



HUMBERSON ROCHA SILVA

**MANCHA DE *Cercospora* EM *Toona ciliata* NO
BRASIL**

LAVRAS – MG

2014

HUMBERSON ROCHA SILVA

MANCHA DE *Cercospora* EM *Toona ciliata* NO BRASIL

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

Orientador

Dr. Paulo Estevão de Souza

Coorientador

Dr. Edson Ampélio Pozza

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Silva, Humberson Rocha.

Mancha de *Cercospora* em *Toona ciliata* no Brasil / Humberson
Rocha Silva. – Lavras : UFLA, 2014.
63 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.
Orientador: Paulo Estevão de Souza.
Bibliografia.

1. *Cercospora meliicola*. 2. *C. alchemillicola*. 3. Cedro
australiano. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Cercosporina.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

HUMBERSON ROCHA SILVA

MANCHA DE *Cercospora* EM *Toona ciliata* NO BRASIL

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

APROVADA em 25 de julho de 2014.

Dra. Maria Alves Ferreira UFLA

Dra. Dulcinéia de Carvalho UFLA

Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Dr. Paulo Estevão de Souza
Orientador

LAVRAS - MG

2014

A Deus,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos, dando-me força para seguir adiante. À família, por apoiar-me incondicionalmente. Ao Departamento de Fitopatologia da UFLA, por ter-me concedido a oportunidade de realizar o mestrado. A CAPES, pela concessão da bolsa. Aos professores Paulo Estevão de Souza, Edson Ampélio Pozza e Maria Alves Ferreira, por terem apoiado e incentivado o desenvolvimento deste trabalho. Aos colegas de departamento, em especial, Aurivan, Blenda, Silvino, Maru e Sarah. À empresa Bela Vista Florestal, pela concessão de mudas para realizar este trabalho. A todos que contribuíram de alguma forma, o meu muito obrigado!

RESUMO

Este trabalho objetivou-se em relatar a ocorrência da Mancha de *Cercospora* em cedro australiano no Brasil, bem como avaliar o processo de penetração no hospedeiro e temperaturas favoráveis ao crescimento micelial e à produção da toxina cercosporina, 'in vitro'. Foram realizados os postulados de Koch para confirmar o agente causal. O fungo foi identificado, por meio de caracteres morfológicos e moleculares, utilizando-se para isso as regiões gênicas ITS e actina. Posteriormente, o estudo do processo de penetração dos isolados em folhas de cedro foi realizado sob microscopia eletrônica de varredura. Os quatro isolados apresentaram características morfológicas de *Cercospora meliicola*. Todavia, por meio de filogenia, foram agrupados com a espécie *C. alchemillicola*, formando um clado com suporte 'bootstrap' de 85%. Os isolados não penetraram no hospedeiro por meio de estômatos. Sua penetração ocorreu por ferimentos nas folhas de cedro, 12 horas após a inoculação. Também, foi constatada a contribuição do fungo *Phyllachora balansae* no desenvolvimento de ferimentos na superfície foliar, favorecendo, assim, a penetração dos isolados de *Cercospora* do cedro. Para avaliar as melhores temperaturas de crescimento micelial e produção de cercosporina, os isolados foram incubados sob temperaturas variando de 15 a 30°C. O maior crescimento micelial foi observado sob a temperatura de 24,8°C. A melhor faixa de temperatura, para produzir cercosporina, considerando os quatro isolados, variou entre 21,6 e 23°C, com picos de produção de cercosporina de até 4,84 $\mu\text{mol}\cdot\text{disco}^{-1}$.

Palavras-chave: *Cercospora meliicola*. *C. alchemillicola*. Cedro australiano. Microscopia eletrônica de varredura. Cercosporina.

ABSTRACT

This work aimed at reporting the occurrence of the *Cercospora* spot on Australian cedar in Brazil, as well as evaluating the penetrating process of the host and favorable temperatures to the mycelial growth and the production of the cercosporin toxin *in vitro*. Koch postulates were performed to confirm the causing agent. The fungus was identified, by means of morphological and molecular traits, using the ITS and actin genic regions. Subsequently, the study of the penetration process of the isolates in cedar leaves was performed under scan electronic microscopy. The four isolates presented *Cercospora meliicola* morphological traits. However, by means of phylogeny, they were grouped with the *C. alchemillicola*, forming a bootstrap supporting class of 85%. The isolates did not penetrate the host through the stomata. The penetration occurred through lesions on the cedar leaves, 12 hours after inoculation. The contribution of the *Phyllachora balansae* fungus over the development of lesions on the leaf surface was also observed, thus favoring, the penetration of the *Cercospora* isolates of the cedar. To evaluate the best temperatures for mycelial growth and production of cercosporin, the isolates were incubated under temperatures ranging from 15 to 30°C. The highest mycelial growth was observed under the temperature of 24.8°C. The best range of temperature to produce cercosporin, considering the four isolates, ranged from 21.6 to 23°C, with cercosporin production peaks of up to 4.84 $\mu\text{mol}\cdot\text{disk}^{-1}$.

