



PAULA ADRIELLY SOUZA VALE

**CARACTERIZAÇÃO DE *Cercospora coffeicola*
POR FILOGENIA MOLECULAR
MULTIGÊNICA**

LAVRAS - MG

2016

PAULA ADRIELLY SOUZA VALE

**CARACTERIZAÇÃO DE *Cercospora coffeicola* POR FILOGENIA
MOLECULAR MULTIGÊNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

LAVRAS - MG

2016

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

Vale, Paula Adrielly Souza.

Caracterização de *Cercospora coffeicola* por filogenia
molecular multigênica / Paula Adrielly Souza Vale. – Lavras:
UFLA, 2016.

64 p.: il.

Dissertação (mestrado acadêmico) –Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador (a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Café. 2. Cercosporiose do cafeeiro. 3. Sequências multi-
locos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

PAULA ADRIELLY SOUZA VALE

**CARACTERIZAÇÃO DE *Cercospora coffeicola* POR FILOGENIA
MOLECULAR MULTIGÊNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2016

Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

UFLA

Dra. Eveline Teixeira Caixeta

EMBRAPA

PhD. Mário Lúcio Vilela de Resende

Orientador

LAVRAS - MG

2016

Ao meu marido Juliano, pelo amor e cumplicidade.
Aos meus pais, Adriana e Valério, pelo suporte e amor incondicional.
À minha irmã, Amanda, pela amizade..
À Deus, pela força e coragem.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar e ser meu alicerce em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de realização do Mestrado, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, à CAPES, FAPEMIG e INCT/Café pelo suporte na pesquisa.

Ao meu marido, Juliano, por estar sempre presente e disponível.

Aos meus pais, Adriana e Valério, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em meu potencial.

Ao meu orientador, Prof. Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação e confiança.

Ao professor Ludwig H. Pfenning, por me orientar a tantos anos na jornada acadêmica e aceitar o convite de participar da banca de defesa.

À Dra. Eveline Teixeira Caixeta, por aceitar o convite de participar da banca de defesa.

Aos professores do Programa, por compartilharem conhecimento e sabedoria.

Ao meu sogro, José Valter, pelo apoio.

À minha amiga, Dra. Deila Magna dos Santos Botelho, pelo apoio, orientação e altruísmo.

À Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães, pelo apoio e orientação.

À Dra. Ana Cristina Andrade Monteiro pelo apoio e orientação.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Ao Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, pelo auxílio prestado na realização deste estudo.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) e a todos que dele fazem parte e também aos colegas do programa, em especial Tharyn e Renan, pela companhia nesta caminhada.

“A ship is always safe at shore, but that is not what it’s built for.”

Albert Einstein

RESUMO

A cafeicultura é uma atividade agrícola que alavanca a economia brasileira, gerando dividendos notáveis para o país. Devido a sua considerável importância, é pertinente estudar os fatores que afetam a produção de café no Brasil. O fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, agente etiológico da Cercosporiose do cafeeiro, embora cause perdas notáveis nas lavouras, é pouco estudado e estratégias de manejo efetivas para o controle da doença são escassas. Visando solucionar estas questões, objetivou-se com este estudo caracterizar isolados de *Cercospora coffeicola* das principais regiões produtoras do Brasil. Outro objetivo deste estudo foi epitificar a espécie, que possuía até o momento uma taxonomia confusa. A presença de sintomas atípicos da doença nas lavouras era um indício de ocorrência de variabilidade dentro da população de *C. coffeicola*. Então, uma amostra representativa contendo 19 isolados provenientes dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia e Espírito Santo foi caracterizada a nível molecular. A partir da análise combinada de sequências de regiões específicas do DNA do fungo, foi possível analisar filogeneticamente diferentes isolados de *C. coffeicola*. A estratégia filogenética utilizada foi a abordagem multi-locos. Esta, se baseou na combinação de sequências parciais derivadas do locus Espaço interno transcrito (ITS), juntamente com partes de quatro genes codificadores das proteínas Actina (ACT), Histona H3 (HIS), Calmodulina (CAL) e Fator de Elongação 1 α (TEF). Todos os genes foram avaliados individualmente segundo o método da Máxima parcimônia, e um grupo monofilético foi formado, juntamente com isolados de referência de outros países. Com isso, foi possível afirmar que, a mesma espécie pode ocasionar dois tipos de sintomas nas lavouras e ser classificada como apenas uma espécie filogenética. Não houve variação entre isolados provenientes de locais distintos, o que pode ser considerado favorável para programas de melhoramento visando resistência ao fungo, uma vez que, o controle do patógeno via melhoramento é facilitado em espécies com baixa ocorrência de variabilidade. As sequências geradas neste estudo foram depositadas no GenBank, e o alinhamento e árvore no TreeBASE para posteriores consultas que poderão auxiliar no entendimento da relação planta-patógeno e, conseqüentemente, o progresso de programas de melhoramento.

Palavras-chave: Café. Cercosporiose do cafeeiro. Sequências multi-locos. Taxonomia.

ABSTRACT

The Brazilian coffee is an agricultural activity that leverages the economy, generating remarkable dividends for the country. Because of its considerable importance, it is pertinent to study any factor affecting coffee production in the country. The fungus *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, etiological agent of the brown eye spot, although causes notable losses in crops is little studied and effective management strategies to control the disease are scarce. Aiming to address these issues, the aim of this study was to characterize isolates of *Cercospora coffeicola* from the main producing regions of Brazil. Another objective of this study was to epitify the species, which had so far a confusing taxonomy. The presence of atypical symptoms of the disease in crops was a evidence of occurrence of variability within the population of *C. coffeicola*. Then a representative sample containing 19 isolated from the states of Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Bahia and Espírito Santo was characterized at the molecular level. The phylogenetic approach was a multi-locos approach. This was based on the combination of partial sequences derived from the locos ITS (Internal Transcribed Spacer) along with four parts of genes encoding the proteins actin (ACT), calmodulin (CAL) and TEF-1 α (elongation factor). All genes were individually evaluated by the method of Maximum parsimony, and a monophyletic group was formed, with reference isolated from other countries. This allows us to state that the same species can cause two types of symptoms in crops and be classified as just a phylogenetic species. There wasn't variation between isolates from different locations, which can be considered favorable for breeding programs for resistance to the fungus, since the pathogen control is facilitated via improvement in species with low occurrence of variability. The sequences generated in this study were deposited in GenBank, and alignment and tree in TreeBASE for future reference tool for the understanding of plant-pathogen relationship and consequently the progress of breeding programs.

Key-words: Coffee. Brown-eye-spot. Multi-locos sequences. Taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise combinada de cinco regiões gênicas.....	48
Figura 2	Características morfológicas de <i>Cercospora coffeicola</i>	49
Figura 3	Sintomas foliares ocasionados por <i>Cercospora coffeicola</i> ..	50
Figura 4	Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região Actina.....	60
Figura 5	Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região Histona.....	61
Figura 6	Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região Calmodulina.....	62
Figura 7	Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região TEF.....	63
Figura 8	Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região ITS.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detalhes das coleções e códigos de acesso (GenBank) de isolados incluídos neste estudo.....	39
Tabela 2	Detalhes dos <i>primers</i> utilizados neste estudo.....	44

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	O gênero <i>Cercospora</i>	16
2.2	<i>Cercospora coffeicola</i>	18
2.3	Cercosporiose do cafeeiro	19
2.3.1	Importância econômica	19
2.3.2	Sintomatologia	21
2.4	Bioinformática aplicada a estudos filogenéticos	23
2.5	Métodos de reconstrução filogenética	24
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
	REFERÊNCIAS	27
	SEGUNDA PARTE	
	Artigo – <i>Cercospora Coffeicola</i>: FILOGENÉTICA	
	MOLECULAR, EPITIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DE UMA	
	NOVA SINTOMATOLOGIA DA ESPÉCIE	32
	RESUMO	33
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1	Isolados Fúngicos e condições das culturas	38
2.2	Extração de DNA, amplificação e edição de sequências	42
2.3	Análises filogenéticas	45
2.4	Análises morfológicas	46
3	RESULTADOS	47
3.1	Análises filogenéticas	47
3.2	Análises morfológicas	49
4	DISCUSSÃO	52
5	CONCLUSÃO	55
6	AGRADECIMENTOS	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira é uma atividade agrícola de extrema importância para a economia do país. Em 2015, o Brasil ocupou a posição de maior produtor e exportador do grão, além de registrar o recorde em volume exportado, respondendo por 30% de toda a produção mundial (MAPA, 2016). Devido a sua notável importância, estudar os fatores que acarretam quedas na produção torna-se justificável.

Vários fatores bióticos e abióticos afetam a produção brasileira de café, dentre estes, a cercosporiose do cafeeiro, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke (SOUZA et al., 2015). Embora a cercosporiose do cafeeiro afete significativamente a produção brasileira de café, há uma escassez geral de conhecimentos sobre o patógeno (SOUZA et al., 2012).

Este fungo é um problema constante em praticamente todas as etapas da cadeia produtiva do café. Segundo Souza et al. (2012), a doença ocorre desde mudas em viveiros até plantas adultas, podendo ocorrer epidemias severas em lavouras onde práticas adequadas de manejo são negligenciadas.

Em relação às práticas de manejo, no Brasil tem-se evitado cada vez mais o uso de agroquímicos nas lavouras. Em decorrência de uma legislação ambiental altamente exigente, tem se investido cada vez mais no melhoramento genético para geração de cultivares resistentes. No entanto, para gerar cultivares resistentes a um patógeno, primeiramente é necessário entender minuciosamente a espécie causadora da doença.

Segundo Souza et al. (2015), os sintomas típicos da cercosporiose aparecem nas folhas como pontuações necróticas com centros de cores claras circundados por um anel púrpura-marrom com halos amarelados. Entretanto, em alguns campos de produção no Brasil, são encontrados sintomas atípicos, que caracterizam a doença do cafeeiro, popularmente conhecida como “Cercospora

Negra”. Matiello & Almeida (2013) definem tais sintomas como pequenas lesões circulares escuras, e, segundo os autores, estudos morfológicos não mostraram diferenças significativas nas culturas fúngicas oriundas de folhas com sintomas típicos e de cercospora negra.

Para compreender diferenças existentes entre os isolados e verificar a hipótese de que uma nova espécie poderia estar causando o sintoma atípico, era necessário primeiramente epitificar o fungo, já que sua descrição inicial era inconsistente e baseava-se apenas em características morfológicas. A epitificação de indivíduos é feita de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (ICN). Segundo o código, um epitipo é um espécime ou ilustração selecionado para servir como um tipo interpretativo quando o holótipo, lectótipo ou neótipo previamente designado, ou todo o material original associado com um nome validamente publicado, é comprovadamente ambíguo e não pode ser criticamente identificado para os fins da precisa aplicação do nome de um táxon (MCNEILL et al., 2012).

