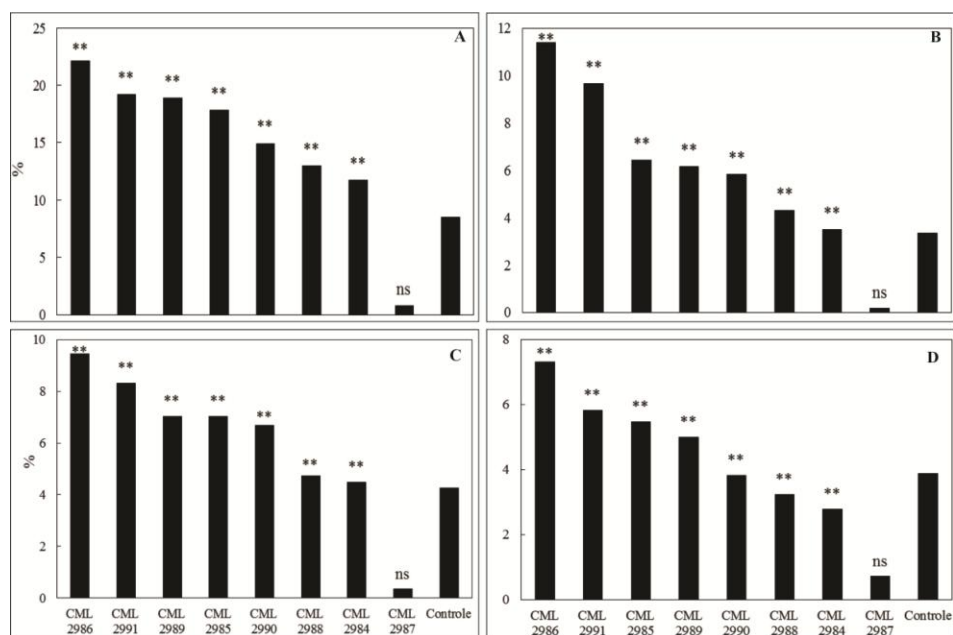


**Fig. 1** Árvore filogenética (*maximum likelihood parcial deletion*) mostrando as relações entre os isolados de *Cercospora coffeicola* estudados no presente trabalho [CML 2984 (Bonfinópolis MG), CML 2985 (Três Pontas MG), CML 2986 (Lavras MG), CML 2987 (Patrocínio MG), CML 2988 (Marechal Floriano ES), CML 2989 (Turmalina MG), CML 2990 (Bonfinópolis MG) e CML 2991 (Aguanil MG) em comparação com outras espécies de *Cercospora* da literatura, baseada nas sequências da região fator de alongação (EF -1 $\alpha$ ) e actina (ACT) do rDNA. *Septoria provencialis* foi utilizado como *outgroup*. (CC) isolados provenientes de lesões com sintomas de cercosporiose do tipo olho pardo (comum) e (CN) isolados provenientes de lesões com sintomas de cercosporiose do tipo negra.

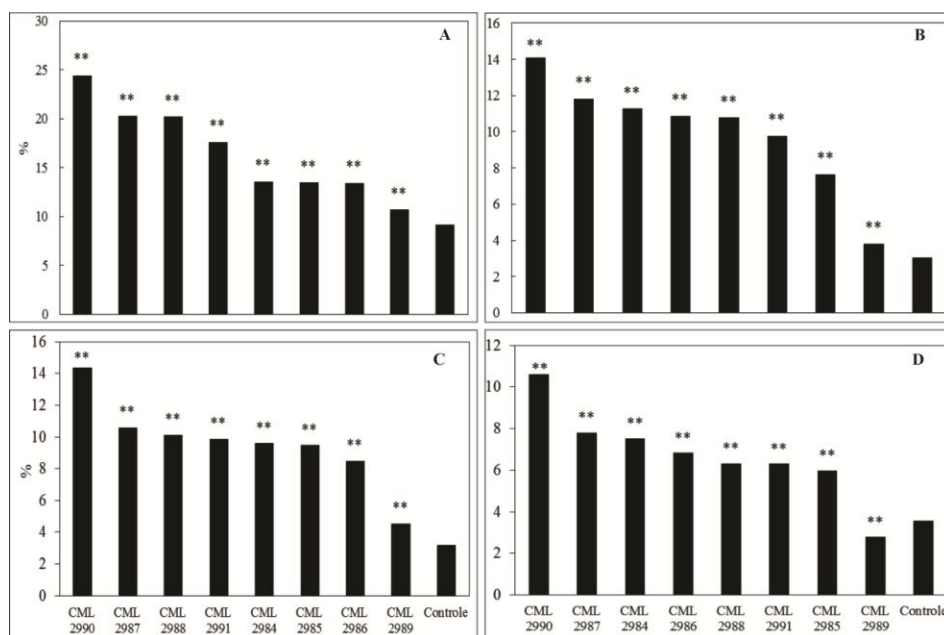




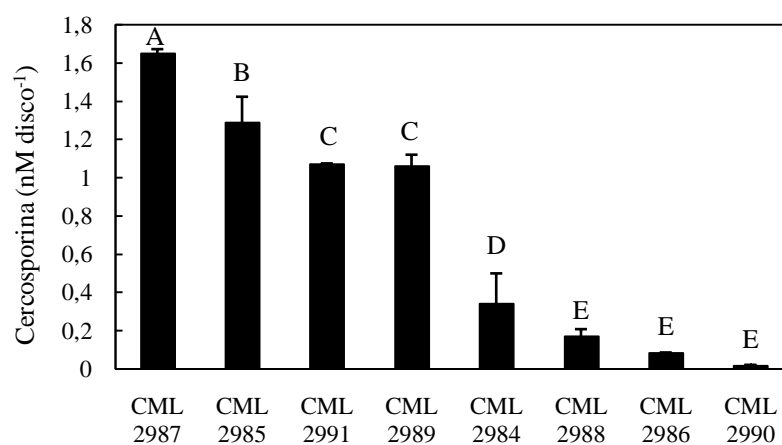
**Fig. 2** Período de incubação (PI) para os isolados de *Cercospora coffeicola* (CML 2984 – CML 2991) (A) em cultivares de cafeeiro (B): Iapar 59 e Mundo Novo 376/4. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ). \*\* significativo 0,05 pelo teste t.



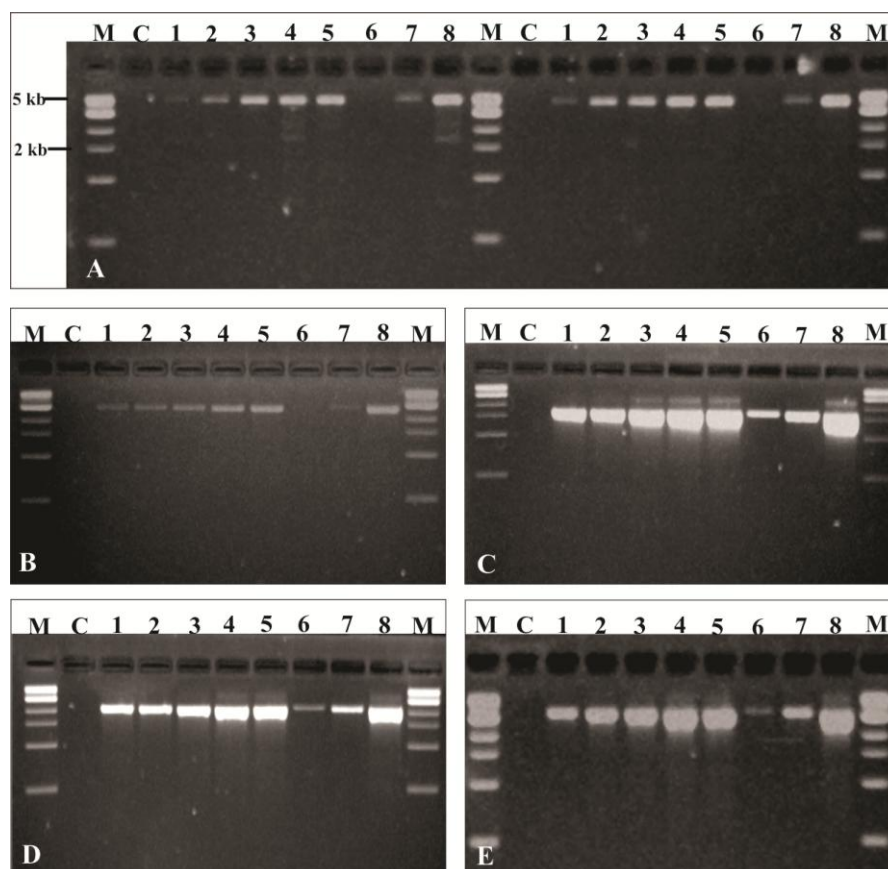
**Fig.3** Representação dos valores médios da distribuição dos nutrientes: cálcio (A), potássio (B), magnésio (C) e fósforo (D) em folhas de cafeeiro cultivar Iapar 59 inoculadas com isolados (CML 2984 – CML 2991) de *Cercospora coffeicola* em comparação com folhas de cafeeiro saudáveis (controle). Não-significativo (ns) ou (\*\*\*) significativamente diferente do controle, pelo teste de Dunnett a 5% de significância.



**Fig. 4** Representação dos valores médios da distribuição dos nutrientes: cálcio (A), potássio (B), magnésio (C) e fósforo (D) em folhas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4 inoculadas com os isolados (CML 2984 – CML 2991) de *Cercospora coffeicola* em comparação com folhas de cafeeiro sadias (controle). Não-significativo (ns) ou (\*\*\*) significativamente diferente do controle, pelo teste de Dunnett a 5% de significância.



**Fig.5** Isolados de *Cercospora coffeicola* (CML 2984 - CML 2991) crescidos em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a 25°C e avaliados com relação a produção de cercosporina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).



**Fig.6** Genes envolvidos na produção da toxina cercosporina de isolados de *Cercospora coffeicola*. M: marcador 1 kb; C: controle; 1: isolado CML 2984; 2: isolado CML 2986; 3: isolado CML 2988; 4: isolado CML 2991; 5: isolado CML 2989; 6: isolado CML 2985; 7: isolado CML 2990; 8: isolado CML 2987. (A) gene *Cercosporin Toxin Biosynthesis* (CTB1) (5,0 e 4,2 kb), (B) geneCTB3 (2,6 kb), (C) gene CTB6 (1,7 kb), (D) gene CTB8 (2,2 kb) e (E) gene *Cercosporin Facilitator Protein* (CPF) (3,2 kb).