Keywords: *Cercospora meliicola*. *C. alchemillicola*. Australian cedar. Scan electronic microscopy. Cercosporin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colônias de isolados de cedro australiano em meio MEA.....	37
Figura 2	Estruturas formadas por isolado obtido de cedro australiano: A) Esporodóquio formado sobre folha do hospedeiro; B) conídio em detalhe	38
Figura 3	Sintomas da Mancha de <i>Cercospora</i> em folíolos de mudas de cedro australiano, localizadas no viveiro florestal da UFLA	40
Figura 4	Sintomas da Mancha de <i>Cercospora</i> em folíolos de cedro australiano com detalhes observados em estereomicroscópio: A) hospedeiro original doente; B) hospedeiro tratado com esponja de aço e inoculado artificialmente; C) hospedeiro tratado com carborundum e inoculado artificialmente e D) hospedeiro com inóculo de <i>Cercospora</i> aplicado sobre lesões de <i>P. balansae</i>	42
Figura 5	Em A) colônia com 21 dias de idade obtida de hospedeiro original doente apresentando sintomas da Mancha de <i>Cercospora</i> ; B) colônia com 15 dias de idade reisolada de hospedeiro inoculado artificialmente	43
Figura 6	Árvore filogenética da região ITS obtida por método de máxima parcimônia, apresentando o posicionamento dos isolados obtidos de cedro australiano (HR01, HR02, HR03 e HR04), tendo <i>Septoria provencialis</i> como ‘outgroup’	44
Figura 7	Árvore filogenética da região actina obtida por método de máxima parcimônia, apresentando o posicionamento dos isolados obtidos de cedro australiano (HR01, HR02, HR03 e HR04), tendo <i>Septoria provencialis</i> como ‘outgroup’	46