Com a redução dos custos do sequenciamento de DNA e aumento exponencial de sequências disponíveis em bancos de dados mundiais, têm se tornado cada vez mais simples analisar estes tipos de dados. Para o reconhecimento de novas espécies de *Cercospora*, Bakhshi et al. (2015), Quaedvlieg et al. (2014) e Groenewald et al. (2010; 2013) definiram como método mais efetivo a análise multi-locos de sequências de DNA, integrada com ecologia e morfologia.

Portanto, objetivou-se com este trabalho realizar um estudo filogenético com isolados de *C. coffeicola* provenientes dos estados brasileiros que mais produzem café no país: Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Paraná e Espírito Santo. Outro objetivo proposto foi descrever a espécie, a partir de sequências de DNA de regiões específicas do DNA dos isolados. As regiões escolhidas foram as mesmas utilizadas no estudo mais inclusivo dentro do gênero até o presente

momento, definidas por Groenewald et al. (2013) como as mais efetivas para o reconhecimento de novas espécies de *Cercospora*. São elas: o locus Espaço interno transcrito (ITS) juntamente com partes de quatro genes codificadores das proteínas Actina (ACT), Histona H3 (HIS), Calmodulina (CAL) e Fator de Elongação 1 α (TEF-1 α).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Cercospora*

O gênero *Cercospora* foi estabelecido por Fresenius em 1863 para classificar fungos com conídios pluri-septados (FUCKEL, 1863). Espécies do gênero *Cercospora* pertencem a um dos maiores gêneros de hyphomycetes e foram muitas vezes associadas ao gênero teleomorfo *Mycosphaerella* (*Capnodiales*, *Mycosphaerellaceae*; CROUS et al., 2000; STEWART et al., 1999). O gênero *Mycosphaerella* mostrou-se polifilético (CROUS et al., 2007), e foi então, dividido em vários gêneros, de acordo com seus diferentes estados anamorfos (CROUS et al., 2009a, b).

Por este motivo, o gênero *Cercospora* é, atualmente, considerado um gênero holomorfo, com algumas espécies exibindo a habilidade de formar teleomorfos conhecidos como *Mycosphaerella* (CORLETT 1991, CROUS et al., 2004b).

Sabe-se também, que o gênero *Cercospora* integra um clado monofilético bem suportado em *Mycosphaerella* (STEWART et al., 1999; CROUS et al., 2000, 2009a, b; GOODWIN et al., 2001; PRETORIUS et al., 2003), em contraste com outros gêneros polifiléticos como *Septoria* (VERKLEY et al., 2004).

O gênero *Cercospora*, inclui fungos fitopatogênicos associados a doenças que ocasionam manchas foliares em uma ampla gama de hospedeiros (BAKHSHI et al., 2015). Além de causarem manchas foliares, espécies de *Cercospora* (*Mycosphaerellaceae*) também podem causar lesões necróticas em flores, frutos, brácteas, sementes e pedicelos de plantas cultivadas e nativas dos mais diferentes climas do mundo (GOODWIN et al., 2001; CROUS & BRAUN, 2003; AGRIOS, 2005).

Algumas espécies do gênero, também podem ser consideradas potenciais agentes de controle biológico de plantas invasoras, como, *Cyperus rotundus* (“Tiririca”) que pode ser controlada por *Cercospora caricis* e aguapés, que podem ser controlados por *Cercospora rodmanii* (MORRIS & CROUS, 1994; CHARUDATTAN, 2001; INGLIS et al., 2001; TESSMANN et al., 2001; PRAVEENA & NASEEMA, 2004).

As espécies mais comuns do gênero *Cercospora*, segundo Groenewald et al. (2013), são: *C. zea-maydis*, agente etiológico da cercosporiose do milho; *C. beticola*, agente etiológico da mancha de *Cercospora* na beterraba; *C. apii*, agente etiológico da mancha de *Cercospora* no aipo/salsão, *C. canescens*, agente etiológico da mancha de *Cercospora* do feijoeiro, *C. kikuchii* e *C. sojina*, agente etiológico da mancha púrpura da semente e mancha foliar “olho-de-rã ” respectivamente, na soja; *C. arachidicola* e *C. personata* agentes etiológicos da mancha castanha e mancha preta respectivamente, no amendoim, *C. coffeicola* , agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro e *C. nicotianae*, agente etiológico da cercosporiose do tabaco.

Em relação à distinção de espécies de fungos cercosporioides, estudos baseados em dados de sequências de DNA multi-locos tem se mostrado altamente eficazes (GROENEWALD et al., 2013; CROUS et al., 2013; BAKHSHI et al., 2015a, 2015b). Além disso, sequências multi-locos de DNA integradas com ecologia, morfologia e características culturais, são referidas como um conceito consolidado de espécies (QUAEDVLIEG et al., 2014), sendo comprovadamente o método mais eficaz para o reconhecimento de espécies de *Cercospora* (GROENEWALD et al., 2010,2013).

2.2 *Cercospora coffeicola*

O fungo *Cercospora coffeicola* é uma importante espécie do gênero *Cercospora*, sendo responsável por ocasionar a cercosporiose do cafeeiro. A taxonomia desta espécie é definida da seguinte forma: Pertence à família *Dematiaceae*, ordem *Moniliales*, e está inserido na classe dos *Hyphomycetes*. Em relação ao modo de reprodução, Crous & Braun (2003) denominaram a fase sexuada (teleomorfo) do fungo como *Mycosphaerella coffeicola* e a fase assexuada (anamorfo) como *Cercospora coffeicola*. Entretanto, Martins, Maffia & Mizubuti (2008) afirmam que, ainda são necessários estudos mais completos para relacionar ambas as espécies.

As estruturas morfológicas características da espécie são conídios e conidióforos. Conídios são hialinos, multisseptados e com extremidades afiladas; Conidióforos são cilíndricos, septados e apresentam coloração hialina a marrom (CHUPP, 1954). As estruturas morfológicas da espécie podem ser encontradas no centro das lesões ocasionadas pelo fungo, tanto na face adaxial, quanto na face abaxial (MARTINS, MAFFIA & MIZUBUTI, 2008).

Os conídios, podem ser dispersos pelo vento, insetos e pela água (ZAMBOLIM et al., 1997) e sobreviver por até nove meses sobre sementes e folhas, até que ocorram condições propícias para o desenvolvimento da doença (GODOY; BERGAMIN; SALGADO, 1997; CUSTÓDIO et al., 2011).

Somente quando o patógeno encontra condições ideais de temperatura e umidade, inicia-se o processo germinativo. Souza et al. (2011) descreveram tal processo em *C. coffeicola*, mostrando que, os tubos germinativos penetram na planta pelos estômatos e, após a penetração, o fungo coloniza os espaços inter e intracelulares do parênquima lacunoso da folha. Os autores também descreveram que, somente esporos presentes na face abaxial da folha são capazes de entrar em contato com a planta e causar a doença.

O patógeno pode ser cultivado *in vitro*, sendo as características da colônia dependentes do meio de cultura utilizado. Outra particularidade da espécie é a produção de cercosporina, uma micotoxina fotossensível que ocasiona morte celular das células do hospedeiro ao romper a membrana. Daub et al. (2005) elucidaram o modo de ação da toxina explicando que, ao entrar em contato com a membrana celular do hospedeiro, a toxina promove o rompimento desta a partir da peroxidação de lipídeos presentes na parte externa da membrana. Assim, o fungo passa a ter acesso aos nutrientes contidos no espaço intercelular.

Mesmo ocasionando uma doença que ameaça a produção do maior produtor de café do mundo, há uma escassez de conhecimentos atrelados ao patógeno (SOUZA et al., 2012). Assim, surge a demanda por estudos que visem a compreensão de *C. coffeicola* integrada ao desenvolvimento de práticas de manejo efetivas no controle da doença.

2.3 Cercosporiose do cafeeiro

2.3.1 Importância econômica

Sendo o Brasil o maior produtor mundial de café, quaisquer fatores que levem a reduções na produção e/ou perdas na qualidade da bebida acarretam danos significativos para a cafeicultura e economia do país. Vários fatores abióticos e bióticos ameaçam a cafeicultura brasileira, incluindo a cercosporiose do cafeeiro, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke (SOUZA et al., 2015).

Com constantes alterações climáticas e períodos prolongados de estiagem, como o ocorrido nas safras de 2014/2015, a cercosporiose voltou a ser

uma preocupação vigente, já que a doença é favorecida por desequilíbrios nutricionais, e a seca impossibilita que nutrientes se solubilizem no solo.

A doença é uma das mais antigas da cultura. O primeiro relato foi feito em 1881 na Jamaica por Cooke (1881). Já no Brasil, a cercosporiose foi relatada pela primeira vez em 1901, em lavouras localizada no estado de São Paulo, nas cidades de Campinas e Araraquara (NOACK, 1901). Desde então, ocorreu uma ampla dispersão do patógeno no país. A primeira epidemia severa da doença no Brasil ocorreu em 1971 no estado do Espírito Santo (CARVALHO & CHALFOUN, 1998) e, desde então, *Cercospora coffeicola* tornou-se uma preocupação constante para agricultores de todas as regiões produtoras. Mesmo sendo uma doença antiga nos cafezais brasileiros, frequentemente, epidemias da doença têm sido relatadas nas principais regiões produtoras (SOUZA et al., 2011).

Santos et al. (2008) relataram que cafezais com elevada produção são mais susceptíveis a cercosporiose devido a drenagem de nutrientes das folhas para os grãos, que leva a um desequilíbrio nutricional das folhas da planta. Tal condição favorece a colonização por *C. coffeicola*. Por este motivo, a doença é um problema endêmico até mesmo em lavouras bem manejadas, que também estão sujeitas ao ataque do fungo principalmente na fase de enchimento de grãos.

Segundo Souza et al. (2015), dependendo da estação e da região em que se encontra a lavoura, a cercosporiose pode ocasionar perdas na produção superiores a 30%. A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estima que a safra 2015 de café do Brasil, será aproximadamente de 44,28 milhões de sacas de 60kg beneficiadas (CONAB, 2016). Portanto, perdas ocasionadas por *Cercospora coffeicola* são alarmantes e, soluções que visem reduzi-las são indispensáveis.

2.3.2 Sintomatologia

Segundo Souza et al. (2015), os sintomas típicos da doença aparecem nas folhas como pontuações necróticas com centros de cores claras circundados por um anel púrpura-marrom com halos amarelos. A doença promove uma desfolha precoce nas plantas, principalmente pela produção de etileno pelas folhas lesionadas, podendo reduzir consideravelmente a produção de café (ZAMBOLIM et al., 1997).