## Referências

- Almeida AMR, Piuga FF, Marin SRR, Binneck E, Sartori F, Costamilan LM, Teixeira MRO, Lopes M. (2005) Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatol Bras* 30:594–602.
- Amtmann A, Troufflard S, Armengaud P. (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* 133:682–691.
- Bakhshi M, Arzanlou M, Babai-Ahari A, Groenewald JZ., Braun U, Crous PW. (2015). Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. *Persoonia* 34:65-86.
- Belan LL, Pozza EA, Freitas MLO, Pozza AAA, Abreu MSA, Alves E. (2015). Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. *Australas Plant Pathol* 44:105-111.
- Better Crops (1999) *Phosphorus Nutrition Improves Plant Disease Resistance*. vol. 83. pp. 26-27.
- Callahan T, Rose M, Meade M, Ehrenshaft M, Upchurch R. (1999) CFP, the putative cercosporin transporter of *Cercosporina kikuchii*, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. *M Plant-Microbe Inter* 12:901-910.
- Chen H, Lee MH, Daub ME, Chung KR. (2007). Molecular analysis of the cercosporin biosynthetic gene cluster in *Cercospora nicotianae*. *Molecular Microbiology* 64:755-770.
- Choi J, Kim K-T, Jeon J, Lee, Y-H. (2013). Fungal plant cell wall degrading enzyme database: a platform for comparative and evolutionary genomics in fungi and Oomycetes. *BMC Genomics* 14:1–10.
- Choquer M, Dekkers KL, Chen H, Cao L, Ueng PP, Daub ME, Chung K. (2005). The CTB1 gene encoding a fungal polyketide synthase is required

- for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18:468–476.
- Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira café: safra 2014. Disponível em: <<http://conab.gov.br>> Acesso em: 26 abril 2015.
- Crous PW, Braun U. (2003) *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passarola*. Centraal bureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
- Custódio AAP, Pozza EA, Guimarães SSC, Koshikumo ESM, Hoyos JMA, Souza PE. (2011). Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. *Cienc. agrotec.* 35:1067-1076.
- Dell' Acqua R, Mantovani ES, Braghini MT, Oliveira CMG, Harakava R, Robaina AS, Petek MR, Patricio FRA. (2011) Variabilidade *in vitro*, *in vivo* e molecular de isolados de *Cercospora coffeicola*. *Tropical Plant Pathology* 36:313-326.
- Godoy CV, Bergamin Filho A, Salgado CL. *Doenças do cafeeiro*. In *Manual de Fitopatologia, Doenças das plantas cultivadas*. v.2, 3<sup>rd</sup> Ed., pp. 184–200. Eds Kimati H., Amorim L., Bergamin AF, Camargo LEA, Rezende JAM. SP, Brasil: Editora Agronômica Ceres, 1997.
- Grant M, Mansfield J (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 2(4):312–319.
- Groenewald JZ, Nakashima C, Nishikawa J, Shin HD, Park JH, Jama AN, Groenewald M, Braun U, Crous PW. (2013) Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75:115-170.
- Hepperle D.(2004) SeqAssem<sup>®</sup>. *A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences*. Win32-Version. Distributed by the author via: <http://www.sequentix.de>.

- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W, Deising, HB. (2011) When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168:51-62.
- Huber DM, Graham RD. (1999) *The role of nutrition in crop resistance and tolerance to diseases*. In: Rengel Z (Ed.) Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications. The Haworth Press, London, pp. 169–204.
- Huber DM, Jones JB. (2012). The role of magnesium in plant disease. *Plant Soil* 368:73-85.
- Jenns AE, Daub ME, Upchurch RG. (1989) Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79:213–219.
- Júnior DG, Pozza EA, Pozza AA, Souza PE, Carvalho JG, Balieiro AC. (2003). Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. *Fitopatol Bras* 28:286–291.
- King BC, Waxman KD, Nenni NV, Walker LP, Bergstrom GC, Gibson DM. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for Biofuels* 4:1-14.
- Matiello JB, Almeida SR. (2013) *Cercospora negra associada à deficiência de fósforo em cafeeiros*. Procafé online. Available in: <<http://www.fundacaoprocafe.com.br>>. Accessed in: 29 julho 2014.
- Marschner H, Marschner P. (2012) *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. vol. 89. Academic press.
- Martins RB, Maffia LA, Mizubuti ESG. (2008) Genetic variability of *Cercospora coffeicola* from organic and conventional coffee plantings, characterized by vegetative compatibility. *Phytopathology* 98:1205–1211.



- Nelson SC. *Cercospora Leaf Spot and Berry Blotch of Coffee*. Cooperative Extension Service, 2008, pp. 41.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceed. of the National Academy of Sciences of the US of America* 95:2044–2049.
- Patricio FRA, Braghini MT, Fazuoli LC. (2010) Resistência de plantas de *Coffea arabica*, *C. canephora* e híbridos interespecíficos à cercosporiose. *Bragantia* 69(4): 883-890.
- Pimentel-Gomes, F. *Curso de estatística experimental*. 15. Ed. Piracicaba: Fealq, 2009. 451 p.
- Pozza AAA, Prietomartinez HE, Caixeta SL, Cardoso AA, Zambolim L, Pozza EA. (2001) Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 36(1): 53–60.
- Pozza AAA, Alves E, Pozza EA, Carvalho JG, Montanari M, Guimarães PTG, Santos DM. (2004) Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. *Fitopatol Bras* 29:185–188.
- Pozza EA, Carvalho LV, Chalfoun SM. *Sintomase injúrias causadas por doenças em cafeeiro*. In: Guimarães RJ, Mendes ANG, Baliza DP. (Ed.). *Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas*. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.
- Reddy ASN, Reddy V. (2002). *Calcium as a messenger in stress signal transduction*. *Handbook of Plant and Crop Physiology*:697–732.
- Shaner G, Finney RF. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056.

- Souza AGC, Rodrigues FA, Maffia LA, Mizubuti ESG. (2011) Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. *Journal of Phytopathology* 159:6-11.
- Souza AGC, Maffia LA, Mizubuti ESG. (2012). Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. *Journal of Phytopathology* 160:540-546.
- Spann TM, Schumann AW. (2013). *Mineral Nutrition Contributes to Plant Disease and Pest Resistance*. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em 10 jan. 2015.
- Taiz L, Zeiger E. (2006). *Fisiologia vegetal*, vol. 10. Universitat Jaume I.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28:2731–2739.
- Thompson JD, Hiqqins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 11:4673-4680.

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

**ARTIGO 2 Absence of greenhouse reproducibility of two distinct field lesions of cercospora leaf spot and the induction of defense responses in coffee leaves**

Camila C. L. Andrade; Sandra M. Mathioni; Silvino I. Moreira; Deila M. S. Botelho; Josineide R. Costa; Ana C. M. Andrade; Eduardo Alves; Mário Lúcio V. de Resende

C. C. L. Andrade, D. M. S. Botelho, J. R. Costa, A. C. M. Andrade, E. Alves, M. L. V. de Resende – Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

S. I. Moreira – Department of Microbiology, Federal University of Lavras (UFLA), CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

S. M. Mathioni – Department of Plant and Soil Sciences, University of Delaware, 19711, Newark, USA.

Author for correspondence: Sandra M. Mathioni, e-mail: mathioni@udel.edu, 1-302-831-3406, Fax: 1-302-831-4841.

***Acknowledgements***

*The scholarship to C.C.L. Andrade was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to thank Fabiano J. Perina, Cláudia Labory, and Glauco Teixeira for technical assistance. This work was supported by grants from CAPES, CNPq, INCT-Café, and FAPEMIG.*

Preparado em concordância com as normas do periódico

**“European Journal of Pathology”**

(Versão preliminar – submetido)

**Abstract**

Cercospora leaf spot, an important disease in coffee and caused by the fungus *Cercospora coffeicola*, can appear as two distinct lesions on leaves, which are the 'common' and the 'black' brown eyespot, in field conditions. However, it was unknown whether these two distinct lesions could be obtained when plants are inoculated under greenhouse conditions and whether the *C. coffeicola* strains causing the distinct lesions would induce defense-related genes in a similar pattern. Thus, this work was performed to address these questions. *C. coffeicola* strains were isolated from diseased leaves collected from coffee fields. Pure cultures were obtained by single spore isolation and then coffee leaves were inoculated with each of the two strains under specific greenhouse conditions. Leaf samples were collected from a time-course experiment and the disease progression was analyzed using microscopy. The plant defense response was analyzed using qRT-PCR of defense-related genes. Both strains showed very similar germination, colonization, and sporulation patterns in the coffee leaves. Disease was only observed when the strains were inoculated on the abaxial, but not when inoculated on the adaxial leaf surface. Interestingly, the two strains produced lesions of the common type for the conditions used. The expression analysis showed that both strains were able to induce defense-related genes in a similar manner although with a different timing. Based on the results, there might be other factors leading to the black lesion type of Cercospora leaf spot on coffee leaves in field conditions and further investigation is needed.

**Keywords:** *Cercospora coffeicola*, *Coffea arabica* L., brown eyespot, qRT-PCR, scanning electron microscopy.

## Introduction

Coffee (*Coffea arabica* L.) is an important worldwide commodity and is largely cultivated in Brazil. The increase in production cost by controlling diseases affecting the crop is among the challenges faced by coffee farmers. The two most important fungal diseases in coffee are the coffee rust, caused by *Hemileia vastatrix*, and the cercospora leaf spot, caused by *Cercospora coffeicola*. The latter can cause losses of up to 30% and thus affect yield (Carvalho and Chalfoun 2001; Lima et al. 2012). Variation in symptoms can be observed in field conditions and be a confounding factor during the disease identification and its control. The typical symptoms caused by *C. coffeicola* on coffee leaves are small necrotic spots consisting of a light-colored center and sometimes surrounded by a purplish brown ring with yellowish edges, which gives the second name that the disease is known for as common brown eyespot (common BE). The atypical symptom was designated as cercospora leaf spot type black or black brown eyespot (black BE), as the lesions were black and larger than typical and were reminiscent of leaf blight (Nelson, 2008; Matiello and Almeida 2013).

The information about the infection process of *C. coffeicola* on coffee leaves is limited, especially with regard to the difference in lesion type caused by the common BE and black BE isolates in field conditions. *C. coffeicola* uses a necrotrophic colonization strategy to obtain nutrients, and it kills the host by producing toxins and reactive oxygen species (Daub et al. 2013). Several *Cercospora* species are considered hemibiotrophs due to the long latent period (period from initial infection to sporulation) and switching to a necrotrophic phase thereafter. Although Souza et al. (2011) have studied the infection process and the variability of isolates of *C. coffeicola* in coffee plants cv. Catuaí, the details on the infection process and variability of symptoms on the common BE and the black BE are still unknown.

Conidia of the genus *Cercospora* exhibit wide variation in the mode of germination, penetration, and sporulation on different hosts. In *C. moricola* and *C. caricis* that infect mulberry and cassava, respectively, penetration may occur through the stomata (Gupta et al. 1995; Carlos et al. 1998), while *C. arachidicola* penetrates directly through epidermal cells in peanut leaves (Smith et al. 1992). Conidia of *C. moricola* develop many germ tubes, whereas, conidia of *C. henningsii* fragment into numerous microconidia, and each one germinates a germ tube that may or may not produce an appressorium, structure which can directly penetrate the epidermal cells using turgor pressure (Gupta et al. 1995; Ayesu-Offei and Antwi-Boasiako 1996; Babu et al. 2009).