Figura 8	Árvore filogenética obtida por método de máxima parcimônia com base na combinação das regiões ITS e actina, apresentando o posicionamento dos isolados obtidos de cedro australiano (HR01, HR02, HR03 e HR04), tendo <i>Septoria provencialis</i> como ‘outgroup’	48
Figura 9	Eletromicrografia de varredura da fase de penetração de isolado de <i>Cercospora</i> em folíolos de cedro australiano: A) ilustração de conídios 6 horas após inoculação; B) alongação do tubo germinativo após 18 horas, sem penetração por estômatos; C) detalhe do tubo germinativo ignorando estômato como porta de entrada; D) penetração de conídios por ferimento, observada 12 horas após a inoculação e E) visualização da superfície de peritécio de <i>P. balansae</i> causando fissuras na epiderme do folíolo de cedro australiano.....	50
Figura 10	Curva de crescimento micelial de isolados de <i>Cercospora</i> de cedro australiano (cultivados por 21 dias em MEA) em função de diferentes temperaturas de incubação (15, 19, 23, 26 e 30°C).....	52
Figura 11	Conteúdo de cercosporina produzido por diferentes isolados de <i>Cercospora</i> do cedro australiano.....	53
Figura 12	Níveis de produção de cercosporina de quatro isolados de <i>Cercospora</i> do cedro australiano quando submetidos a diferentes temperaturas.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequências de referência das regiões ITS e actina (ACT), depositadas no GenBank e utilizadas neste estudo para construir as árvores filogenéticas.....	30
Tabela 2	Dados biométricos de comprimento (C), largura (L) e número de septos (NS) por conidióforo e conídio de espécies de <i>Cercospora</i> associadas a espécies da família Meliaceae	39
Tabela 3	Crescimento micelial de isolados de <i>Cercospora</i> de cedro australiano 21 dias após a inoculação em meio de cultivo MEA	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Cedro australiano (<i>Toona ciliata</i> M. Roem. var. <i>australis</i> (F.Muell.).....	14
2.2	Gênero <i>Cercospora</i>	16
2.3	Sintomas.....	17
2.4	Penetração.....	19
2.5	Caracterização Molecular.....	20
2.6	Cercosporina.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Obtenção de isolados com base em lesões necróticas de folhas de cedro australiano.....	23
3.2	Obtenção de culturas monospóricas.....	23
3.3	Caracterização morfológica.....	24
3.4	Postulados de Koch.....	25
3.5	Caracterização molecular.....	26
3.5.1	Extração do DNA.....	27
3.5.2	Amplificação por PCR e Sequenciamento.....	28
3.5.3	Análises filogenéticas.....	29
3.6	Análise do processo de penetração por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	31
3.6.1	Inoculação do patógeno.....	31
3.6.2	Preparo das amostras.....	33
3.7	Crescimento micelial sob diferentes temperaturas.....	33
3.8	Produção de cercosporina sob diferentes temperaturas.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	Caracterização morfológica.....	36
4.2	Postulados de Koch e descrição dos sintomas.....	40
4.3	Caracterização molecular.....	43
4.4	Penetração de <i>Cercospora</i> em cedro australiano.....	49
4.5	Crescimento micelial sob diferentes temperaturas.....	51
4.6	Produção de cercosporina sob diferentes temperaturas.....	52
5	CONCLUSÕES.....	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (F.Muell.)), da família Meliaceae, tem se destacado como espécie madeireira promissora para produção de madeira nobre e por sua resistência a uma das principais pragas dos cedros nativos, a broca dos ponteiros, *Hypsipyla grandella* Zeller. Embora esta espécie seja resistente a essa praga, é necessário conhecer sobre a ocorrência de outros insetos e fitopatógenos capazes de reduzir sua produtividade, principalmente, em países como o Brasil, onde a cultura foi introduzida. Também, é importante ressaltar a grande biodiversidade deste país em vários biomas, inclusive, com espécies de meliáceas. No que diz respeito à ocorrência de doenças na cultura, *Phyllachora balansae* Speg. tem sido um fungo comumente encontrado em folhas e hastes de árvores de cedro no Brasil. Em outros países, outro grupo de fungos fitopatogênicos tem sido relatado em cedro e outras meliáceas, os fungos cercosporioides, cujos sintomas são manchas necróticas no limbo foliar, podendo causar a desfolha da planta. Porém, nas principais bases de dados não foi encontrado, até o momento, relato da ocorrência de fungos cercosporioides em cedro australiano no Brasil.

Cercospora spp. é um dos gêneros de fungos cercosporioides, descrito por Fresenius em 1863. As espécies desse gênero fitopatogênico estão distribuídas por todo o mundo, associadas a manchas foliares na maioria das famílias de plantas. Além de afetarem as folhas, também, podem causar danos em flores, frutos, brácteas, sementes e pedicelos de vários hospedeiros. Para o correto manejo de fitopatógenos, faz-se necessário o conhecimento dos processos básicos na relação patógeno-hospedeiro. Entre esses processos, a penetração é o primeiro evento necessário para o fitopatógeno estabelecer relação de parasitismo com o seu hospedeiro em etapa subsequente.

Patógenos podem penetrar nas superfícies de plantas por via direta, por meio da cutícula, rompendo a camada de cera e as células da epiderme ou por aberturas naturais e ferimentos. Alguns fungos penetram nos tecidos em apenas uma dessas formas, outros em mais de uma. Ferimentos nos tecidos do hospedeiro podem resultar da ação de fatores ambientais, por exemplo, ventos fortes em ambientes de pouca umidade ou mesmo de outros agentes patogênicos. O evento que sucede a penetração é a infecção, e o maior ou menor êxito do patógeno nessa fase dependerá da interação de parasitismo com o hospedeiro, objetivando extrair água, nutrientes e outros compostos. Geralmente o patógeno possui enzimas, hormônios e toxinas capazes de cumprir esse papel. A toxina cercosporina é uma importante substância na patogênese de espécies do gênero *Cercospora*.

A cercosporina é uma toxina fotossensibilizante que, na presença da luz, reage com o oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio, que destroem as membranas celulares das células hospedeiras, permitindo o fornecimento de nutrientes necessários para o patógeno completar o seu ciclo de vida.