Os sintomas da doença podem afetar desde mudas em viveiros até plantas adultas, em lavouras bem estabelecidas (PAIVA et al., 2013). Em viveiros, os sintomas comuns são a queda precoce das folhas e raquitismo das mudas. No pós-plantio, desfolha e atraso no crescimento das plantas. Em lavouras novas, após as primeiras produções, pode ocorrer queda de folhas e frutos além de seca de ramos produtivos. Em lavouras adultas, queda prematura de folhas e frutos, e “chochamento” de grãos. Além disso, as lesões podem ser também, uma possível porta de entrada para outros fungos que depreciam a qualidade da bebida (CARVALHO & CHALFOUN, 2001).

Nos últimos anos, um sintoma atípico da doença, popularmente conhecido como “Cercospora Negra”, tem sido relatado em alguns campos de produção. Matiello e Almeida (2013) caracterizaram as lesões atípicas como: lesões circulares e escuras, com tamanho superior às lesões convencionais. A princípio, os autores acreditavam que a sintomatologia era ocasionada por uma nova raça de *C. coffeicola*. Entretanto, o isolamento das lesões não foi conclusivo para afirmar esta hipótese. Nelson (2008) atribui como causa do sintoma atípico, variações genéticas no patógeno ou alterações ambientais, porém, o mesmo autor não apresentou nenhum indício de qual seria a real causa do problema.

Alterações genéticas em patógenos são motivo de preocupação no ponto de vista fitossanitário, visto que, estes podem se tornar ainda mais virulentos e ocasionarem problemas de dimensões ainda maiores. Portanto, é necessário elucidar a hipótese que uma variação genética possa estar ocorrendo em *C. coffeicola*.

2.4 Bioinformática aplicada a estudos filogenéticos

Estudos filogenéticos que utilizam o sequenciamento genômico geram um amplo conteúdo de dados a serem analisados. Geralmente, sequências de DNA de vários organismos são comparadas, para então, inferir-se filogenias por meio de análises estatísticas. O processamento de tantos dados foi então associado a *softwares* de bioinformática.

Bioinformática é normalmente definida como a aplicação de técnicas computacionais para entender e organizar a informação associada a macromoléculas biológicas (LUSCOMBE, GREENBAUM & GERSTEIN, 2001).

Os principais programas utilizados em estudos filogenéticos são:

MEGA – É um moderno programa de análises filogenéticas, que possibilita que o usuário integre a manipulação de sequências através de seu próprio navegador. O programa possibilita o alinhamento de sequências de interesse a partir de implementos como *ClustalW* e *Muscle*. Além disso, o usuário pode estimar árvores filogenéticas pelos principais métodos de inferência filogenética em diversos formatos. O programa é gratuito e pode ser baixado no website do produtor (TAMURA et al., 2011).

MrBayes – É um *software* gratuito que executa inferências Bayesianas de árvores filogenéticas, combinando informações de diferentes subconjuntos de dados em evolução, sob diferentes modelos evolutivos estocásticos. Isso permite ao usuário analisar conjuntos de dados heterogêneos derivados de diferentes tipos de dados, por exemplo, nucleotídeos, proteínas e até mesmo morfologia (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003).

FigTree – É um programa utilizado para o ajuste de árvores filogenéticas. O programa faz a leitura de árvores filogenéticas nos principais formatos, Nexus e Newick. O programa possibilita a alteração de fonte e cor. É possível assim, de

acordo com as necessidades do usuário, ajustar o *layout* da árvore filogenética (HILLS et al., 2011).

Estes softwares estão em constante atualização, e cada vez mais integram novas funcionalidades a suas interfaces, facilitando a vida de acadêmicos e pesquisadores.

2.5 Métodos de reconstrução filogenética baseados em sequências de DNA

A construção de árvores filogenéticas requer quatro passos distintos: Passo 1- identificar e adquirir um conjunto de sequências homólogas de DNA ou proteínas; Passo 2- alinhar estas sequências; Passo 3- estimar uma árvore a partir do alinhamento das sequências; Passo 4- apresentar a árvore de tal modo que a informação seja transmitida de maneira pertinente a quem a interessar (HALL, 2013).

Para estimar árvores filogenéticas, existem duas abordagens primárias: Algorítmica e “Tree-searching”. A abordagem algorítmica utiliza um algoritmo para estimar a árvore a partir de dados disponíveis. Os métodos algorítmicos existentes são Neighbor Joining e UPGMA, ambos métodos de distância (HALL, 2011).

Em métodos de distância, alinhamentos de sequências são convertidos em matrizes de distância, que funcionam como uma tabela de porcentagem das homologias. O método de distância mais utilizado atualmente é o método Neighbor Joining (NJ). O outro método de distância disponível é o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean), método da ligação média não ponderada, e é considerado o mais simples dos métodos de distância. A abordagem algorítmica tem duas vantagens, é rápida e produz uma única árvore a partir de qualquer conjunto de dados fornecidos (HALL, 2011).

A abordagem “Tree-searching” estima muitas árvores, e então utiliza alguns critérios para decidir qual é a melhor ou o melhor conjunto de árvores. São métodos de Tree-searching: Parcimônia, *Maximum Likelihood* e Análises Bayesianas. Estes métodos buscam a árvore que melhor define o critério que está sendo analisado a partir de avaliações individuais das árvores (HALL, 2011).

De forma geral, o método da Parcimônia, busca a árvore ou as árvores com os menores números de mudanças possíveis. O método *Maximum Likelihood* (ML) busca a árvore que, sob algum modelo de evolução, maximiza a probabilidade de obter os dados observados. ML, quase sempre indica uma única árvore, com a probabilidade conhecida. Inferência Bayesiana é uma recente variação do método *Maximum Likelihood*. Nessa estratégia, ao invés de buscar a árvore que maximiza a probabilidade de observar os dados, procura as árvores com maiores probabilidades, e assim dispensa a análise de *bootstrap*, que estima a confiabilidade da árvore inferida (HALL, 2011).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Associar a biologia molecular ao estudo de microrganismos fitopatogênicos é uma excelente estratégia para o manejo e controle de doenças de plantas. As reduções dos custos de aplicação de técnicas de manipulação do material genético, viabilizaram o entendimento de diversos patossistemas.

Tais técnicas puderam ser aplicadas ao estudo de *C. coffeicola*, ampliando os conhecimentos existentes sobre o agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro.

Embora o patógeno seja um problema antigo em lavouras cafeeiras, sua identidade não é bem definida. Assim, verificou-se a necessidade de se conduzir estudos taxonômicos e filogenéticos para agregar conhecimentos à origem e variabilidade existente na espécie.

Como em estudos de melhoramento genético, voltados para o manejo de doenças busca-se constantemente gerar plantas com resistência ampla e duradoura aos fitopatógenos, entender a variabilidade dentro de uma espécie permite gerar resultados concretos.

Conforme foi exposto, conduziu-se esse trabalho, com o objetivo de compor uma coleção de isolados representativos da espécie *C. coffeicola*, oriundos das principais regiões produtoras do Brasil, avaliar marcadores morfológicos presentes na espécie e caracterizá-la por filogenia molecular, verificando a possível variabilidade existente em isolados de *C. coffeicola* de diversas regiões produtoras do Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- BAKHSI, M. et al. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. **Persoonia**, Leiden, v. 34, n. 1, p. 65-86, Dec. 2015a.
- BAKHSI, M. et al. Is morphology in *Cercospora* a reliable reflection of generic affinity? **Phytotaxa**, v. 213(1), p. 22–34, 2015b
- 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).
- CARVALHO V. L, CHALFOUN S. M. Manejo integrado das principais doenças do cafeeiro. **Informe Demográfico**, Belo Horizonte, v.19, p. 27–35, 1998.
- CHARUDATTAN, R. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. **Biocontrol**, v. 46, p. 229–260, 2001.
- CHUPP, C. A. **Monograph of the Genus Cercospora**. Ithaca: Publicado pelo autor, 1954. 667 p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2015, quinta estimativa, novembro/2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 27 jan. 2016.
- COOKE M.C. *Cercospora coffeicola*. **Grevillea**, v. 9, p. 99, 1881.
- CORLETT, M. An annotated list of the published names in *Mycosphaerella* and *Sphaerella*. **Mycologia Memoir**, v. 18, p. 1–328, 1991.
- CROUS, P. W. et al. M. J. The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. **Studies in Mycology**, v. 45, p. 107–121, 2000.
- CROUS, P. W.; BRAUN, U. **Mycosphaerella and its anamorphs**: 1. Names published in *Cercospora* and *Passarola*. Centraalbureau voor Schimmelcultures: The Netherlands, 2003.

CROUS, P. W. et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology** v.50, p. 415–429, 2004a.

CROUS, P. W. et al. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. **Studies in Mycology**, v.50, p. 457–469, 2004b.

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

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic lineages in the *Capnodiales*. **Studies in Mycology**, v. 64, p. 17–47, 2009a.

CROUS, P. W. et al. Unraveling *Mycosphaerella*: do you believe in genera? **Persoonia**, v. 23, p. 99–118, 2009b.

CROUS, P.W. et al. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 37–114, 2013.

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

FUCKEL, K. W. G. L. Fungi Rhenani exsiccati. **Hedwigia**, Fasc. I-IV, v. 2, p. 132–136, 1863.

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 rd 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, July, 2001.

GROENEWALD, J. Z. et al. *Cercospora* speciation and host range. In: *Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet and Related Species*. APS Press, Minnesota, USA, 2010.

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, June, 2013.

HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy: a how-to manual**. 4th ed. Sunderland (MA), 2011. v. XIV, 282p.

HALL, B. G. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA, **Mol. Biol. Evol.**, p. 1-7, March, 2013.

HILLIS, D. M. e BULL, J. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. **Systematic Biology**, v. 42, n. 2, p. 182-192, 1993.

INGLIS, P. W. et al. Molecular markers for the characterization of Brazilian *Cercospora caricis* isolates. **Current Microbiology**, v. 42, p. 194–198, 2001.

LUSCOMBE, N. M.; GREENBAUM, D. & GERSTEIN, M. What is bioinformatics? An introduction and overview. **Int. Med. Informatics Yearbook**, p. 83-100, 2001.

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. 20 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 em: <<http://www.fundacaoprocafe.com.br/>> Acesso em: 31 jan. 2016.

MCNEILL J. et al. **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants** (Melbourne Code). Reino vegetal n. 154, Koeltz Scientific Books, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Saiba mais: Culturas, Café**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais> >. Acesso em 25 jan. 2016.

MORRIS, M. J. & CROUS, P. W. New and interesting records of South African fungi - Cercosporoid fungi from weeds. **South African Journal of Botany**, v. 60, p. 325–332, 1994.

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

NOACK, F. Die Krankheiten des Kaffeebaumes in Brasilien. **Z Pflkrankh Pflschutz**, v. 11, p. 196–203, 1901.

PAIVA, B. R. T. L. et al. Progress of *Cercospora* leaf spot in coffee under different irrigation management systems and planting densities. **Coffee Science**, v. 8, n. 2, p. 158-167, Lavras, 2013.

PRAVEENA, R. & NASEEMA, A. Fungi occurring on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) in Kerala. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 42, p. 21–23, 2004.