The molecular responses associated with coffee and the coffee rust pathogen, *H. vastatrix*, were well studied and allowed the identification of differentially expressed genes during early stages of the biotrophic interaction (Fernandez et al. 2004; Ganesh et al. 2006; Petitot et al. 2008). Besides the available information on the expression of defense-related genes during the infection of *Cercospora* species, such as *C. kikichii* in soybean (Upchurch and Ramirez 2010), it is unknown whether the coffee plant responds in a different way to *C. coffeicola* strains causing the two distinct brown eyespot symptoms, the common BE and the black BE.

Thus, the goals of this study were 1) to assess the reproducibility of lesion type of the typical brown eyespot ‘common BE’ and the atypical brown eyespot ‘black BE’ disease in greenhouse conditions and 2) to investigate whether the defense response in coffee leaves is similarly induced by the two *C. coffeicola* strains isolated from the typical brown eyespot ‘common BE’ and the atypical brown eyespot ‘black BE’ symptoms. To this end, controlled inoculations were performed in greenhouse followed by microscopy and quantitative RT-PCR to address goals 1 and 2, respectively.

## **Materials and Methods**

### **Plant Material and Growth Conditions**

Six-month-old *Coffea arabica* seedlings from cultivar “Mundo Novo 376/4”, susceptible to *C. coffeicola*, were used in all experiments. Plants were grown under controlled temperature ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12 hours photoperiod.

### **Fungal isolates and inoculum preparation**

Two *C. coffeicola* strains were used in this study. Strain CML 2984 and CML 2985 were selected from a collection of strains previously isolated from coffee leaves collected from various locations in Brazil. Strain CML 2984 was isolated from a common brown eyespot (common BE) lesion from a coffee field located in Bonfinópolis, Minas Gerais, Brazil, and is going to be referred to as common BE from now on; strain CML 2985 was isolated from a black type brown eyespot (black BE) from leaf and collected from a coffee field in Três Pontas, Minas Gerais, Brazil, and is going to be referred to as black BE from now on. The distance between the two coffee fields from where the strains were collected is approximately 700 km.

The induction of *in vitro* sporulation of *C. coffeicola* was performed by following the method developed by Souza et al. (2011). Briefly, six disks (5 mm in diameter) were removed from the border of the medium containing the mycelial growth and transferred to a 25 mL flask containing 10 mL of V8 medium (10% tomato juice V8). They were kept in a shaker at  $25^\circ\text{C}$  with 110 rpm for four days. Then, the fungal growth of each flask was poured into Petri dishes containing 1.5% water agar medium. These plates were kept open in an incubator at 40 cm from the light bulbs with 12 hours photoperiod and  $25^\circ\text{C}$ . This dehydration process is used for the induction of sporulation in *C. coffeicola* (Souza et al. 2011). After five days, an aliquot of 10 mL of distilled water was

added to each Petri dish and the colony was scraped with a glass rod, and the spore suspension was filtered through cheesecloth.

### **Plant inoculation for microscopy analysis**

An aliquot of 20  $\mu\text{L}$  from an  $8 \times 10^4$  conidia/mL suspension was inoculated on the leaves. The youngest pair of leaves (at the top of the plant) were collected from six-month old plants and used for performing this experiment, which was repeated twice. Each isolate was inoculated on the abaxial surface of 32 detached leaves, which were kept on a tray with wet cotton balls on the leaf petiole. The same number of leaves (32) was inoculated for each isolate on the adaxial surface. Then, segments of the inoculated region of four leaves for each time-point (4, 6, 8, 24, 36, and 48 hours post inoculation, hpi) was prepared, imaged and analyzed as described next. For the 22 days post inoculation (dpi) time-point, the plants were kept horizontally during the inoculation of the droplets, kept in a humidity chamber and after 48 hours were transferred to the greenhouse and kept at 25°C. Detached leaves and plants were inoculated with water only (mock inoculated) and were used as control for each time-point.

A total of 10 segments from the inoculated region of leaves were prepared for each time-point. Samples were fixed for 24 hours in a modified Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde, 2.5% formaldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer pH 7.2, and 0.001 M  $\text{CaCl}_2$ ). Then, samples were dehydrated in an ethanol series (30%, 50%, 75%, 90%, and 95% for 10 min each, then three times in 100% for 10 min) and critical point dried in  $\text{CO}_2$  (Baltec, model CPD 030; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Specimens were mounted on aluminum stubs, sputter coated with gold (Balzers SCD 050), and then examined on a Scanning Electron Microscope (SEM, model EVO 040, Carl Zeiss, Germany) operating at 20 kV and with 8.5 mm working distance. For each treatment, one stub with four specimens was examined by



SEM. Images were processed using the software Corel Draw X7. For the 22 dpi time-point, after being fixed with the modified Karnovsky solution described above, samples were infiltrated with a cryo-protectant solution (30% glycerol in water) for 30 min and cross-sectioned with a scalpel blade after being immersed in liquid nitrogen. The penetration and colonization was investigated on the abaxial surface after cuticle was removed following the method described by Magnani et al. (2007) for the 24, 36, and 48 hpi time-points.

### **Plant inoculation for gene expression analysis**

In the experiment for gene expression analysis, whole plants (six-month old) were sprayed with 15 mL of a conidial suspension on the abaxial surface using a DeVilbiss sprayer. Plants were sprayed with either common BE, black BE, or water (mock inoculated used as control). After the inoculation, plants were placed in containers to keep high humidity and were kept at  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Then, those plants were removed from the containers and kept in the greenhouse, with at  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  and 12 hours photoperiod. The youngest pair of inoculated leaves were collected at 12, 24, 36, and 48 hpi. Leaves from three plants per treatment were collected and pooled for RNA extraction. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **RNA extraction and cDNA synthesis**

Pestle and mortar were frozen with liquid nitrogen and samples were ground to a fine powder. The total RNA extraction using 40 mg of homogenized ground material was performed with the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA integrity and concentration was assessed by 1.5% agarose gel electrophoresis and NanoDrop<sup>TM</sup> spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, New Hampshire, USA), respectively. Gels were stained with GelRed<sup>TM</sup> and visualized under UV

light using a gel imaging system (Alphamager HP Imaging System). Total RNA (350 ng) was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, California, USA).

### **Primer design and quantitative RT-PCR**

The sequences for the genes of interest were obtained from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the primers were designed using the IDT Primer Designer Tool. The sequences for the primers are listed in Table 1. Reactions were prepared with 1  $\mu$ L of diluted (1:5) cDNA, 0.4  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ L of SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), in a total volume of 10  $\mu$ L. The qRT-PCR amplification was performed as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C, and finally followed by the melting curve analyses. The reactions were carried out using the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and the SDS software v 1.3.1 (Applied Biosystems, California, USA) for analysis. All qRT-PCR reactions were repeated three times. Relative expression levels were determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen 2001) method, using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and 60S ribosomal protein L7 (RPL7) as endogenous controls (Barsalobres-Cavallari et al. 2009; Cruz et al. 2009; Diniz et al. 2012).

**Table 1** Oligonucleotide sequence for the qRT-PCR primers used in this study

Gene	Primer Sequence (5' – 3')	NCBI Accession Number	Amplicon Length (bp)
CaWRKY1-For	GTAAGGTCTAGTGTGGCTGTTG	CO773974	115
CaWRKY1-Rev	GTGCCGATGGACTGATGAAT		
CaPR1b-For	CAAACCCATGCGATTGATGTAA	DQ335594	130
CaPR1b-Rev	ATTCCAAGGCTCCTCTATATTAAGT		
CaRLK-For	GCTTCGACTCAACGATCTGATA	CF589181	130
CaRLK-Rev	CATGAACCCGCTCCAATCT		
CaGT-For	TGCCGCACAAGGACATATAA	CO773975	141
CaGT-Rev	ATGGTCTCCACTGCGATTG		
GAPDH-For	TTGAAGGGCGGTGCAAA	SGN-U619744	135
GAPDH-Rev	AACATGGGTGCATCCTTGCT		
RPL7-For	GACCTTGCCCATGAGATCCTGAC	SGN-U351477	137
RPL7-Rev	CCAGCATCGCCTCCTCAACATAG		

## Results

### Infection process of *C. coffeicola* common BE and black BE strains

Conidia from both strains, common BE (CML 2984) and black BE (CML 2985), started to germinate at 4 hours post inoculation (hpi) (Fig. 1A-D). The conidial germination on both the abaxial and adaxial leaf surfaces started at approximately the same time (4 hpi). Germination tubes were produced and no appressorium formation was observed as expected as *C. coffeicola* is known for not producing appressorium (Fig. 1A-D). On the abaxial leaf surface for the common BE isolate, the germination tubes germinated and elongated toward the stomatal opening (Fig. 1E and Fig 2A-B). The penetration through the stomata occurred at 6 hpi for both strains (Fig. 1F and Fig. 2E).

After removing the cuticle from the abaxial leaf surfaces and examining them by SEM, the colonization of both strains was observed in the substomatal chamber at 36 hpi (Fig. 2C-D, 2F). Intercellular growth was observed for both strains (Fig. 3A for common BE, and Fig. 3E for black BE) at 22 days post inoculation (dpi). Hyphae were also observed intracellularly in the spongy parenchyma for both strains (Fig. 3B for common BE, and Fig. 3F black BE) at

22 dpi. For both strains, no hyphal colonization was observed at the palisade and spongy parenchyma when the inoculation was performed on the adaxial leaf surface (Figs. 3C-D and Fig. 3I-J). Conidiophores emerged in groups (fascicle) through the stomata in the abaxial leaf surface for the 'common BE' strain (Figs. 3G, 3H). When the strains were inoculated on the abaxial surface, the first signs of the disease appeared at 7 dpi, however, only at 22 dpi the circular necrotic spots surrounded by chlorotic halos were observed. No difference on the lesions was observed when leaves were inoculated with either the common BE or black BE strains.

#### **Expression analysis of defense-related genes in coffee leaves challenged by *C. coffeicola* strains**

The expression level of common defense-related genes was accessed from coffee leaves challenged with the two *C. coffeicola* strains, the common BE and the black BE, by qRT-PCR. GAPDH and RPL7 genes were used as endogenous controls. All four tested genes (CaWRKY1, CaPR1b, CaRLK, and CaGT) showed differential expression when challenged with either of the isolates (common BE or black BE).

When coffee leaves were challenged with the common BE strain, the CaWRKY1 gene was induced at 36 hpi [using either RPL7 (Fig. 4) or GAPDH (Fig. 5) as endogenous controls]; the CaPR1b gene was induced at 12 hpi when using RPL7 as endogenous control, and its expression decreased as the time progressed (for the following three time-points), whereas when using the GAPDH control there was a slightly induction in expression at 48 hpi; no difference in expression between the time-points was observed for the CaRLK gene when using RPL7 as endogenous control, but induced expression was observed at 36 and 48 hpi when using GAPDH as endogenous control; for the

CaGT gene there was induced expression at 36 and 48 hpi when using RPL7 and GAPDH as controls, respectively.