Sendo assim, objetivou-se neste trabalho:

- a) Identificar o agente etiológico associado à mancha necrótica do limbo foliar do cedro australiano por meio de caracterização morfológica e análise filogenética das regiões gênicas ITS e actina.
- b) Estudar o processo de penetração do fungo por microscopia eletrônica de varredura.
- c) Avaliar a influência da temperatura sobre o crescimento micelial do fungo.
- d) Avaliar a influência da temperatura sobre o conteúdo de cercosporina produzido por meio do fungo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (F.Muell.))

O cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (F.Muell.)), também conhecido como cedrão, pertence à família Meliaceae. Trata-se de uma angiosperma arbórea de grande porte e de rápido crescimento, que pode alcançar cerca de 50 m de altura e 2,0 m de diâmetro em seu habitat natural (PINHEIRO; LANI; COUTO, 2003). Nos plantios encontrados no Brasil, as árvores atingem 20 m de altura e 1,2 m de circunferência, com potencial de incremento médio anual de $30 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ (BELA VISTA FLORESTAL, 2013; SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010). A espécie encontra-se amplamente difundida entre os paralelos 15° e 25° N situados na Índia, Bangladesh, Birmânia, Tailândia, China Meridional, Indonésia, Malásia e Filipinas (LAMPRECHT, 1990). A variedade australiana é encontrada, naturalmente, no leste da Austrália, desde Ulladulla, ao sul de Sidney, no Estado de New South Wales, até Atherton, no norte do Estado de Queensland (GRIJPMAN; RAMALHO, 1969). Embora em áreas descontínuas, o cedro australiano encontra-se difundido na América Latina, espalhando-se desde o paralelo 24° N até 10° S, compreendendo o México, a América Central, as Antilhas, as regiões setentrionais da América do Sul, o Peru e o Brasil (LAMPRECHT, 1990). O único registro da introdução da espécie no Brasil é da empresa Aracruz Celulose (ES), em 1973, denominada na época de Aracruz Florestal. Naquele ano, vários lotes de sementes de diferentes espécies de eucalipto e de outras espécies vegetais foram importados do Timor Leste e da Austrália. A empresa efetuou pequenos plantios, formando um banco de germoplasma. Em 1989, foram distribuídas mudas de cedro australiano para agricultores, escolas de ciências agrárias e demais interessados, iniciando-se, assim, a multiplicação de plantios de cedro australiano no Brasil (SOUZA;

BARROSO; CARNEIRO, 2010). A espécie encontrou ótimas condições para o seu desenvolvimento, sendo cultivada ao Sul do Estado da Bahia e em toda a região Sudeste, destacando-se os Estados de Minas Gerais e Espírito Santo (KALIL FILHO; WENDLING, 2012; PINHEIRO; LANI; COUTO, 2003). A espécie cresce em áreas com precipitação anual entre 800 e 1800 mm e dois a seis meses de seca.

Nas regiões de origem, desenvolve-se em baixas altitudes, próximo de rios e ao pé de encostas, crescendo, também, em regiões montanhosas com altitude de 1700 m (PINHEIRO; LANI; COUTO, 2003; SOUZA; BARROSO; CARNEIRO, 2010). A temperatura ideal está em torno de 20 a 26°C, sobrevivendo a temperaturas mínimas absolutas pouco abaixo de 0°C. Também, pode tolerar as geadas leves e de curta duração (LAMPRECHT, 1990).

O tronco é retilíneo e, às vezes, bifurcado. Sua casca é grossa, dura, com deiscência em placas retangulares e escamiformes, de cor marrom-acinzentado (PINHEIRO; LANI; COUTO, 2003). As folhas são alternas, paripenadas, com 25 a 45 cm de comprimento, folíolos ovais e lanceolados, opostos a subopostos e raramente alternos, com 7,5 a 20 cm de comprimento (LAMPRECHT, 1990; PINHEIRO; LANI; COUTO, 2003). É uma espécie promissora para plantações comerciais, em função da qualidade de sua madeira, sendo amplamente utilizada na indústria de contraplacados, compensados, móveis, entre outros (PINHEIRO; LANI; COUTO, 2003). O cedro australiano vem sendo plantado como cultura comercial no Estado de Minas Gerais, onde os plantios de pinus e eucalipto tem sido insuficientes para atender à demanda de madeira (KALIL FILHO; WENDLING, 2012).