PRETORIUS, M. C. et al. Phylogeny of some cercosporoid fungi from Citrus. **Sydowia**, v. 55, p. 286–305, 2003.

QUAEDVLIEG, W. et al. Introducing the Consolidated Species Concept to resolve species in the *Teratosphaeriaceae*. **Persoonia**, v. 33, p. 1–40, 2014.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539 e 542, 2012.

SANTOS, F. D. S. et al. Organic fertilization, nutrition and the progress of brown eye spot and rust in coffee trees. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 7, p.783-791, 2008.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 1, p. 6-11, 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, 2012.

SOUZA, A. G. C. et al. A time series analysis of brown eye spot progress in conventional and organic coffee production systems. **Plant Pathology**, v. 64, n.1, p.157-166, 2015.

STEWART, E. L. et al. Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. **Mycological Research**, v. 103, p. 1491–1499, 1999.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TESSMANN, D. J. et al. A molecular characterization of *Cercospora* species pathogenic to water hyacinth and emendation of *C. piaropi*. **Mycologia**, v. 93, p. 323–334, 2001.

VERKLEY, G. J. M. et al. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA. **Mycologia**, v. 96, p. 558–571, 2004.

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.

**ARTIGO - *Cercospora coffeicola*: FILOGENÉTICA MOLECULAR,
EPITIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DE UMA NOVA
SINTOMATOLOGIA DA ESPÉCIE**

RESUMO

O hyphomycete *Cercospora coffeicola*, agente etiológico da Cercosporiose do cafeeiro, ocasiona perdas significativas na produção do grão. Mesmo assim, a espécie não possui uma taxonomia bem definida. A descrição original do patógeno é incipiente e baseada apenas em características morfológicas. Devido a sua importância, são necessários estudos moleculares, fundamentados no material genético da espécie. O que permitiria confirmar a identidade do patógeno. Desta forma, este estudo objetivou solucionar a questão taxonômica de *C. coffeicola* e averiguar se apenas uma espécie é responsável por causar dois sintomas distintos em lavouras cafeeiras. Simultaneamente, objetivou-se epitificar a espécie. Para isso, análises filogenéticas foram realizadas utilizando a estratégia definida como a mais efetiva na distinção de espécies do gênero *Cercospora*: a abordagem multi-locos. Foram contrastadas, sequências parciais de DNA de dezenove isolados de *C. coffeicola*, derivadas da região do espaço interno transcrito (ITS) juntamente com o gene 5.8S do nrRNA, e de genes codificadores das seguintes proteínas: Actina (ACT), Calmodulina (CAL), Histona H3 (HIS) e Fator de alongação (TEF-1 α). Os isolados analisados eram oriundos dos cinco estados que mais produzem café no Brasil: Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo e Bahia. Além de análises filogenéticas, características morfológicas foram analisadas para verificar possíveis variações entre os isolados. Após a montagem da árvore filogenética combinada observou-se a formação de um grupo monofilético, evidenciando a existência de uma única espécie de *C. coffeicola*. Posteriormente, foram designados isolados tipo e parátipo como representantes da espécie. Sequências geradas neste estudo estão disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI) e foram substanciais para elucidar a taxonomia da espécie *C. coffeicola* no gênero *Cercospora*. Após o esclarecimento da taxonomia da espécie e disponibilização de dados moleculares relacionados a esta, foi possível adquirir conhecimentos fundamentais sobre o patógeno, que irão proporcionar que outros estudos sejam realizados com o fungo.

Palavras chave: cercosporiose do cafeeiro, mancha-do-olho-pardo, cercospora negra, *Coffea arabica*

ABSTRACT

The hyphomycete *Cercospora coffeicola*, etiological agent of the Brown-eye-spot on coffee, causes significant losses in grain production. Even so, the specie had not a taxonomy well defined. The first description was incipient and based only on morphological characteristics. Because of their importance, molecular studies was required, based on genetic material of the specie. Only so, the pathogen's identity could be confirmed. Thus, this study aimed to solve the taxonomic question of *C. coffeicola* and check if, only a species was responsible for causing two symptoms in coffee plantations. Other goal was epitify the specie. For this, phylogenetic analyzes were performed using a strategy defined as the most effective in distinguishing species in the genus *Cercospora*: A multi-locos approach. Were contrasted partial DNA sequences of nineteen isolates of *C. coffeicola* derived from the region of internal transcribed space (ITS) together with the 5.8S gene to nrRNA, and genes encoding the following proteins: actin (ACT), calmodulin (CAL), histone (HIS) and elongation factor (TEF-1 α). The isolates analyzed were coming from the five states que produce more coffee in Brazil: Minas Gerais, Sao Paulo, Parana, Espirito Santo and Bahia. Besides phylogenetic analyzes, morphological characteristics were analyzed to verify possible variations between isolates. After the assembly of the combined phylogenetic tree a monophyletic group there was found. Getting evidenced the existence of a single species of *C. coffeicola*. Subsequently strains type and paratype was designated as representatives of the specie. Sequences generated in this study are available on GenBank data base (NCBI) and were substantial to elucidate the taxonomy of the specie *C. coffeicola* in the genus *Cercospora*. After clarify the taxonomy of the specie and provide molecular data related, it was possible to acquire important knowledge about the pathogen, which will provide further studies are carried out with the fungus .

Key words: Cercospora leaf spot, brown-eye-spot, black-cercospora , *Coffea Arabica*.

1 INTRODUÇÃO

O Gênero *Cercospora* é, atualmente, um dos maiores e mais heterogêneos gêneros de hyphomycetes (CROUS & BRAUN 2003). Desde a descrição de *Cercospora*, a taxonomia deste gênero juntamente com a descrição individual de espécies tem sido uma problemática relevante (BAKHSHI et al., 2015). Espécies de *Cercospora* são comumente associadas a manchas foliares, mas podem também, serem relacionadas a lesões necróticas em flores, frutos e sementes (SILVA & PEREIRA, 2008).

Em plantações de café, a espécie *Cercospora coffeicola*, agente etiológico da Cercosporiose do cafeeiro (“Brown-eye-spot” - BES) causa perdas significativas nas lavouras onde se instala. No Brasil, maior produtor e exportador do grão (FAO, 2013), dependendo da estação e da região em que se encontra a lavoura, a cercosporiose pode ocasionar perdas na produção superiores a 30% (SOUZA et al., 2015).

Mesmo sendo economicamente importante para a cafeicultura, poucos estudos têm sido desenvolvidos com o patógeno. A taxonomia da espécie constituía uma das importantes questões a serem esclarecidas, já que, o primeiro relato do fungo foi feito em 1881, na Jamaica (COOKE 1881), e desde então, a caracterização desta espécie tem se mantido incerta. A espécie já teve diversos sinônimos, tais como: *Ramularia goeldiana* Sacc. (1892), *Cercospora coffeae* Zimm (1904) e *Cercospora herreraana* Farneti (1904) e tinha *Mycosphaerella coffeicola* (Cooke) definido como seu estágio sexual J.A. Stev. & Wellman (1944). Os espécimes da primeira descrição estavam incorporados no herbário correspondente aos códigos Herb IMI 846 (ex-type) e Herb IMI 268439 (isotype).

No entanto, todo este material original era rudimentar e datava de 1880, sendo insuficiente para permitir o reconhecimento e comparação de novas

espécies. Com relatos atuais de novos sintomas em lavouras cafeeiras atacadas por *Cercospora*, tornou-se ainda mais necessário compreender a real identidade desta espécie. A maior parte dos cafezais acometidos pela doença apresenta o sintoma típico, que segundo Souza et al. (2015), aparece nas folhas como pontuações necróticas com centros de cores claras cercados por um anel púrpura-marrom com halos amarelos.

Já os sintomas atípicos são mais destrutivos e têm sido observados em plantações de café concomitantemente com os sintomas convencionais. As lesões na planta, diferentemente das lesões convencionais, aparecem irregulares e escuras. Nelson (2008), estudando os diferentes sintomas, descreveu que essa variação poderia estar ocorrendo devido a variações genéticas no patógeno ou alterações ambientais.

Estas hipóteses ainda necessitam de confirmação e nenhum outro estudo foi realizado respondê-las. Groenewald et al. (2013), no maior e mais inclusivo estudo do gênero *Cercospora*, reportou a necessidade de conduzir estudos moleculares com *C. coffeicola*. Neste estudo, o autor mostra a ineficiência da separação de espécies do gênero via morfologia e define a melhor estratégia para identificação de espécies de *Cercospora*.

Dessa forma, o proposto deste trabalho foi caracterizar com base em dados moleculares a espécie *C. coffeicola* Berk. & Cooke (1881) e, posteriormente, epitificá-la. Para isso, foram investigados isolados provenientes de 5 regiões distintas do Brasil, que ocasionavam os dois tipos de sintomas anteriormente citados. De forma pontual, objetivamos: (i) Constituir uma coleção representativa de isolados de *Cercospora* obtidos a partir de folhas de café que apresentavam os dois tipos de sintomas nas principais regiões produtoras de café do Brasil; (ii) Verificar a posição filogenética de isolados pertencentes ao gênero *Cercospora* utilizando dados de sequências de cinco locos gênicos: Espaço Interno Transcrito (ITS), Fator de Elongação 1- α (TEF1-

α), Actina (ACT), Calmodulina (CAL) e Histona H3 (HIS); (iii) Epitificar *Cercospora coffeicola*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados Fúngicos e condições das culturas

Foram utilizados neste estudo isolados de *Cercospora coffeicola* obtidos de folhas de café (*Coffea arabica*) com sintomas típicos (BES) e atípicos (BS) de Cercosporiose, oriundos das principais regiões produtoras do Brasil (MG, SP, BA, ES e PR) (Tabela 1). O isolamento foi realizado pela metodologia descrita por Santos et al. (2014): 20-30 μ L de água destilada estéril foram adicionados sobre a lesão afim de atingir as estruturas reprodutivas do fungo. Com o auxílio de uma agulha estéril, realizou-se uma delicada raspagem na superfície foliar, para que as estruturas reprodutivas ficassem dispersas em água. Em seguida, a água depositada na lesão foi retirada com o auxílio de uma pipeta e a suspensão transferida imediatamente para uma placa de Petri contendo o meio de cultura Malte (20 g de malte, 20 g de ágar e 1L de água). A suspensão foi imediatamente espalhada sobre toda a superfície da placa com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril. Por fim, as placas foram incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 horas, à 25 °C durante 72 horas, onde foi possível realizar a identificação das colônias de *C. coffeicola* para obtenção de culturas puras. Culturas monospóricas de *C. coffeicola* foram transferidas para o meio de cultura V8® (100 mL V8®, 900 ml de água destilada, 17 g de ágar e 2 g de carbonato de cálcio) e mantidas a 20°C para posterior uso e preservação. Todos os isolados se encontram criopreservados a -80°C em glicerol (15%) na Coleção Micológica de Lavras (CML) do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Tabela 1 Detalhes das coleções e códigos de acesso (GenBank) de isolados incluídos neste estudo.