When the coffee leaves were challenged with black BE strain, the CaWRKY1 gene was induced at 12 hpi [for both endogenous controls, RPL7 (Fig. 4) and GAPDH (Fig. 5)]; for the CaPR1b gene the induction in expression was observed at 48 hpi when using either endogenous controls; for the CaRLK gene, it was slightly induced at 12 hpi and decreased at 24 hpi, but there were no differences at 36 and 48 hpi when using the RPL7 control, however, this gene was highly induced at 36 and 48 hpi when using GAPDH as control (Fig. 5); for the CaGT gene, induced expression was observed at 12 hpi when using either endogenous control, RPL7 or GAPDH.

When comparing the two *C. coffeicola* strains, common BE and black BE, the results showed that both strains were able to induce the expression of defense-related genes in coffee leaves, however, there was variation in the timing of expression for each strain depending on the gene which was being analyzed and depending on the endogenous control used as well.

## **Discussion**

This study investigated the reproducibility in greenhouse conditions of two types of brown eyespot lesions occurring on coffee leaves in field conditions. We used *C. coffeicola* strains originally isolated from common brown eyespot (common BE) and black brown eyespot (black BE) lesions. We observed that the germination tubes of both strains branched in various directions on the leaf surface, however, on the abaxial surface they were directed to stomatal openings. The occurrence of several germination tubes and the directed growth toward stomata are typical characteristics of *Cercospora* species. Similar results of this tropism response towards stomata were also observed for other plant pathogens, for example *Pseudocercospora mori* in mulberry (Babu et al. 2002).

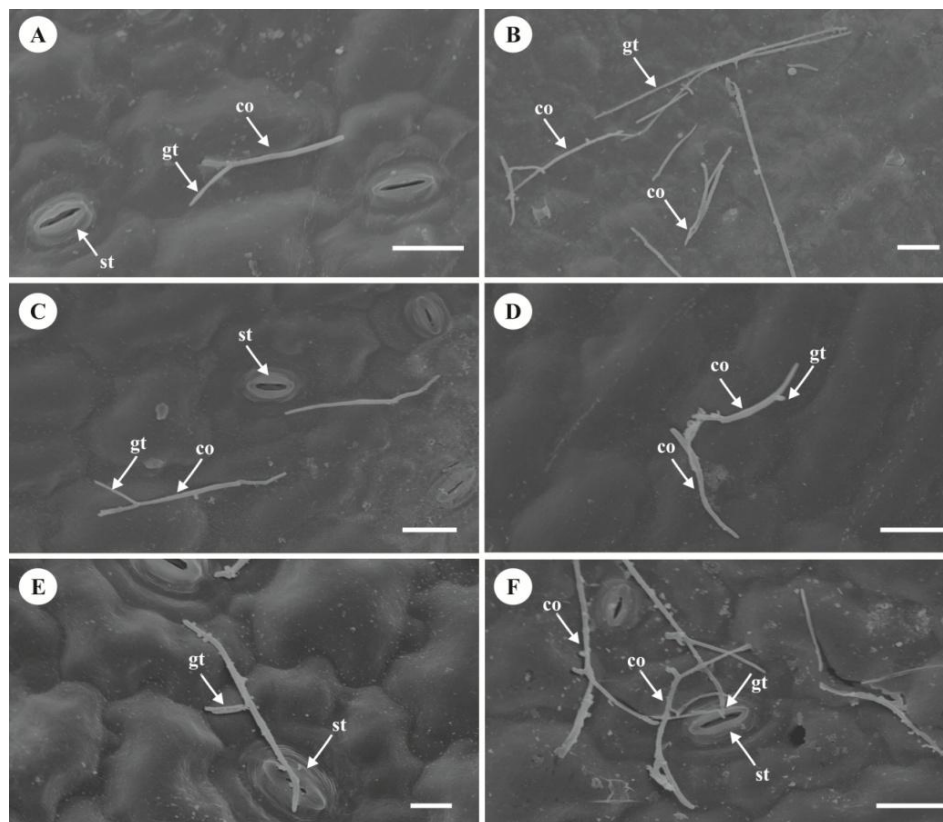
In the other hand, the germination tubes on the adaxial leaf surface showed random growth. No differences on germination, penetration, colonization, and lesion formation were observed between the two strains in the greenhouse experiments. Interestingly, all the lesions observed in the greenhouse were of the common BE type. These results indicate that the two strains induced the same lesion type (the common BE type) and it is very likely that there are other factors affecting and leading to the occurrence of the black BE spot lesion in field conditions. Indeed, Pozza et al. (2010) suggested that there is environmental effect (including plant nutrition, environmental temperature and humidity, and soil moisture) involved in the occurrence of the disease in field conditions. Also, there might be a cultivar by environment interaction as there is no complete resistance of coffee to *C. coffeicola* and a range of less to more susceptible cultivars are available and this may also influence the black BE disease outcome.

In this work, we also studied the expression of genes, which belong to four categories of defense-related genes known to be induced by pathogens in coffee leaves and in other plant-pathogen interactions (Ganesh et al. 2006; Ramiro et al. 2009). The genes included the WRKY 1 transcription factor (CaWRKY1), the DSS6 gene encoding a receptor-like kinase (CaRLK), the DSS22 gene encoding a salicylic acid-glucosyl transferase (CaGT), and the pathogenesis-related protein gene PR1 (CaPR1b). Our results showed that both *C. coffeicola* strains were able to induce the expression of the four genes in coffee leaves, however the timing of expression varied between the two strains. Based on this finding we can speculate that there are genetic differences between the two strains which are leading to the variation of defense response in the host, and thus additional studies on the genetic variability of the two groups of strains, causing common BE and black BE, need to be further addressed.

There are also other physiological characteristics of this fungal species that can influence the lesion formation, such as toxin production. *Cercospora* species are well known to produce the toxin cercosporin, a photosensitizing perylenequinone which reacts with molecular oxygen resulting in the production of reactive oxygen species, toxic and detrimental molecules for the host cells (Daub and Enreshaft 2000). The variability in cercosporin production of about 60 *C. coffeicola* strains was assessed previously and was observed that there is indeed a variation in cercosporin production among the strains analyzed that study (Souza et al. 2012). The two *C. coffeicola* strains used in this study are being currently investigated for the production of cercosporin and the level produced.

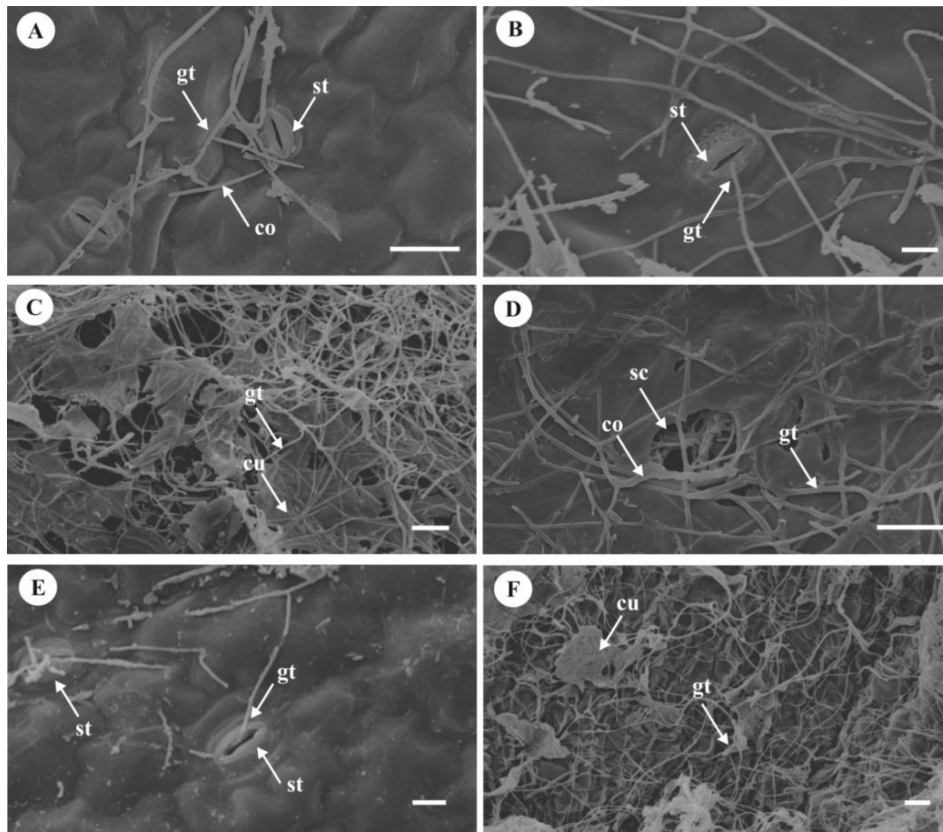
Overall, the findings of this work are very important when we take into account the climate changes that are currently affecting the coffee production around the world and mainly in South America (Jha et al. 2014). Climate change has effect on pathogen, on the disease development, and on the coffee production. The increase in rain leads to an increase in the coffee rust and in the use of coffee rust resistant cultivars, which are in turn more susceptible to the brown eyespot disease. With such drastic changes in the environment, the fungal species also undergo several rounds of genetic variability to evolve and counteract the host resistance, and thus more aggressive strains are likely to raise. Overall, there is a continuous need for research addressing questions such as the one raised in this work and also others that still need to be investigated, such as a genome-wide genetic variability of *C. coffeicola* strains causing distinct symptoms, i.e. lesions, and how this pathogen is evolving under environmental and host selective pressure.

### Figure legends

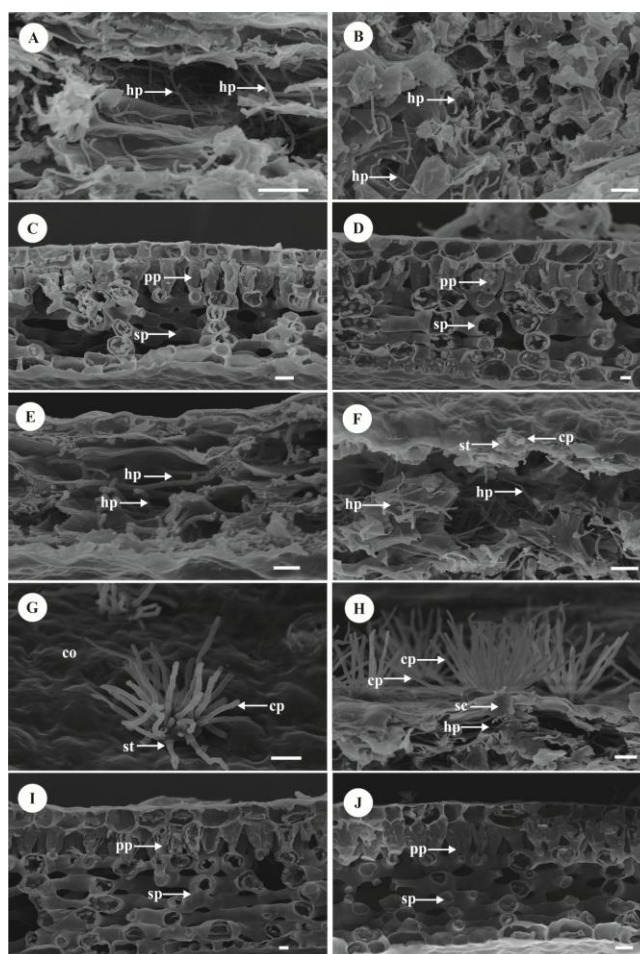


**Fig. 1** Scanning electron micrographs of coffee leaves inoculated with common BE and black BE *C. coffeicola* isolates. Germinated conidia of ‘common BE’ isolate on abaxial (A) and adaxial (B) leaf surfaces at 4 hours post inoculation (hpi), respectively. Germinated conidia of black BE isolate on the abaxial (C) and adaxial (D) leaf surfaces at 4 hpi, respectively. Germination tubes from common BE growing toward the stomatal opening (E) and penetration (F) through a stoma at 6 hpi. Abbreviation: co- conidium; gt- germ tube; st- stoma. Scale bars: (A, B, C, F) 20  $\mu\text{m}$  and (D, E) 10  $\mu\text{m}$ .