Com relação ao manejo fitossanitário, uma das grandes vantagens do cedro australiano, em relação aos cedros nativos, é a imunidade ao broqueador das pontas, *Hypsipyla grandella* Zeller, praga de grande importância na cultura (MANGLIAVORI et al., 2003). Entre as doenças fúngicas, mais

especificamente as foliares, *Phyllachora balansae* Speg. é comumente encontrada em cedro australiano (FERREIRA, 1989). A ocorrência deste patógeno foi, inclusive, relatada recentemente no sul do Estado de Minas Gerais (ZACARONI et al., 2013). No que diz respeito aos fungos cercosporioides, há relatos dos mesmos ocorrendo em *Toona* e outras meliaceas, no exterior. Como exemplos, citam-se *Pseudocercospora toonae* Y.L. Guo & X.J. Liu em *T. ciliata*, *Cercoseptoria cedrelae* J.M. Yen, A.K. Kar & B.K. Das e *P.cedrelae* (S. Chowdhury) T.K. De em *Cedrela toona*, todos na Índia. Na América do Sul, os relatos são de *P. cedrelae-mexicanae* U. Braun & Crous em *Cedrela mexicana* M. Roem., na Venezuela, e de *Cercospora meliicola* Speg. em *Melia azedarach*, na Argentina (MYCOBANK, 2014). Todavia, não há na literatura brasileira relato sobre a ocorrência de fungos cercosporioides em cedro australiano.

2.2 Gênero *Cercospora*

O gênero *Cercospora* foi descrito por Fresenius em 1863 e atualmente é um dos maiores e mais heterogêneos gêneros da classe hyphomycetes. As espécies desse gênero fitopatogênico estão distribuídas por todo o mundo e são agentes etiológicos de manchas foliares em diversas famílias de plantas (CROUS; BRAUN, 2003). Também, podem causar lesões necróticas em flores, frutos, brácteas, sementes e pedicelos de vários hospedeiros nas mais diferentes condições climáticas (AGRIOS, 2005; TO-ANUN; HIDAYAT; MEEBOON, 2011).

Fungos do gênero *Cercospora*, bem como outros fungos cercosporioides, ou seja, com morfologia semelhante à do gênero *Cercospora*, formam sobre seus hospedeiros estruturas denominadas esporodóquios. Estes são agrupamentos de conidióforos capazes de sustentar os conídios. O conidióforo pode ser simples ou ramificado, e inclui a(s) célula(s)

conidiogênica(s) (ULLOA; HANLIN, 1999). Em fungos cercosporioides existem numerosas espécies com agrupamentos de conidióforos mistos. Alguns deles são contínuos e unicelulares, outros conidióforos são septados, compostos de duas ou mais células (por exemplo, espécies de *Cercospora*). Conidióforos podem ser incolores (hialinos) ou diversamente pigmentados, sendo a pigmentação importante característica taxonômica (CROUS; BROUN, 2003). A cicatriz conidial, minúscula estrutura no fim de uma célula conidiogênica resultante da conidiogênese, indica o ponto de onde o conídio foi liberado. A cicatriz conidial pode ser notada por paredes espessas de cor escura ou pode ser imperceptível. A cicatriz no conídio no ponto de fixação anterior ao do conidióforo é denominada hilo (HENNEBERT; SUTTON, 1994). O gênero *Cercospora* é caracterizado por cicatrizes espessas e escuras na célula conidiogênica e hilo (CROUS; BRAUN, 2003). A conidiogênese de fungos cercosporioides é caracterizada por proliferação blástica, algumas vezes determinada, mas frequentemente simpodial (TO-ANUN; HIDAYAT; MEEBOON, 2011). As características importantes dos conídios do gênero *Cercospora* estão, principalmente, relacionadas com a forma, septação, pigmentação e superfície (CROUS; BRAUN, 2003; TO-ANUN; HIDAYAT; MEEBOON, 2011). Os conídios de espécies de *Cercospora* são retos ou curvados, aciculares, filiformes, obclavados ou uma combinação de formas. Também, são caracterizados por pigmentação hialina ou oliváceo pálido e septação conidial euseptado (CROUS; BRAUN, 2003).