Espécie	Código de Acesso	ITS⁷	TEF⁷	ACT⁷	CAL⁷	HIS⁷	Origem Geográfica	Referências
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML2984 ¹ (BES)	KU2037 39	KU203 758	KU203 682	KU203 701	KU203 720	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML2985 ^(BS)	KU2037 43	KU203 762	KU203 686	KU203 705	KU203 724	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML2986 ^(BES)	KU2037 33	KU203 752	KU203 676	KU203 695	KU203 714	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML2988 ^(BES)	KU2037 46	KU203 765	KU203 689	KU203 708	KU203 727	Espírito Santo - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML2990 ^(BS)	KU2037 38	KU203 757	KU203 681	KU203 700	KU203 719	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3342 ^(BES)	KU2037 45	KU203 764	KU203 688	KU203 707	KU203 726	Bahia - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3376 ^(BS)	KU2037 40	KU203 759	KU203 683	KU203 702	KU203 721	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3391 ^(BES)	KU2037 41	KU203 760	KU203 684	KU203 703	KU203 722	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3392 ^(BES)	KU2037 35	KU203 754	KU203 678	KU203 697	KU203 716	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3393 ^(BES)	KU2037 48	KU203 767	KU203 691	KU203 710	KU203 729	Paraná - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3394 ^(BES)	KU2037 51	KU203 770	KU203 694	KU203 713	KU203 732	São Paulo - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3395 ^(BES)	KU2037 50	KU203 769	KU203 693	KU203 712	KU203 731	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3396 ^(BES)	KU2037 47	KU203 766	KU203 690	KU203 709	KU203 728	Espírito Santo - Brasil	Este estudo

Espécie	Código de Acesso	ITS⁷	TEF⁷	ACT⁷	CAL⁷	HIS⁷	Origem Geográfica	Referências
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3397 ^(BES)	KU2037 36	KU203 755	KU203 679	KU203 698	KU203 717	Bahia - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3398 ^(BES)	KU2037 42	KU203 761	KU203 685	KU203 704	KU203 723	Espírito Santo - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3399 ^(BES)	KU2037 37	KU203 756	KU203 680	KU203 699	KU203 718	Paraná - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3412 ^(BES)	KU2037 44	KU203 763	KU203 687	KU203 706	KU203 725	Minas Gerais - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3413 ^(BS)	KU2037 49	KU203 768	KU203 692	KU203 711	KU203 730	Bahia - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora coffeicola</i>	CML3414 ^(BES)	KU2037 34	KU203 753	KU203 677	KU203 696	KU203 715	São Paulo - Brasil	Este estudo
<i>Cercospora alchemillicola</i>	CPC 5259 ²	JX1435 25	JX1432 79	JX1430 33	JX1427 87	JX1425 41	Auckland - Nova Zelândia	Groenewald et al., 2013.
<i>Cercospora fagopyri</i>	CBS 132623 ³	JX1435 94	JX1433 52	JX1431 06	JX1428 60	JX1426 14	Yangpyeon - Coréia do Sul	Groenewald et al., 2013.
<i>Cercospora cf. ipomoae</i>	CBS 132639	JX1436 16	JX1433 75	JX1431 29	JX1428 83	JX1426 37	Kagawa - Japão	Groenewald et al., 2013.
<i>Cercospora kikuchii</i>	CBS 128.27	DQ8350 70	DQ835 088	DQ835 107	DQ835 134	DQ835 161	Japão	Groenewald et al., 2013.
<i>Cercospora cf. sigesbeckiae</i>	CBS 132601	JX1436 50	JX1434 09	JX1431 63	JX1429 17	JX1426 71	Chuncheon - Coréia do Sul	Groenewald et al., 2013.
<i>Cercospora zebrina</i>	CBS 118790	JX1437 47	JX1435 09	JX1432 63	JX1430 17	JX1427 71	Austrália	Groenewald et al., 2013.
<i>Cercospora sp. P</i>	MUCC 771 ⁴	JX1437 16	JX1434 75	JX1432 29	JX1429 83	JX1427 37	Okinawa - Japão	Groenewald et al., 2013.
<i>Cercospora sp. Q</i>	CBS 132679	JX1437 26	JX1434 85	JX1432 39	JX1429 93	JX1427 47	México	Groenewald et al., 2013.

Espécie	Código de Acesso	ITS⁷	TEF⁷	ACT⁷	CAL⁷	HIS⁷	Origem Geográfica	Referências
<i>Cercospora</i> sp. Q	CBS 132682	JX1437 28	JX1434 87	JX1432 41	JX1429 95	JX1427 49	Tamaulipas - México	Groenewald et al., 2013.
<i>Mycosphaerella coffeicola</i>	CIRAD 1722 ⁵	DQ0193 70	-	-	-	-	Desconhecida	Feau et al., 2006.
<i>Mycosphaerella coffeicola</i>	IBLF004 ⁶	HM210 796	-	-	-	-	São Paulo - Brasil	Dell' Acqua et al., 2011.
<i>Mycosphaerella coffeicola</i>	IBLF199	HM210 798	-	-	-	-	Minas Gerais - Brasil	Dell' Acqua et al., 2011.
<i>Mycosphaerella coffeicola</i>	IBLF206	HM210 799	-	-	-	-	Minas Gerais - Brasil	Dell' Acqua et al., 2011.
<i>Septoria provencialis</i>	CBS 118910	DQ3030 96	JX1435 22	JX1432 76	JX1430 30	JX1427 84	França	Groenewald et al., 2013.

¹ CML = Coleção Micológica de Lavras, Dpto.de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

² CPC = Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS ³ CBS = CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands ⁴ MUCC = Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan

⁵ CIRAD = Provided by J. Carlier, CIRAD, Montpellier, France ⁶ IBFL = Instituto Biológico Laboratório de Fitopatologia, Campinas, SP, Brasil

⁷ ACT: actin; HIS: histone H3; CAL: calmodulin; ITS: internal transcribed spacers and intervening 5.8S nrDNA; TEF1- α : translation elongation factor 1-alpha

(BES) Brown-eye-spot: Isolados que apresentavam sintomas convencionais da doença.

(BS) Black-spot: Isolados que apresentavam sintomas de Cercosporiose Negra.

Sequências recém-depositadas estão destacadas em negrito.

2.2 Extração de DNA, amplificação e edição de sequências

O DNA genômico foi isolado a partir do micélio fúngico de colônias crescidas em meio Malte líquido 2%, seguindo o protocolo do kit comercial de purificação de DNA genômico Wizard® (Promega, Madison, EUA). Cinco locos gênicos de todos os isolados foram sequenciados. Os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) foram utilizados para amplificar regiões do espaço interno transcrito, bem como o gene que codifica o 5.8S rRNA. Parte do gene que codifica para a proteína Actina (ACT) foi amplificado com o conjunto de *primers* ACT-512F e ACT-783R (CARBONE & KOHN, 1999) e parte do gene Fator de Elongação 1-alpha (TEF-1 α) com o conjunto EF1-728F e EF1-986R (CARBONE & KOHN, 1999). Já para amplificar partes dos genes que codificam para as proteínas Calmodulina (CAL) e Histona H3 (HIS) foram utilizados, respectivamente, os conjuntos CAL-228F e CAL-737R (CARBONE & KOHN 1999) e CylH3F e CylH3R (CROUS et al., 2004a). Todos os *primers* utilizados neste estudo estão disponíveis na Tabela 2. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems®). Foram utilizadas as mesmas condições de reação para todas as regiões, exceto quanto a temperatura de anelamento. As condições utilizadas foram: Um passo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30' a 95 °C, 30' a 52 °C (para ACT); 53 °C (para HIS); 49 °C (para CAL); 60 °C (para ITS); 48 °C (para TEF1 - α) e 45' a 72 °C, finalizando com 5 minutos a 72 °C. Os amplicons foram separados por eletroforese a 80V por 60 minutos e visualizados sob luz UV em géis de agarose 1% corados com Gel Red (Biotium, Hayward, USA). Posteriormente, os amplicons foram purificados com o kit de purificação Wizard SV gel e PCR Clean-Up System (Promega), seguindo recomendações do fabricante, e enviados para serem sequenciadas pela empresa Macrogen – USA, prestadora deste serviço. As sequências consenso,

foram computadas a partir das sequências *forward* e *reverse* obtidas com o auxílio do software SeqAssem versão 07/2008 (SequentiX - DNA Digital Processamento, Klein Raden, Alemanha). A ferramenta Clustal W do software MEGA 6.06 (TAMURA et al. 2011) foi utilizada para alinhar e montar os alinhamentos múltiplos das sequências deste estudo com sequências de materiais de referência obtidas no GenBank (Tabela 1), correspondentes a *Cercospora* spp. (GROENEWALD et al, 2013) e *Cercospora* do café (DELL 'ACQUA et al., 2011, FEAU et al, 2006;).

Tabela 2 Detalhes dos *primers* utilizados neste estudo

Nome do Primer	Sequência (5' – 3')	Orientação	%G C	Tm (°C)	Star t	En d	Referência
Actina							
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	<i>Foward</i>	60.0	51.4	244	263	Carbone & Kohn (1999)
ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	<i>Reverse</i>	55.0	47.6	544	563	Carbone & Kohn (1999)
Calmodulina							
CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTC CC	<i>Foward</i>	59.1	49.2	2	23	Carbone & Kohn (1999)
CAL-737R	CATCTTTCTGGCCATCATGG	<i>Reverse</i>	50.0	43.4	439	458	Carbone & Kohn (1999)
Histona							
CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	<i>Foward</i>	61.1	47.6	28	45	Crous et al. (2004a)
CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG	<i>Reverse</i>	55.0	46.6	361	380	Crous et al. (2004a)
Espaço Interno Transcrito							
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	<i>Foward</i>	63.2	49.5	2162	218 0	White et al. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	<i>Reverse</i>	45.0	41.6	2685	270 4	White et al. (1990)
Fator de Elongação 1α							
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAG G	<i>Foward</i>	50.0	42.2	306	325	Carbone & Kohn (1999)
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	<i>Reverse</i>	45.0	40.9	584	603	Carbone & Kohn (1999)

2.3 Análises filogenéticas

Sequências de *Septoria provencialis* (isolado CBS 118.910) foram selecionadas como *outgroup* com base em estudos filogenéticos similares (GROENEWALD et al., 2013), viabilidade e relações filogenéticas com *Cercospora* (CROUS et al., 2004b, 2006). Árvores de máxima parcimônia foram inferidas com MEGA 5.1 para cada gene. O suporte do clado foi inferido a partir de 1000 replicações de *bootstrap* (HILLIS & BULL, 1993). Análises filogenéticas Bayesianas foram inferidas pelo *software* Mr. Bayes 3.2 (RONQUIST et al. 2012) para calcular probabilidades posteriores do conjunto de dados ACT-CAL-HIS-TEF1- α -ITS. Modelos de evolução das sequências para cada região foram determinados utilizando jModeltest2 (DARRIBA et al., 2012). Os modelos escolhidos nos critérios de informação Bayesiana foram: Modelo TPM + G para ACT, HK + G para HIS, TRN + I + G para CAL e K80 + G para ITS e TEF1- α . A reconstrução filogenética foi realizada com base em critérios individuais para o alinhamento do conjunto de dados combinados. Os limites dos genes foram 01 -194 pb para ACT, 195-502 bp para CAL, 503-865 bp para HIS, 866-1316 pb para ITS e 1317-1608 pb para TEF1- α . Algoritmos Markov Chain Monte Carlo de quatro cadeias foram executados para 1×10^6 gerações e amostrados a cada 100 gerações. A árvore consenso foi construída após o descarte de 25% das árvores iniciais. As árvores filogenéticas foram visualizadas utilizando *figtree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e editadas no *software* Corel Draw X7. Todas as sequências geradas neste estudo foram depositadas no GenBank (Tabela 1) e os alinhamentos no TreeBASE (<http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S18549?X-accesscode=ce9d5797806b53c38a85cdaa3f4e8e7d&format=html>).