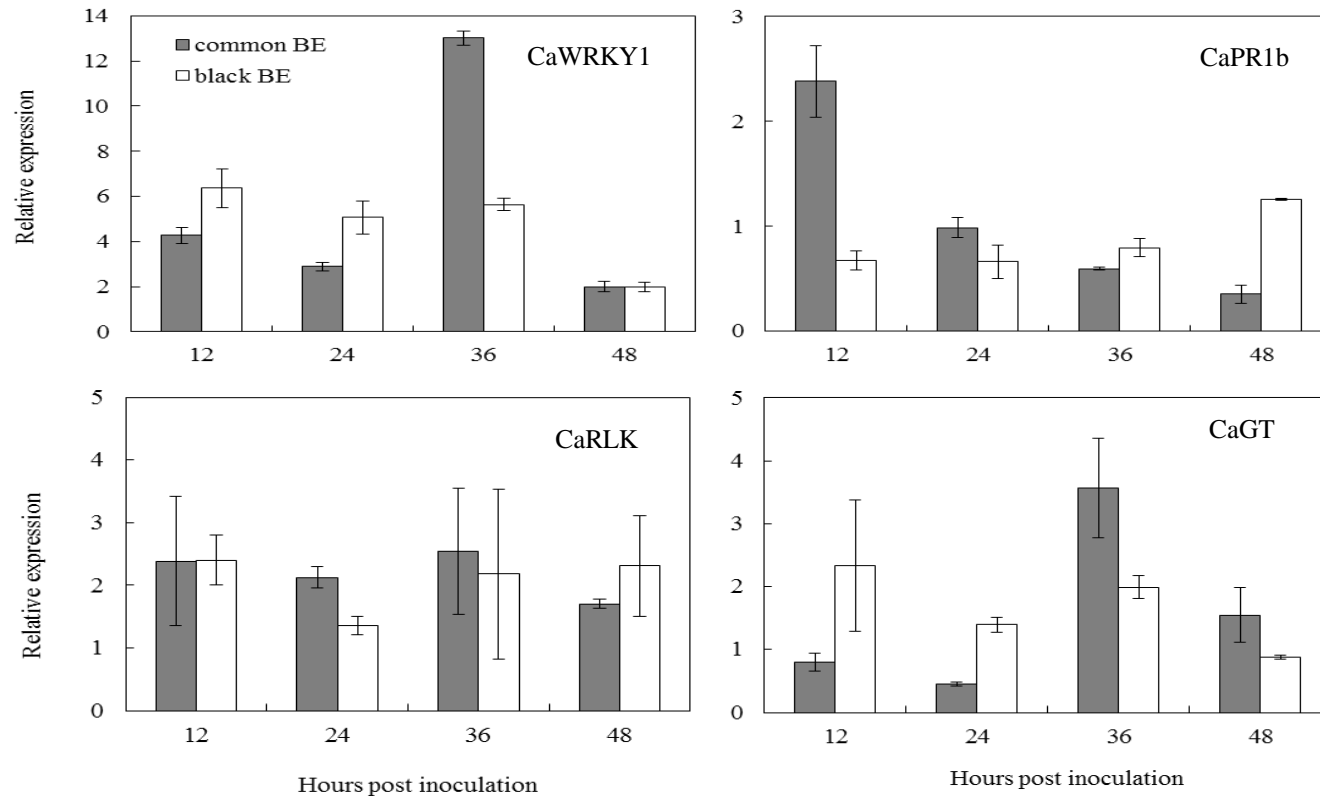




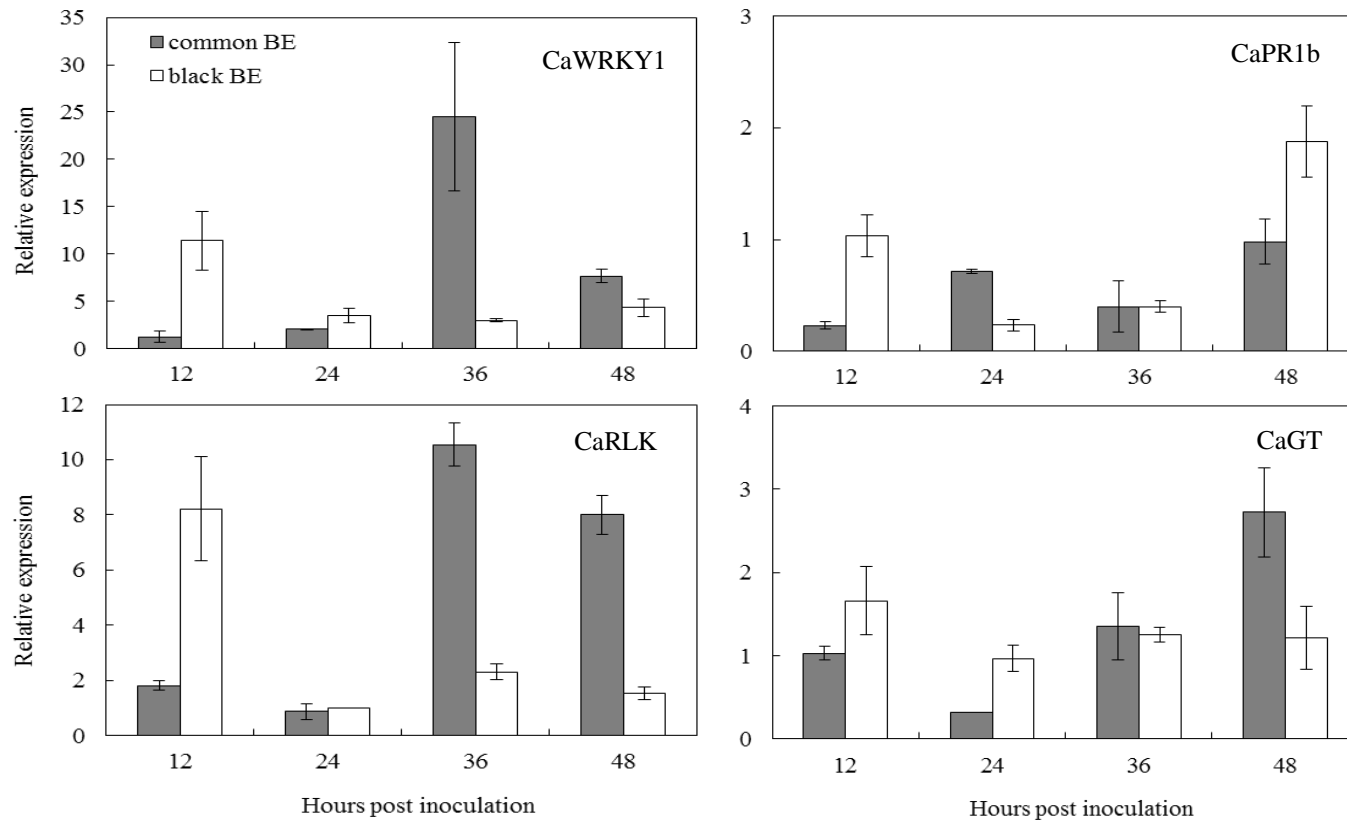
**Fig. 2** Scanning electron micrographs of coffee leaves inoculated with common BE and black BE *C. coffeicola* isolates. (A) Germ tubes from common BE isolate elongating toward and surrounding stomatal opening on the abaxial leaf surface at 8 hour after inoculation (hpi); (B) mycelial growth of common BE on the abaxial leaf surface at 24 hpi; (C-D) visible colonization of common BE isolate after cuticle was removed from the abaxial leaf surface at 36 hpi; (E) germ tube penetration of black BE isolate through a stoma at 6 hpi; (F) visible colonization of black BE after cuticle was removed from the abaxial leaf surface at 36 hpi. Abbreviation: co- conidium; gt- germ tube; st- stomata; sc- substomatal chamber; cu- cuticle. Scale bar: (A, B, C, D, E, G) 20  $\mu$ m and (F) 10  $\mu$ m.



**Fig. 3** Scanning electron micrographs of fractured coffee leaves inoculated with common BE and black BE *C. coffeicola* strains. Intercellular colonization of common BE (A) and black BE (E) isolates on substomatal chambers and adjacent tissues; intracellular colonization of common BE (B) and black BE (F) strains in substomatal chambers; no intercellular nor intracellular colonization was observed for both isolates, common BE (C and I) and ‘black BE’ (D and J) on the adaxial leaf surface at 36 hpi; (G) (H) hyphal growth of common BE isolate in the substomatal chamber from where the set of conidiophores (stroma) emerged at 22 dpi. Abbreviation: co- conidium; st- stoma; sc- substomatal chamber; cp- conidiophore; hp- hyphae; pp- palisade parenchyma, sp- spongy parenchyma. Scale bar: (A, B, C, D, F, H, J) 20  $\mu$ m and (E, G, I) 10  $\mu$ m.



**Fig. 4** Quantitative RT-PCR analysis of defense-related genes in coffee leaves upon *C. coffeicola* inoculation. Plants of cv. Mundo Novo 376/4 were inoculated with two *C. coffeicola* strains, one causing the common brown eyespot (common BE) and the other causing the black brown eyespot (black BE) lesion types. The RPL7 gene was used as endogenous control. Bars show the mean value  $\pm$  standard error.



**Fig. 5** Quantitative RT-PCR analysis of defense-related genes in coffee leaves upon *C. coffeicola* inoculation. Plants of cv. Mundo Novo 376/4 were inoculated with two *C. coffeicola* strains, one causing the common brown eyespot (common BE) and the other causing the black brown eyespot (black BE) lesion types. The GAPDH gene was used as endogenous control. Bars show the mean value  $\pm$  standard error.