2.3 Sintomas

Os sintomas causados por espécies de *Cercospora* em seus hospedeiros são variáveis. Manchas foliares podem estar ausentes ou presentes em todos os graus de distinção, desde leve descoloração em ambas as superfícies foliares a

manchas foliares visíveis e bem definidas (CHUPP, 1954). Em algumas plantas, os sintomas manifestam-se como manchas foliares de cor marrom, pequenas, com cerca de 3 a 5 mm de diâmetro, formato, aproximadamente, circular e bordas avermelhadas. Todavia, na maioria dos hospedeiros as manchas são, irregularmente, circulares a angulares, com ou sem bordo distinto (AGRIOS, 2005). Como exemplos citam-se espécies de *Cercospora* em meliáceas. *C. meliicola* Spegazzini é responsável por formar manchas em folhas de *Melia azedarach* L. Essas são de formato suborbicular e cor branca encardido, com 1-5 mm de diâmetro. Os sintomas causados por *C. didymochetonis* Wakefield em folhas de *Dysoxylum richii* C. DC. são manchas foliares com áreas amareladas indistintas, na face superior. Já *C. meliae* Ellis & Ev. e *C. subsessilis* H. & P. Sydow formam em *Melia azedarach* manchas foliares circulares a angulares. *C. meliae* forma manchas com centro branco e bordos restritos de cor marrom-avermelhado e diâmetro de 0,5-2,5 mm, enquanto que *C. subsessilis* forma manchas de cor cinza ou marrom-pálido, algumas vezes com zonas delimitadas por linhas de cor marrom-escuro e diâmetro de 2-5 mm. *C. subsessilis* incita sintomas semelhantes em folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. e de *Swietenia mahagoni* Jacq. (CHUPP, 1954). As manchas incitadas por espécies de *Cercospora* em seus hospedeiros, se presentes em grande número, podem coalescer, causando grandes áreas necrosadas. De forma geral, quando ocorre alta severidade, toda a folhagem do hospedeiro é comprometida, podendo cair (AGRIOS, 2005). Em plantas suculentas, lesões semelhantes podem ser observadas em hastes e pecíolos das folhas (TO-ANUN; HIDAYAT; MEEBOON, 2011). Outros órgãos do hospedeiro, também, podem ser afetados por espécies de *Cercospora*, como flores, frutos e sementes, e mesmo em pós-colheita pode ocorrer podridão de frutos (GROENEWALD et al., 2012; SILVA; PEREIRA, 2008).

2.4 Penetração

Patógenos podem penetrar superfícies de plantas por via direta, por meio da cutícula, rompendo a camada de cera e as células da epiderme ou por aberturas naturais e ferimentos. Alguns fungos penetram nos tecidos em apenas uma dessas formas, outros em mais de uma (AGRIOS, 2005). Por exemplo, *C. carthami*, agente causal da cercosporiose do açafraão, pode penetrar os tecidos do hospedeiro pelas aberturas naturais, ferimentos ou de forma direta (SCHWARTZ; GENT, 2014). Outras espécies de *Cercospora*, entretanto, penetram apenas por ferimentos, por exemplo, *C. agavicola* Ayala-Escobar em folhas de *Agave tequilana* var. *azul* (AYALA-ESCOBAR; YANEZ-MORALES, 2005). Vários tipos de ferimentos podem ser utilizados por fungos no momento da penetração. Esses podem ser recentes ou velhos e consistir de tecido dilacerado ou proveniente de necroses por qualquer motivo. Estes patógenos, geralmente necrotróficos, podem crescer, rapidamente, em tal tecido antes de avançar para o tecido saudável. A dilaceração ou a morte dos tecidos podem resultar da ação de fatores ambientais, tais como quebra-vento e granizo, insetos, bem como de ferimentos ou lesões causados por outros agentes patogênicos. Após penetrar, o patógeno invade as células vegetais adjacentes ou secreta enzimas e toxinas que matam e maceram as células vizinhas (AGRIOS, 2005). Vários fatores influenciam na função dos ferimentos como pontos de infecção, podendo-se citar: 1) A disponibilidade de inóculo quando o ferimento é feito ou durante o período em que o ferimento é suscetível à invasão; 2) A capacidade do patógeno germinar e se desenvolver sobre ou no interior do tecido danificado; 3) O processo de fechamento do ferimento e os mecanismos de resistência do hospedeiro estabelecidos como resposta ao ferimento e 4) A capacidade do patógeno competir com outros microrganismos cuja germinação ou crescimento, também, possam ser favorecidos por ferimento (TAINTER; BAKER, 1996).