2.4 Análises morfológicas

Conídios e conidióforos foram obtidos a partir da metodologia descrita por Souza et al. (2011), com algumas modificações: Oito discos miceliais (0.5 cm de diâmetro) retirados das bordas da colônia fúngica foram transferidos para Erlenmeyers de 125mL contendo 20 mL de meio V8® (100 mL V8® adicionados em 900 mL de água destilada). Estes foram mantidos sob agitação constante (120 rpm) a 25°C. Após 4 dias, o conteúdo de cada *Erlenmeyer* foi vertido em placas de Petri contendo ágar-água a 1,5%. As placas foram mantidas abertas a 40 cm de distância de lâmpadas fluorescentes de 40W, distribuídas a fim de propiciar uma intensidade de luz de 165,3 $\mu\text{mol/s/m}^2$. As condições de incubação foram de fotoperíodo de 12h a 25°C. Após a desidratação do meio de cultura (Aproximadamente 4 dias de incubação), 10 mL de água destilada foram adicionados em cada placa, e a colônia foi raspada com o auxílio de uma haste de vidro. A suspensão foi então, filtrada em gaze estéril e a solução com as estruturas de interesse foi obtida. A descrição das características morfológicas de *C. coffeicola* foi realizada com estruturas morfológicas *in vitro* comumente utilizadas na caracterização de espécies do gênero. As estruturas foram analisadas a partir da montagem de lâminas individuais e medições das estruturas morfológicas de cada um dos isolados. As observações e medições das dimensões das estruturas foram feitas com um microscópio de Epifluorescência modelo DM 2000 (Leica) com a magnitude de 40x.

3 RESULTADOS

3.1 Análises filogenéticas

Sequências de DNA de ACT, HIS, CAL, ITS e TEF1- α continham aproximadamente 194, 307, 362, 455 e 293 pares de bases, respectivamente. Estes tamanhos são similares ao tamanho de sequências correspondentes encontradas em estudos realizados previamente (GROENEWALD et al., 2005, 2010). As filogenias de todos os genes foram avaliadas individualmente utilizando o método da Máxima Parcimônia, observou-se a formação de um grupo monofilético juntamente com o isolado de referência de *Coffea arabica* do Japão (isolado MUCC 771) nas árvores filogenéticas de ACT e HIS (Figura 4 e Figura 5 – Material suplementar). Nas demais árvores filogenéticas, isolados de *Cercospora* do café se agruparam com isolados de referência (GROENEWALD et al., 2013). Na árvore de CAL (Figura 6 – Material suplementar), isolados de café se agruparam com *Cercospora* sp. lineage Q (CBS132679 e CBS132628; GROENEWALD et al., 2013) e *C. alchemillicola* (CPC 5259 isolado tipo). Na árvore gerada com sequências de TEF1- α (Figura 7 – Material suplementar), isolados do café se agruparam com *Cercospora* sp. lineage Q, *C. kikuchii* (CBS 128.27) e *C. cf. sigesbeckiae* (CBS132601). A árvore de ITS (Figura 8) mostrou que isolados do café foram dispostos em dois grupos, um composto por *Mycosphaerella coffeicola* (Feau et al., 2006; Dell' Acqua et al., 2011), *Cercospora* sp. lineage Q (CBS 132682 e 132679) e outro por *C. alchemillicola*, *C. fagopyri* (CBS 132623), *C. cf. ipomoeae* (MUCC 442) e *C. zebrina* (CBS 118790). A árvore combinada das sequências de ACT- CAL- HIS- TEF1- α - ITS foi congruente com a tipologia das árvores de ACT e HIS, e mostrou que isolados do café formam um grupo monofilético, com um bom suporte, distinto de outras espécies de *Cercospora* (Figura 1).

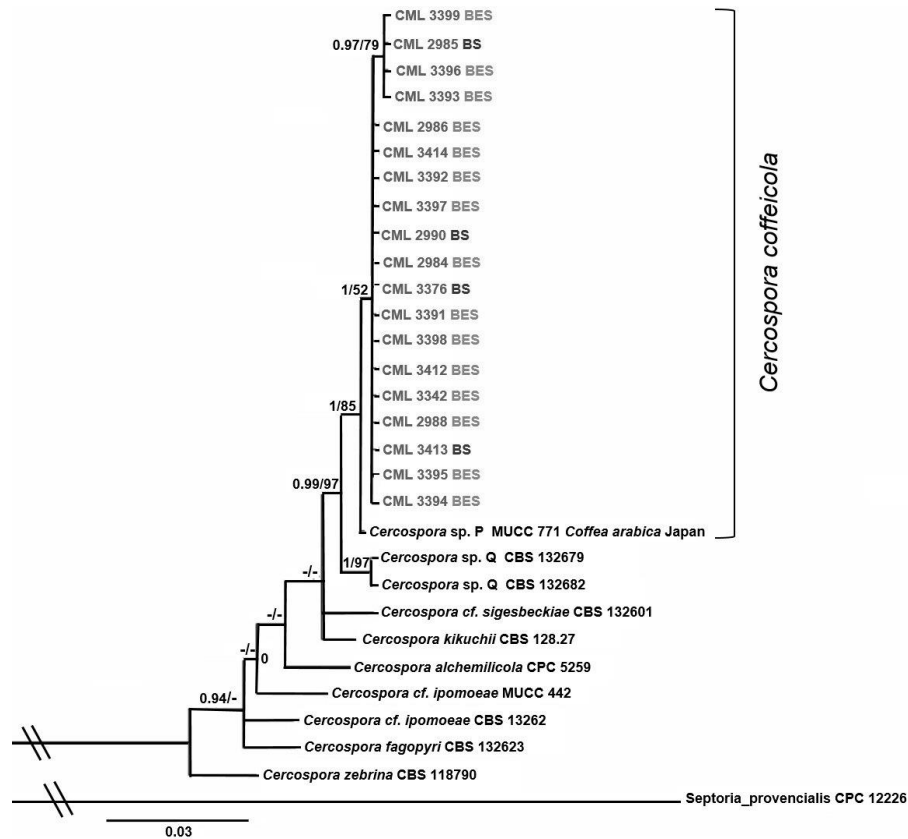


Figura 1 Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise combinada de cinco regiões gênicas – Probabilidade posterior ≥ 0.90 e valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia $\geq 50\%$ estão acima dos nós. CI = 0.797, RI = 0.790 nas análises de Máxima Parcimônia. Esta árvore foi enraizada com sequências de *Septoria_provincialis* (strain CPC 12226). Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS.

3.2 Análises morfológicas

As estruturas morfológicas (Figura 2 **Error! Reference source not found.**) analisadas foram: Conidióforos, que se apresentavam agregados, com coloração castanho claro e dimensões entre 30-140 x 4-7 μm , apresentando de 0-4 septos; e conídios que se apresentavam solitários, hialinos, cilíndricos, apresentando dimensões entre 51-270 x 1-5 μm , possuindo de 0-9-septos. Colônias de *C. coffeicola* em meio V8[®], exibiram uma coloração arroxeada com micélio aéreo branco/bege, atingindo 20 mm de diâmetro após duas semanas. Colônias obtidas a partir de folhas com sintomas típicos e atípicos da doença apresentaram as mesmas características quando isolados em placas de Petri, se mostrando indistinguíveis com base em morfologia/aspecto da colônia.

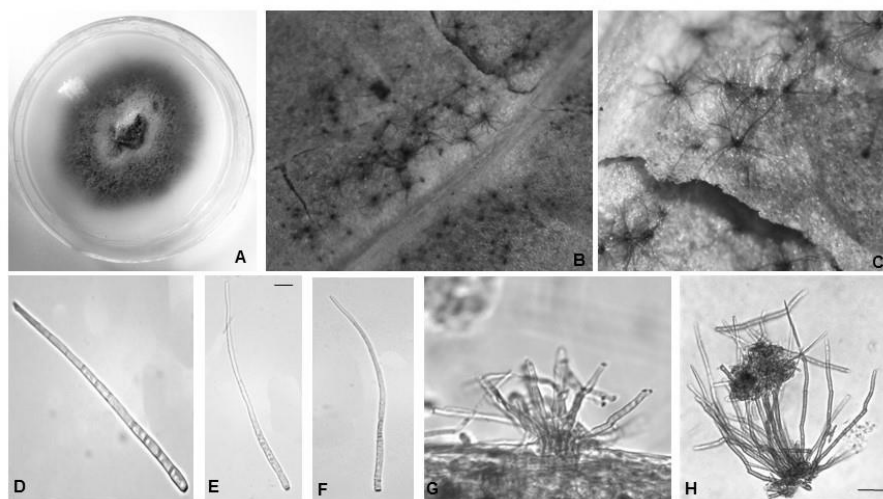


Figura 2 Características morfológicas de *Cercospora coffeicola*. A. Colônia monospórica de *Cercospora coffeicola*. B-C. Aproximação das lesões com foco em estruturas reprodutivas do patógeno. D-F. Conídios. G-H. Conidióforos. Barra de escala = 10 μm .

Espécimes de culturas frescas de todos os isolados do estudo, isolado tipo e parátipo foram armazenadas e estão disponíveis na Coleção Micológica de

Lavras (CML) do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, situado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As análises morfológicas, juntamente com as de filogenia molecular permitiram a classificação de *C. coffeicola* como uma única espécie filogenética pertencente ao gênero *Cercospora* podendo causar dois tipos de sintomas, BES e BS (Figura 3), nos cafezais brasileiros.