## References

- Ayesu-Offei, E. N., & Antwi-Boasiako, C. (1996). 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*, 78, 653-657.
- Babu, A. M., Kumar, V., & Govindaiah (2002). Surface ultrastructural studies on the infection process of *Pseudocercospora mori* causing grey leaf spot disease in mulberry. *Mycological Research*, 106, 938-945.
- Babu, A. M., Philip, T., Kariappa, B., & Kamble, C. K. (2009). Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. *Journal of Phytopathology*, 157, 57-62.
- Barsalobres-Cavallari, C. F., Severino, F. E., Maluf, M. P., & Maia, I. G. (2009). Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, 10, 1-11.
- Carlos, B. N., Silveira, E. B. D., Mello, S. C. M. D., & Fontes, E. M. G. (1998). Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora caricis* on purple nutsedge. *Fitopatologia Brasileira*, 23, 169-172.
- Carvalho, V. L., & Chalfoun, S. M. *Cercospora: Doença do cafeeiro também chamada de "olho pardo" ou "olho de pomba"*. Lavras, Ed. UFLA, *Informe Tecnológico* 026, 2001.
- Cruz, F., Kalaoun, S., Nobile, P., Colombo, C., Almeida, J., Barros, L. M. G., et al. (2009). Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding*, 23, 607-616.
- Daub, M. E., & Ehrenshaft, M. (2000). The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 461-490.

- Daub, M. E., Herrero, S., & Chung, K. R. (2013). Reactive oxygen species in plant pathogenesis: the role of perylenequinone photosensitizers. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*, 970-989.
- Diniz, I, Talhinhos, P., Azinheira, H. G., Várzea, V., Medeira, C., Maia, I., et al. (2012). Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *European Journal Plant Pathology*, *133*, 141-157.
- Fernandez, D., Santos, P., Agostini, C., Bon, M. C., Petitot, A. S., Silva, M. C., et al. (2004). Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology*, *5*, 527-536.
- Ganesh, D., Petitot, A. S., Silva, M. C., Alary, R., Lecouls, A. C., & Fernandez, D. (2006). Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. *Plant Science*, *170*, 1045-1051.
- Gupta, V. P., Tewari, S. K., Govindaiah, B. A. K., & Datta, R. K. (1995). Observations on the surface ultrastructure of conidial stage of *Cercospora moricola* and its infection process in mulberry. *Sericologia*, *35*, 123-128.
- Jha, S., Bacon, C. M., Philpott, S. M., Mendez, V. E., Laderach, P., & Rice, R. A. (2014). Shade coffee: update on a disappearing refuge for biodiversity. *BioScience*, *64*, 416-428.
- Lima, L. M., Pozza, E. A., & Santos, F. S. (2012). Relationship between incidence of brown eyespot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. *Journal of Phytopathology*, *160*, 209-211.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method, *Methods*, *25*, 402-408.

- Magnani, E. B. Z., Alves, E., & Araújo, D. V. (2007). Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. *Fitopatologia Brasileira*, 32, 156-160.
- Matiello, J. B., & Almeida, S. R. (2013). Cercospora negra associada à deficiência de fósforo em cafeeiros. *Procafé online*. <http://fundacaoprocafe.com.br/downloads/Folha006Cercospora.pdf>. Accessed June 10 2015.
- Nelson, S. C. (2008). Cercospora Leaf Spot and Berry Blotch of Coffee. *Cooperative Extension Service*. pp. 41.
- Petitot, A. S., Lecouls, A. C., & Fernandez, D. (2008). Sub-genomic origin and regulation patterns of a duplicated WRKY gene in the allotetraploid species *Coffea arabica*. *Tree Genetics & Genomes*, 4, 379-390.
- Pozza, E. A., Carvalho, L. V., & Chalfoun, S. M. (2010). Sintomas e injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In Guimarães, R. J., Mendes, A. N. G., Baliza, D. P. (Ed.), *Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas* (pp. 67-106). Lavras: UFLA.
- Ramiro, P. A., Escoute, J., Petitot, A. S., Nicole, M., Maluf, M. P., & Fernandez, D. (2009) Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defense responses in resistant and susceptible coffee cultivars. *Plant Pathology*, 58, 944-955.
- Smith, D. H., Pauer, G. D. C., & Shokes, F. M. *Cercosporidium* and *Cercospora* leaf spots of peanut. In: Chaube, H. S.; Singh, U. S.; Mukhopadhyay, A.N.; Kumar, J. (Eds.). *Plant Diseases of International Importance*, 1992. p. 285-304. NJ, USA, Prentice Hall Inc.
- Souza, A. G. C., Rodrigues, F. A., Maffia, L. A., & Mizubuti, E. S. G. (2011). Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. *Journal of Phytopathology*, 159, 6-11.

- Souza, A. G. C., Maffia, L. A., & Mizubuti, E. S. G. (2012). Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. *Journal of Phytopathology*, *160*, 540-546.
- Upchurch, R. G., & Ramirez, M. E. (2010). Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *75*, 64-70.

**(VERSÃO PRELIMINAR)**



**ARTIGO 3 Alterations on antioxidant metabolism in coffee leaves  
infected by *Cercospora coffeicola***

**Alterações no metabolismo antioxidante de folhas de cafeeiro infectadas por  
*Cercospora coffeicola***

Camila Cristina Lage de Andrade<sup>1</sup>, Rayssa Pereira Vicentin<sup>2</sup>, Josineide Rodrigues Costa<sup>3</sup>, Fabiano José Perina<sup>4</sup>, Mário Lúcio Vilela de Resende<sup>1</sup>, Eduardo Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Phytopathology Department/DFP, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Biology Department, Microbiology/DBI, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of Lavras, Chemistry Department/DQI, Lavras, MG, Brazil

<sup>4</sup>Brazilian agricultural research agency, Embrapa Cotton, 58428-095, Campina Grande, PB, Brazil

Author for correspondence: Eduardo Alves, e-mail: ealves@dfp.ufla.br

Preparado em concordância com as normas do periódico “**Ciência Rural**”

(Versão preliminar – submetido)

## ABSTRACT

Brown eye spot (BE), caused by *Cercospora coffeicola*, is the main disease of coffee crop. A variation in symptoms of BE has been found in the field, raising suspicion of occurrence of new species. However, information about coffee-*C. coffeicola* interaction is still limited, this work aimed to determine the difference from antioxidant metabolism of coffee plants cultivar Mundo Novo inoculated with strain isolated from a common brown eye spot lesion (“common BE”) (CML 2984) and strain isolated from a black brown eye spot lesion (“black BE”) (CML 2985). The enzymes activities peroxidase (POX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) were determined. The activities of POX, APX, and PAL increased in inoculated plants with both strains compared with non-inoculated plants at 12 and 24 hours post inoculation (hpi). CAT activity increased in inoculated plants with black BE strain at 24 hpi and both strains at 48 hpi. The SOD activity only increased in inoculated plants with both strains at 48 hpi. These results show that a more efficient antioxidative system in the removal of excess of reactive oxygen species generated during the infection process with both strains of *C. coffeicola*. The both strains produced lesions of the common type, suggesting that other factors leading to the black BE lesion type in field conditions and further investigation is needed.

**Keywords:** *Coffea arabica* L., “common and black” brown eye spot, reactive oxygen species

## RESUMO

A cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola*, é uma das principais doenças que afetam o cafeeiro. Uma variação nos sintomas de cercosporiose foi encontrada no campo, levantando suspeitas da ocorrência de

uma nova espécie. Considerando que informações sobre a interação cafeeiro-*C. coffeicola* ainda são limitadas, objetivou-se, neste trabalho, determinar diferenças no metabolismo oxidativo de plantas de cafeeiro cultivar Mundo Novo inoculadas com isolado proveniente de sintomas de cercosporiose do tipo olho pardo (CML 2984) e isolado proveniente de sintomas de cercosporiose do tipo negra (CML 2985). Foram determinadas a atividade das enzimas peroxidase (POX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e fenilalanina amônia liase (PAL). As atividades das enzimas POX, APX e PAL aumentaram nas plantas inoculadas com ambos os isolados quando comparadas com as plantas não inoculadas as 12 e 24 horas após inoculação (hai). A atividade da CAT aumentou nas plantas inoculadas com o isolado que causa sintomas de cercosporiose do tipo negra as 24 hai e para ambos os isolados as 48 hai. Plantas inoculadas com ambos os isolados demonstraram aumento na atividade da SOD somente as 48 hai. Este estudo mostrou que o sistema antioxidante do cafeeiro foi eficiente na remoção das espécies reativas de oxigênio geradas durante o processo infeccioso com ambos os isolados de *C. coffeicola*. Ambos os isolados produziram lesões de cercosporiose do tipo comum, sugerindo que outros fatores que causam lesões de cercosporiose do tipo negra ainda necessitam ser investigados.

**Palavras chave:** *Coffea arabica* L., *Cercosporiose do tipo olho pardo*, *Cercosporiose do tipo negra*, *espécies reativas de oxigênio*.

## 1 INTRODUCTION

Brown eye spot (BE), caused by the fungus *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, is one of the main diseases of the coffee tree (*Coffea arabica* L.), being possible to reduce the productivity and quality of the beverage (POZZA et al., 2010). A variation in symptoms can be observed in field

conditions, generated several speculations and hypotheses, such as the possibility of having occurred genetic variations in the pathogen, different environmental conditions and nutritional (phosphorus deficiency, nitrogen and potassium) (NELSON, 2008; MATIELLO & ALMEIDA, 2013). The typical symptoms caused by *C. coffeicola* on coffee leaves are small necrotic spots consisting of a light-colored center and sometimes surrounded by a purplish brown ring with yellowish edges, which gives the second name that the disease is known for as common brown eye spot ('common BE'). The atypical symptom was designated as black brown eye spot ('black BE'), as the lesions were black and larger than typical and were reminiscent of leaf blight (MATIELLO & ALMEIDA, 2013). It is known *Cercospora* produces a toxin called cercosporin. This toxin in the presence of sunlight causes damage to the cellular membrane of the host, promoting lipid peroxidation, loss of electrolytes and formation of reactive oxygen species (ROS) (SHARMA et al., 2012; DAUB et al., 2013). Having the objective of minimizing the damage caused by this oxidative stress and removing the excess of ROS, the plants developed mechanisms of enzymatic and non-enzymatic defense (SCANDALIOS, 2005). Among the enzymatic, the peroxidase (POX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase enzymes (GPX) (SHARMA et al., 2012). Another important enzyme involved in the defense of plants is phenylalanine ammonia lyase (PAL).

Several works report changes in the defense system antioxidant of the plants in response to induced stress by biotic and abiotic agents (DEBONA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014; DOMICIANO et al., 2015). It is unknown whether the coffee plant responds in a different way to *C. coffeicola* strains causing the two distinct brown eye spot symptoms, the "common BE" and the "black BE". Considering the significant differences in the biochemical

response of the host, it can be useful as an indirect indicative of the existence of genetic variability among the strains that cause distinct symptoms. Considering this, the aim this work were investigated whether the alterations in the oxidant metabolism of coffee leaves is similarly induced by the two *C. coffeicola* strains from the typical brown eye spot ‘common BE’ and the atypical brown eye spot ‘black BE’ symptoms.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **Plant Material and Growth Conditions**

Six-month-old *Coffea arabica* seedlings from cultivar “Mundo Novo 376/4”, susceptible to *C. coffeicola*, were used in all experiments. Plants were grown under controlled temperature ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12 hours photoperiod.

### **Fungal strains and inoculum preparation**

Two *C. coffeicola* strains were used in this work. Strain CML 2984 and CML 2985 were selected from a collection of strains previously straind from coffee leaves collected from various locations in Brazil. Strain CML 2984 was isolated from a common brown eye spot (common BE) lesion from a coffee field located in Bonfinopolis, Minas Gerais, Brazil, and is going to be referred to as ‘common BE’ from now on; strain CML 2985 was isolated from a black type brown eye spot (black BE) from leaf and collected from a coffee field in Tres Pontas, Minas Gerais, Brazil, and is going to be referred to as ‘black BE’ from now on.

The induction of *in vitro* sporulation of *C. coffeicola* was performed by following the method developed by SOUZA et al. (2011). Briefly, six disks (5 mm in diameter) were removed from the border of the medium containing the mycelial growth and transferred to a 25 mL flask containing 10 mL of V8 medium (10% tomato juice V8). They were kept in a shaker at  $25^\circ\text{C}$  with 110

rpm for four days. Then, the fungal growth of each flask was poured into Petri dishes containing 1.5% water agar medium. These plates were kept open in an incubator at 40 cm from the light bulbs with 12 hours photoperiod and 25°C. This dehydration process is used for the induction of sporulation in *C. coffeicola* (SOUZA et al., 2011). After five days, an aliquot of 10 mL of distilled water was added to each Petri dish and the colony was scraped with a glass rod, and the spore suspension was filtered through cheesecloth. The concentration of conidial suspension used was adjusted to  $8.25 \times 10^4$  conidia/mL for both strains. The temperature and relative humidity were daily assessed using the datalogger (HT-500, Instrutherm, São Paulo, Brazil).

#### **Determination of the activities of enzymes involved in the oxidant metabolism**

Samples of the first and second pairs of leaves from the apex to the base (totalizing 6 leaves through repetition of each treatment) were collected at 12, 24, 36 and 48 hours post inoculation. The samples were individually stored in aluminum foil, quickly frozen in liquid nitrogen (N<sub>2</sub>), and stored at -80 °C until further analysis. To determine the activities of POX (EC 1.11.1.7) and PAL (EC 4.3.1.5), 0.2 g of leaf tissue were macerated in liquid N<sub>2</sub> in a mortar with the addition of polyvinylpyrrolidone (PVP) 1% (w/vol) to obtain a fine powder. The powder was homogenized in 1.5 mL of sodium phosphate buffer 50 mM (pH 6.5) containing 1 mM phenyl methyl sulfonic fluoride (PMSF). The homogenized was centrifuged at  $13,000 \times g$  for 25 min at 4°C and the supernatant was used to determine the enzyme activity. The POX activity was determination of pyrogallol oxidation following the method of KAR & MISHRA (1976). A mixture of 80 µL potassium phosphate buffer 100 mM (pH 7.0), 40 µL of pyrogallol 50 mM and 40 µL of hydrogen peroxide 125 mM was added to 40 µL of extract. The absorbance was measured at 420 nm in

spectrophotometer Gen5™ (BioTek® Instruments, Winooski, USA). The coefficient of molar extinction of  $2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  was used to calculate the POX activity (CHANCE & MAEHLEY, 1955), which was expressed in mM of purpurogallin produced by  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein. The reaction of PAL was started after adding 5  $\mu\text{L}$  of the extract to a mixture containing 145  $\mu\text{L}$  of Tris-HCl buffer 50 mM (pH 8.8) and 50  $\mu\text{L}$  of *L*-phenylalanine 50 mM. The absorbance of the trans-cinnamic acid derivatives was measured in spectrophotometer at 290 nm and the coefficient of molar extinction of  $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ZUCKER, 1965) was used to calculate PAL activity, which was expressed in  $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein. To obtain the extract for enzymatic determination of CAT enzymes (EC1.11.1.6), SOD (EC 1.15.1.1) and APX (E 1.11.1.11), 0.2 g of leaf fragments were macerated as described above. The powder obtained was homogenized in 1.5 mL of potassium phosphate buffer 400 mM (pH 7.8) containing EDTA 10 mM, ascorbic acid 200 mM, PVP 1% (wt vol<sup>-1</sup>). The homogenized was centrifuged as described previously. The CAT activity was determined through the method of CAKMAK & MARSCHNER (1991). The reaction mixture was constituted by potassium phosphate buffer 200 mM (pH 7.0), distilled water and hydrogen peroxide 250 mM. The reaction was initiated after the addition of 10  $\mu\text{L}$  of the crude enzyme extract, and the activity was determined by the rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition at 240 nm for 3 minutes at 25°C. The coefficient of molar extinction of  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ANDERSON et al., 1995) was used to calculate the CAT activity, which was expressed in  $\text{mM min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein. The SOD activity was determined by adding 30  $\mu\text{L}$  of leaf extract in 170  $\mu\text{L}$  of reaction mixture constituted of potassium phosphate buffer 100 mM (pH 7.8), methionine 70 mM, *p*-nitrotetrazole blue (NBT) 1 mM, EDTA 10  $\mu\text{M}$  and riboflavin 0.2 mM. The reaction occurred at 25°C under lighting lamps of 15 W. After 10 min of light exposure, the light was interrupted, and the production of formazan blue, which resulted from the photoreduction of NTB,

was monitored by the increase in absorbance at 560 nm in spectrophotometer Gen5™. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme necessary to inhibit NBT photoreduction by 50%. The APX activity was determined through the method of NAKANO & ASADA (1981). The reaction mixture was constituted by potassium phosphate buffer 200 mM (pH 7.0), hydrogen peroxide 2 mM and ascorbate acid 10 mM. The reaction was initiated by adding 10 µL of leaf extract and the activity was measured through ascorbate oxidation at 290 nm, during 3 minutes at 25°C. The coefficient of molar extinction of 2.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (NAKANO & ASADA, 1981) was used to calculate the APX activity, which was expressed in mM min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein. The concentration of proteins in each sample was determined according to the colorimetric method described by BRADFORD (1976). All assays were realized in triplicate.

#### **Experimental design and data analysis**

The experiment was installed in randomized block design (RBD) with three treatments: plants sprayed with “common BE”, “black BE”, or water (mock inoculated used as control) and three repetitions for the evaluation of the enzyme activities. The data for the activity of POX, CAT, SOD, APX and PAL were submitted to the variance analysis (ANOVA) and the means compared with the test of Tukey at level of 5% of probability. The analyses were realized using Sisvar software (version 5.3).

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

In this work, the activities of some important enzymes responsible for removing the reactive oxygen species (ROS) during the infectious process of strains of *C. coffeicola* in coffee leaves were determined. Despite the strains being from different symptoms in the field, both induced the responses for defense of the plants. The POX activity was significantly increased in the



inoculated plants with the black BE strain compared with the non-inoculated plants at 12 and 24 hpi (Fig. 1A). Inoculated plants with the common BE also showed increased POX activity in relation to the non-inoculated plants at 24 hpi (Fig. 1A). There was no difference between the treatments for the POX activities at 36 and 48 hpi (Fig. 1A) and CAT at 12 hpi (Fig. 1B). Inoculated plants with the black BE strain showed increased in the CAT activity at 24 and 48 hpi (Fig. 1B). Non-inoculated plants showed increased CAT activity at 36 hpi (Fig. 1B). Inoculated plants with the common BE strain also presented increased CAT activity compared with non-inoculated plants at 48 hpi (Fig. 1B). Non-inoculated and inoculated plants with the common BE had greater SOD activity at 12 and 36 hpi (Fig. 1C). The SOD activity was significantly increased in the inoculated plants with both strains in relation to the non-inoculated ones at 48 hpi (Fig. 1C). Inoculated plants with the common BE strain showed increase in the APX activity in relation to the non-inoculated plants at 12 hpi (Fig. 1D). There was no significant difference among the treatments for APX activity at 24, 36 and 48 hpi (Fig. 1D). There was no significant difference among the treatments for PAL activity at 12, 36 and 48 hpi (Fig. 1E). Inoculated plants with the black BE strain presented increased PAL activity compared with the non-inoculated and inoculated plants with the common BE strain at 24 hpi (Fig. 1E). In literature, there are a few accounts of alterations in the antioxidant metabolism of infected plants by *Cercospora*, mainly when it refers to strains that cause different symptoms in coffee plants (NASCIMENTO et al., 2014). When comparing the two *C. coffeicola* strains, common BE and black BE, the results showed that both strains were able to induce the activity of enzymes in coffee leaves, however, there was variation in the timing of activity of enzymes for each strain depending on the enzyme which was being analyzed. Probably, in the initial stages of penetration for the both strains, the coffee plant recognized the strains in a similar way and was inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the plant,

which can be demonstrated through increase POX and APX activity in the first hours of infection. Similar results were found by NASCIMENTO et al. (2014), who verified increased POX and PAL enzyme activity in inoculated soybean plants with *Cercospora sojina*. The POX is a class of protein related to the pathogenesis, and it is induced in the host by the presence pathogens (VAN LOON et al., 2006). Suberization of tissues, catabolism of auxins, strengthening of the cellular wall and responses of defense in plants are responsible for biosynthesis of lignin (HIRAGA et al., 2001). On the other hand, PAL is the key enzyme in the phenylpropanoid pathway, which is important in the responses for defense of plants, mainly for coffee plants. In this present study, comparative analyses of PAL activity could suggest phenylpropanoids as antioxidant compounds can be extremely important for the antioxidant system of the coffee tree infected with the black BE strain at 24 hpi. The same way, GHOLIZADEH & KOHNEHROUZ (2010) suggested that PAL could be the main component for the antioxidant system of corn under saline stress. On the other hand, from 36 hpi, as demonstrated by the activity of the enzymes POX, APX and PAL, the strains could possibly develop in a similar way on the dead cells without being inhibited by the accumulation of  $H_2O_2$  to  $O_2^-$  produced when the plants are infected by pathogens. Possibly due to the fact that *Cercospora* produces cercosporin toxin that acts in the plasmatic membrane of the host cell promoting the death of the cells and the release of ERO (DAUB et al., 2013). These results suggest this toxin can have inhibited the defense mechanisms of the plants, thus permitting the fungus have access to the nutrients. The APX enzyme, participant of the cycle ascorbate-glutathione, acts together with POX and CAT, removing  $H_2O_2$  from plant cells. In the first reaction of catalyzation, the APX uses two molecules of ascorbate to reduce  $H_2O_2$  with concomitant generation of two molecules of malondialdehyde, the main product in lipid peroxidation of the cellular membranes (SHARMA et al., 2012). The accounts of this study agree

with DEBONA et al. (2012), which verified increased APX activity in inoculated wheat plants with *Pyricularia oryzae*. DOMICIANO et al. (2015) also verified increased activities of these enzymes for the same pathosystem, when the plants were treated with silicon. In relation to CAT activity, this one was greater in inoculated plants with the black BE strain, comparing with non-inoculated plants, but at 36 hpi. In the same way, DEBONA et al. (2012) verified increased in the CAT activity in inoculated wheat plants with *P. oryzae* comparing with non-inoculated plants at 48 hpi. CAT catalyzes the dismutation of two molecules of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and oxygen (SHARMA et al., 2012). The SOD activity increased in the inoculated plants with both strains was just observed at 48 hpi, which can be possibly related to the beginning of the colonization of the fungal strains similarly to coffee tissues. These results are according to DEBONA et al. (2012), who observed increased SOD activity in inoculated plants with *P. oryzae*, and the increase of this activity was related to the development of blast symptoms. According to BOLWELL et al. (2002) virulent pathogens can avoid or suppress the recognition of the host, only inducing the initial phase of defense responses. According to LEVINE et al. (1994), the current toxicity of the ERO in the interaction pathogen and host is going to depend on the sensitivity of the pathogen to the concentration of these radicals. Some fungi, such as *Botrytis cinerea* and *Cercospora* can benefit of the increase of ERO generated against the plant defense from an infection against a pathogen as a factor to facilitate the colonization and absorption of nutrients through the exploration of defense mechanisms of the host (GOVRIN & LEVINE, 2000).