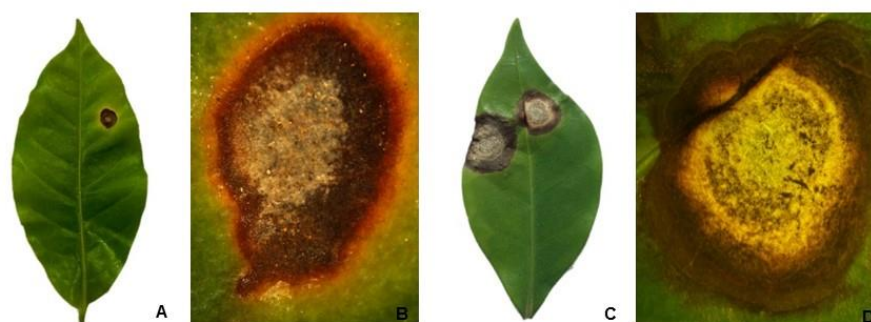


Figura 3 – Sintomas foliares ocasionados por *Cercospora coffeicola*. - A. Sintoma convencional “Brown-eye-spot – BES”. B. Aproximação da lesão convencional. C. Sintoma atípico “Black spot – BS”. D. Aproximação da lesão atípica.

Holotype: Jamaica, 1881, Berkeley & Cooke B.D. MycoBank (MB191536).

Epitype: O isolado CML 2984, foi designado como epítipo da espécie, em função de sua virulência. Responsável pela coleta: César Elias Botelho. Local da coleta: Bonfinópolis de Minas, MG – Brasil. Sintomatologia: Convencional (BES).

Paratype: O isolado CML 2985, foi designado como parátipo da espécie, já que apresentava a sintomatologia atípica da doença. Responsável pela coleta: Leandro Alvarenga Santos. Local da coleta: Três Pontas, MG – Brasil. Sintomatologia: *Cercospora* negra (BS).

Descrição dos sintomas: Os sintomas de BES aparecem nas folhas como pontuações necróticas com centros de cor clara, circundados por anéis amarelados similares a halos (Figura 3). Já os sintomas de BS aparecem nas folhas como manchas necróticas com coloração completamente escura (Figura 3). As lesões podem ser subcirculares e irregulares, apresentando grande variação no tamanho possuindo de 2-20mm de diâmetro.

4 DISCUSSÃO

Após a condução deste estudo, foi possível descartar a hipótese de variabilidade na população de *C. coffeicola*. Assim, acredita-se que variações ambientais sejam a possível causa da ocorrência dos diferentes sintomas. Nelson (2008), em um estudo comparativo de sintomas, também considerou que as diferenças poderiam ocorrer devido a variações ambientais ou populacionais.

As diferentes sintomatologias encontradas em campos de produção de café coincidem com o aumento exponencial da cercosporiose no Brasil, que ocorreu no final dos anos 2000 (SOUZA et al., 2015). Os fatores que ocasionaram este aumento, não estão totalmente elucidados, entretanto, possivelmente, incluem a expansão da cultura cafeeira de áreas tradicionais para a região do Cerrado (que apresenta solos com baixa fertilidade e severos períodos de estiagem), o cultivo de novas variedades de café, mudanças nas práticas culturais e mudanças na população de patógenos (FAZUOLI et al., 2002).

A possível variabilidade associada a mudanças na população, ou ainda, a existência de uma nova espécie pôde ser descartada após a realização deste estudo, visto que os isolados estudados formaram um grupo monofilético com isolados de referência de *Coffea arabica* do Japão – MUCC 771 (GROENEWALD et al., 2013) na árvore combinada (Figura 1) e com *Mycosphaerella coffeicola* (DELL 'ACQUA et al., 2011; FEAU et al, 2006;) na árvore de ITS.

Tais resultados evidenciaram que isolados de *Cercospora*, provenientes de diferentes localidades do país e obtidos a partir de folhas de café com os dois tipos de sintomas, pertencem à mesma espécie filogenética. Este fato pode ser considerado favorável para programas de melhoramento visando resistência ao

fungo, uma vez que, o controle de patógenos via melhoramento é facilitado em espécies com baixa ocorrência de variabilidade.

Este estudo também mostrou que a região ITS tem resolução limitada quando utilizada para comparar espécies de *Cercospora*. O mesmo, já havia sido reportado por Groenewald et al. (2013). Os locos ACT e HIS foram os mais efetivos para discriminar isolados de café de outras espécies, já que, as árvores individuais destas regiões apresentaram o mesmo padrão da árvore combinada.

Em relação à morfologia, embora não haja espécies filogeneticamente distintas, *C. coffeicola* apresenta alta plasticidade morfológica. Isso foi observado após a medição das estruturas morfológicas dos isolados, que apresentaram dimensões altamente variáveis. Por este motivo, o parâmetro morfologia deve ser considerado insuficiente para distinguir variações na espécie.

A definição de epítipo, presente no Código Internacional de nomenclatura para algas, fungos e plantas (ICN; MCNEILL et al. 2012), sugeriu a necessidade de epitificação de *Cercospora coffeicola*. O código define que um epítipo deve ser designado quando todo o material original associado a um nome publicado validamente é comprovadamente ambíguo e não pode ser criticamente identificado para efeitos da aplicação precisa do nome de um táxon. Como todo o material original de *C. coffeicola* era insuficiente para uma caracterização molecular, o fungo era passível de epitificação. Mcneill et al. (2012) definiram epítipo como um espécime ou ilustração selecionada para servir como tipo interpretativo, substituindo o holótipo, lectótipo ou neótipo designado anteriormente.

A designação de um epítipo não pode ser realizada a menos que, o holótipo, lectótipo ou neótipo se enquadre nestas condições. Como *C. coffeicola* atendia a todos estes pré-requisitos, procedeu-se a epitificação da espécie. E designou-se então, um novo representante de *C. coffeicola*, já que todo o

material original associado a um nome validamente publicado não fornecia dados suficientes para um estudo molecular bem fundamentado.

5 CONCLUSÃO

A espécie *C. coffeicola* se mostrou monofilética e pôde ser definida como uma única espécie, independentemente de sua localização geográfica ou sintomatologia.

C. coffeicola é o agente etiológico da Cercosporiose do cafeeiro (Brown-eye-spot) e da Cercosporiose Negra (Black spot).

Os melhores locos gênicos para separar isolados de *C. coffeicola* de outras espécies de *Cercospora* são Actina e Histona.

6 AGRADecIMENTOS

Esta pesquisa teve suporte do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), Fundação de amparo a pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café).

REFERÊNCIAS

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.

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

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

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

CROUS, P. W. et al. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology** v.50, p. 415–429, 2004a.

CROUS, P. W. et al. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. **Studies in Mycology**, v.50, p. 457–469, 2004b.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. II. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 99–131, 2006.

DA HORA JÚNIOR. et al. Erasing the Past: A New Identity for the Damoclean Pathogen Causing South American Leaf Blight of Rubber. **Plos one**, v.9 (8), e104750, p. 1-12, 2014.

DARRIBA, D. et al. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 27, p. 1164-1165, 2011.

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.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Top 10 countries**, 2003. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat->

gateway/go/to/browse/rankings/countries_by_commodity/E>. Acesso em 27 de janeiro de 2015.

FAZUOLI, L.C. et al. Melhoramento do cafeeiro: variedades tipo arábica obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.163-215, 2002.

FEAU, N.; HAMELIN, R. C.; BERNIER, L. Attributes and congruence of three molecular data sets: Inferring phylogenies among *Septoria*-related species from woody perennial plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution** v. 40, p. 808–829, 2006.

GROENEWALD J. Z. et al. *Cercospora* speciation and host range. In: *Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet and Related Species* (Lartey RT, Weiland JJ, Panella L, Crous PW, Windels CE, eds). **APS Press**, Minnesota, USA, p. 21–37, 2010.

GROENEWALD, J. Z. et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 115–170, 2013.

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

HILLIS, D. M. e BULL, J. An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. **Systematic Biology**, v. 42, n. 2, p. 182-192, 1993.

MCNEILL J. et al. **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants** (Melbourne Code). Reino vegetal n. 154, Koeltz Scientific Books, 2012.

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

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539 e 542, 2012.

SANTOS, L. A. et al. Nova técnica para isolar *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, agente etiológico da cercosporiose do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 1, p. 142-144, 2014.

SILVA, M. e PEREIRA, O. L. Postharvest *Cercospora apii* fruit rot disease on *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae). **Australasian Plant Disease Notes**, v. 3, p. 21–23, 2008.

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

SOUZA, A. G. C. et al. A time series analysis of brown eye spot progress in conventional and organic coffee production systems. **Plant Pathology**, v. 64(1), p. 157-166, 2015.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TO-ANUN C, HIDAYAT I, MEEBOON J. Genus *Cercospora* in Thailand: Taxonomy and phylogeny (with a dichotomous key to species). **Plant Pathology & Quarantine**, v. 1, p. 11–87, 2011.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: A Guide to Molecular Methods and Applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JW, eds). **Academic Press**, New York, p. 315–322, 1990.

MATERIAL SUPLEMENTAR

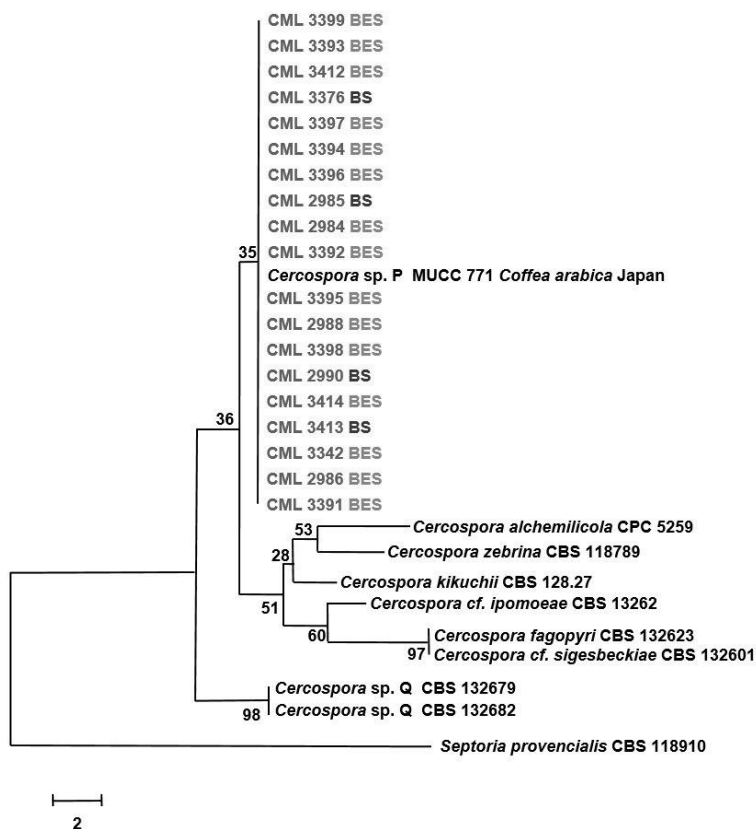


Figura 4 – Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região Actina. Probabilidade posterior ≥ 0.90 . Valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia acima dos nós. CI = 0.846, RI = 0.789 na análise de Máxima Parcimônia. Esta árvore foi enraizada com sequências de *Septoria provencialis* (strain CPC 118910). Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS. BES: Isolados com sintomas de Cercosporiose convencional. BS: Isolados com sintomas de Cercosporiose negra.