In this study, it is speculated the greatest activities of the enzymes could be a strategy of the plant to restrict the colonization of both strains due to the removal of ERO. Despite having observed little differences in the activation of

the enzymes in the plants when inoculated with both strains, all the lesions observed in the greenhouse were of the common BE type.

These results indicate that there are other factors affecting and leading to the occurrence of the black BE lesion in field conditions. Overall, studies about the infectious process of strains associated with different environmental and nutritional conditions together with the confirmation and accurate identification of the strains from different symptoms of brown eye spot through molecular tools are still important questions.

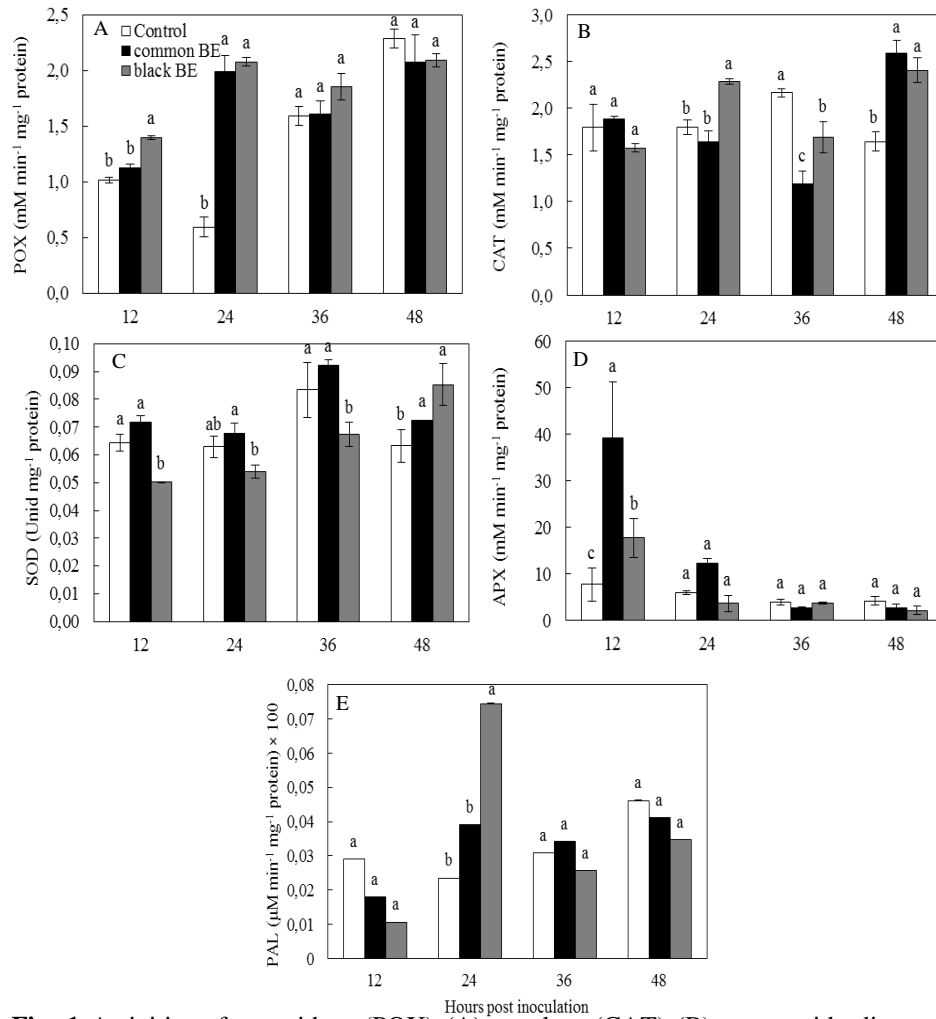
#### **4 CONCLUSION**

The results of this study clearly demonstrated that both strains were able to induce the alterations in the antioxidant metabolism of coffee leaves, suggesting that other factors leading to the black BE lesion type in field conditions and further investigation is needed.

#### **5 ACKNOWLEDGEMENTS**

To the Coordination for higher Education Staff Development-CAPES for granting the scholarship, to FAPEMIG for giving support to the researches of the last author CAG - PPM-00248-13 and to CNPq for the productivity grants in research for the one before the last and the last authors. The authors Dra. Deila Magna Botelho dos Santos and Dr. Leônidas Leoni Belan for technical assistance.

Figure



**Fig. 1** Activities of peroxidase (POX) (A), catalase (CAT) (B), superoxide dismutase (SOD) (C), ascorbate peroxidase (APX) (D) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) (E) in leaves of coffee inoculated with strain isolated from a common brown eye spot (common BE) from lesion and strain isolated from a black brown eye spot (black BE) from lesion and water (mock inoculated used as control). Means followed by the same letter for each sampling time are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ) as determined by Tukey's test. Bars represent the standard error of the means.

## 6 REFERENCES

ANDERSON, D. et al. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v.109, p.1247-57, 1995. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>>. Accessed: Jun. 14, 2015.

BOLWELL, G.P. et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1367-1376, 2002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1367>. Accessed: Jan 10, 2015.doi: 10.1093/jexbot/53.372.1367.

BRADFORD, M.N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976. Available from: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1976.9999>. Accessed: Jan. 12, 2015.doi: 10.1006/abio.1976.9999.

CAKMAK, L.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-68, 1991. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>. Accessed: Jan. 12, 2015.doi: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2, p.764-75, 1995. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(55\)02300-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(55)02300-8). Accessed: Jan. 13, 2015.doi: 10.1016/s0076-6879(55)02300-8.

DAUB, M.E et al. Reactive Oxygen Species in Plant Pathogenesis: The Role of Perylenequinone Photosensitizers. **Antioxidant & Redox Signaling**, v.19, p.970-989, 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.5080>. Accessed: Jan. 13, 2015.doi: 10.1089/ars.2012.5080.

DEBONA, D. et al. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, v.102, p.1121-29, 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-06-12-0125-r>. Accessed: Dec. 10, 2014. doi: 10.1094/phyto-06-12-0125-r.

DOMICIANO, G.P. et al. Alterations in gas exchange and oxidative metabolism in rice leaves infected by *Pyricularia oryzae* are attenuated by silicon. **Phytopathology**, p.1-33, 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-10-14-0280-r>. Accessed: Dec. 10, 2014.doi: 10.1094/phyto-10-14-0280-r.

GHOLIZADEH, A.; KOHNEHROUZ, B. Activation of phenylalanine ammonia lyase as a key component of the antioxidative system of salt-challenged maize leaves. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.217-223, 2010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s1677-04202010000400001>. Accessed: Dec. 14, 2014.doi: 10.1590/s1677-04202010000400001.

GOVRIN, E.M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v.10, p.751-757, 2000. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00560-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00560-1). Accessed: Dec. 13, 2014.doi: 10.1016/s0960-9822(00)00560-1.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, v.42, p.462-468, 2001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pce061>. Accessed: Dec. 14, 2015.doi: 10.1093/pcp/pce061.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976. Available from: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.57.2.315>. Accessed: Jan. 10, 2015.doi: 10.1104/pp.57.2.315.

LEVINE, A. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, p.583-593, 1994. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90544-4](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90544-4). Accessed: Feb. 12, 2015.doi: 10.1016/0092-8674(94)90544-4.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S.R. (2013) Cercospora negra associada à deficiência de fósforo em cafeeiros. Procafé online. Accessed: July, 29, 2014. Available from: <http://www.fundacaoprocafe.com.br>.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant & Cell Physiology**, v.22, p.867-80, 1981. Available from: <http://pcp.oxfordjournals.org/content/22/5/867>. Accessed: Mar. 20, 2015.

NASCIMENTO, K.J.T. et al. Soybean Resistance to *Cercospora sojina* Infection Is Reduced by Silicon. **Biochemistry and Cell Biology**, v.104, p.1183-1191, 2014. Available in: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-02-14-0047-r>. Accessed: Mar 20, 2015.doi: 10.1094/phyto-02-14-0047-r.

NELSON, S.C. Cercospora Leaf Spot and Berry Blotch of Coffee. **Cooperative Extension Service**, 2008, pp.41.

POZZA, E. A. et al. Sintomas e injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.



SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.995-1014, 2005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700003>. Accessed: Jun. 20, 2014. doi: 10.1590/s0100-879x2005000700003.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v.1, p.1-26, 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>. Accessed: Jan. 30, 2015. doi: 10.1155/2012/217037.

SOUZA, A.G.C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, v.159, p.6-11, 2011. Available in: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01710.x>. Accessed: Fev.23, 2015. doi: 10.1111/j.1439-0434.2010.01710.x.

ZUCHER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v.40, p.779-784, 1965. Available from: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.40.5.779>. Accessed: Jun. 15, 2015. doi: 10.1104/pp.40.5.779.

VAN LOON, L.C. et al. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.44, p.135–162, 2006. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>. Accessed: July 16, 2014. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.

(VERSÃO PRELIMINAR)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Filogeneticamente, baseando-se nas sequências dos dois genes em estudo: fator de alongação e actina, os isolados se agruparam em um único grupo similar à *Cercospora coffeicola*.

É possível que outros fatores ambientais e ou nutricionais possam estar envolvidos com a ocorrência desses novos sintomas de cercosporiose do tipo negra.

No geral, há a necessidade de mais estudos, principalmente, utilizando outros marcadores moleculares que possam encontrar possíveis diferenças entre isolados que causam diferentes sintomas de cercosporiose.