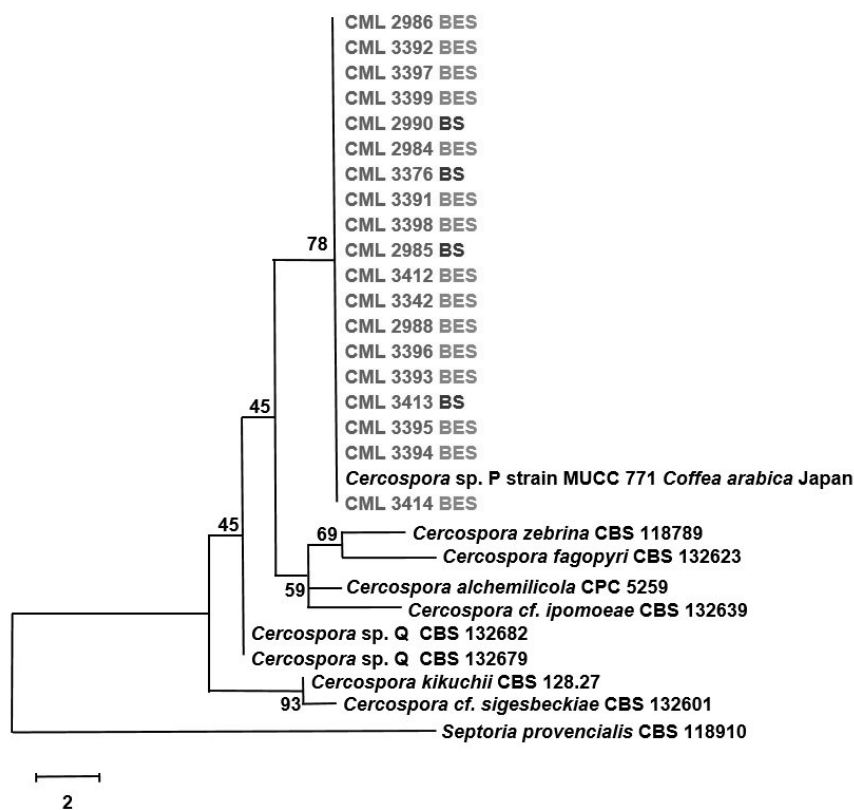


Figura 5 – Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região Histona. Probabilidade posterior ≥ 0.90 . Valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia acima dos nós. CI = 0.948, RI = 0.925 na análise de Máxima Parcimônia. Esta árvore foi enraizada com sequências de *Septoria provencialis* (strain CPC 118910). Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS. BES: Isolados com sintomas de Cercosporiose convencional. BS: Isolados com sintomas de Cercosporiose negra.

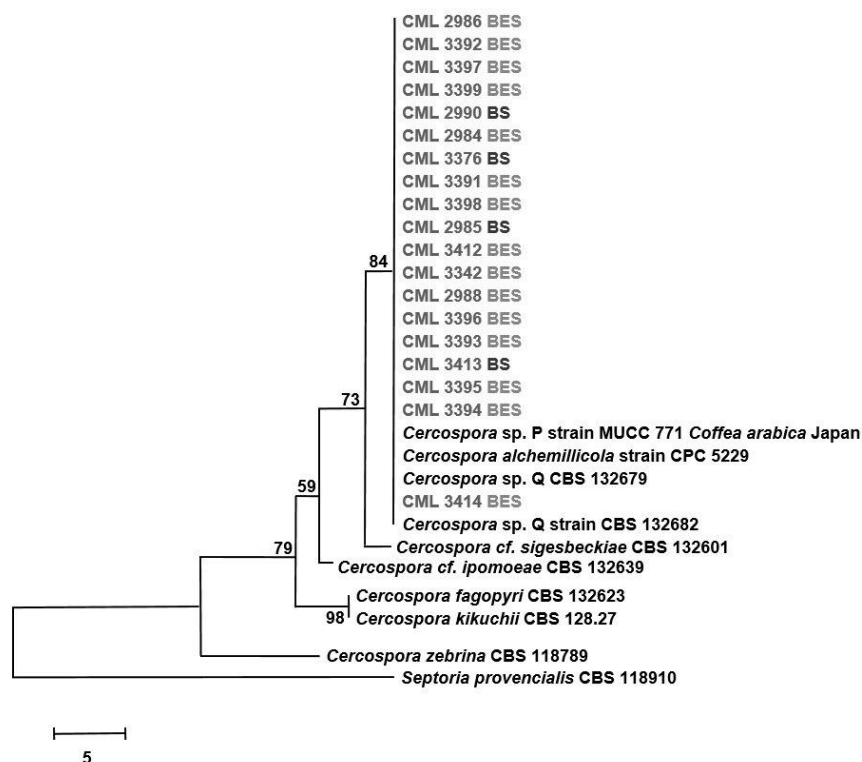


Figura 6 – Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região Calmodulina. Probabilidade posterior ≥ 0.90 . Valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia acima dos nós. CI = 0.924, RI = 0.827 na análise de Máxima Parcimônia. Esta árvore foi enraizada com sequências de *Septoria provencialis* (strain CPC 118910). Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS. BES: Isolados com sintomas de Cercosporiose convencional. BS: Isolados com sintomas de Cercosporiose negra.

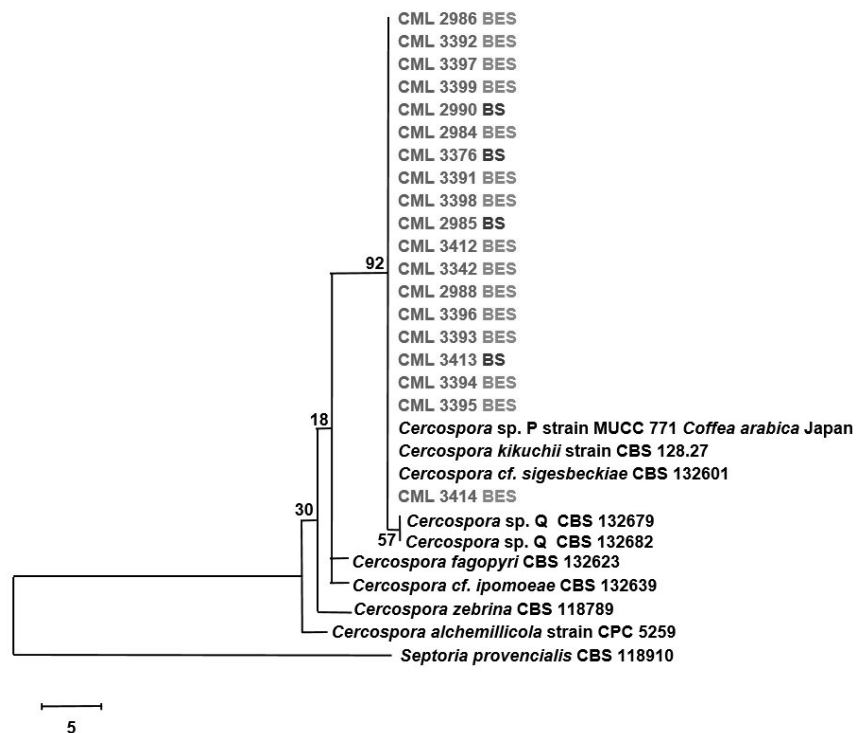


Figura 7 – Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região TEF. Probabilidade posterior ≥ 0.90 . Valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia acima dos nós. CI = 0.921, RI = 0.760 na análise de Máxima Parcimônia. Esta árvore foi enraizada com sequências de *Septoria provencialis* (strain CPC 118910). Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS. BES: Isolados com sintomas de Cercosporiose convencional. BS: Isolados com sintomas de Cercosporiose negra.

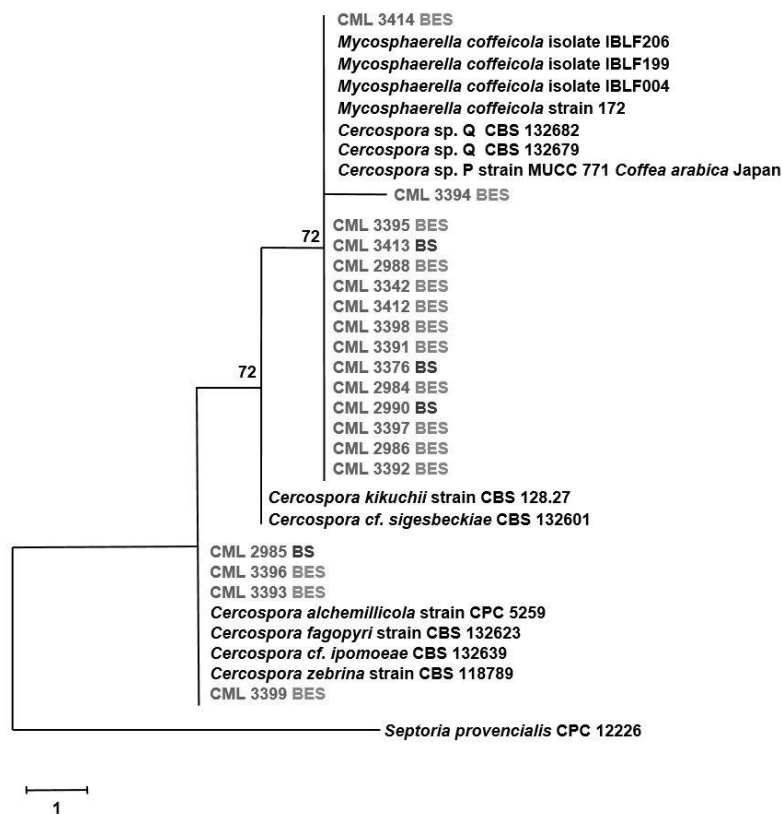


Figura 8 - Árvore de Máxima Parcimônia inferida a partir da análise da região ITS. Probabilidade posterior ≥ 0.90 . Valores de *bootstrap* da Máxima Parcimônia acima dos nós. CI = 1.0, RI = 1.0 na análise de Máxima Parcimônia. Esta árvore foi enraizada com sequências de *Septoria provencialis* (strain CPC 118910). Abreviações das coleções de culturas: CML = Coleção Micológica de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie Prefecture, Japan; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CPC: Culture collection of Pedro Crous, housed at CBS. BES: Isolados com sintomas de Cercosporiose convencional. BS: Isolados com sintomas de Cercosporiose negra.