2.5 Caracterização Molecular

A taxonomia no gênero *Cercospora* baseia-se, principalmente, na morfologia de conídios e conidióforos (TO-ANUN; HIDAYAT; MEEBOON, 2011). Todavia, em muitos casos ocorre sobreposição desses marcadores morfológicos, o que torna a taxonomia do gênero mais complicada (GROENEWALD et al., 2010). Nesse sentido, a filogenia contribui com a correta inserção desses indivíduos dentro dos devidos táxons, levando em conta a relação evolutiva entre grupos de organismos por meio do sequenciamento genético. Uma série de marcadores moleculares pode ser utilizada, para avaliar a diversidade genética de fungos, citando-se entre eles os espaçadores transcritos internos (ITS) do DNA ribossômico e a região gênica actina.

Em eucariotos, a região 1 do espaçador transcrito interno (ITS-1) está situada entre os genes 18S e 5.8S, e a região 2 (ITS-2) encontra-se entre os genes 5.8S e 28S do rDNA. Essas regiões espaçadoras são menos conservadas, evoluindo em maior velocidade quando comparadas aos genes ribossomais, sendo assim úteis para determinar relações evolutivas (HILLIS; DIXON, 1991). Seu uso tem sido intenso para analisar relações evolutivas de fungos. A base de dados já depositada da região ITS, no banco de dados de nucleotídeos do GenBank, é maior quando comparada a outras sequências (PORTER; GOLDING, 2011). Essa região foi proposta como ‘código de barras’ universal para fungos por sua facilidade de amplificação e sequenciamento (BEGEROW et al., 2010; PORTER; GOLDING, 2011; SCHOCH et al., 2012). Goodwin, Dunkle e Zismann (2001) utilizaram análises filogenéticas, baseadas na região ITS do rDNA, para estudar a evolução dos gêneros *Cercospora* (fungo anamorfo) e *Mycosphaerella* (fungo teleomorfo). Esses autores concluíram que o gênero *Mycosphaerella* é monofilético, porém vários de seus anamorfos foram polifiléticos, com exceção de *Cercospora* spp.

O gene actina codifica para a síntese da proteína actina, a qual está presente em todas as células eucarióticas, sendo o principal componente dos microfilamentos. Em virtude das restrições estruturais, a sequência de aminoácidos de proteínas actina é altamente conservada nas diferentes espécies de eucariotos (HIGHTOWER; MEAGHER, 1986). Todavia, as sequências de DNA apresentam variações relevantes, ao ponto de permitir distinção de 'taxa' estreitamente relacionados. Groenewald et al. (2010) avaliaram a capacidade de cinco regiões gênicas em resolver limites de espécies e diversidade de *Cercospora*: actina, calmodulina, histona H3, fator de alongação 1-alfa e ITS. A região actina foi a que proporcionou maior resolução, formando 14 clados principais na árvore filogenética, não distinguindo apenas *C. apii* Fresen. de *C. beticola* Sacc., e *C. physalidis* Ellis de *C. piaropi* Tharp. Montenegro-Calderón et al. (2011), utilizando a abordagem 'multilocus sequence typing' (MLST), verificaram que a região gênica actina contribuiu com as regiões calmodulina e histona H3 na separação de *C. rodmanii* Conway (isolados obtidos de *Eichhornia crassipes*) de outras espécies de *Cercospora* incluídas em seu estudo. Assim, verifica-se o potencial dessa região para contribuir nos estudos de diversidade genética no gênero *Cercospora*.

2.6 Cercosporina

Muitos fungos do gênero *Cercospora* produzem cercosporina, toxina incluída no grupo das perylenequinonas (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). Seu primeiro isolamento deu-se em 1957, com base em *C. kikuchii* T. Matsumoto & Tomoy (KUYAMA; TAMURA, 1957). Sua importância na patogenicidade de *C. kikuchii* foi demonstrada, inicialmente, por Upchurch et al. (1991). Estes autores verificaram que mutantes sem habilidade para produzir cercosporina não foram capazes de infectar folhas de soja quando inoculados. Essa toxina é

classificada como composto fotossensibilizante, pois pode absorver a energia da luz, sendo convertida a um estado ativo com energia, que, em seguida, reage com o oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio. Estas destroem as membranas das plantas hospedeiras e fornecem nutrientes para o patógeno de forma intercelular (AGRIOS, 2005; DAUB; EHRENSHAFT, 2000). Quando o fungo é cultivado em meio de cultura e na presença de luz, a toxina é liberada na forma de pigmento de coloração avermelhada (AGRIOS, 2005; DAUB; EHRENSHAFT, 2000). Ela é o agente etiológico de doenças em muitas espécies vegetais, citando-se como exemplo, a cercosporiose do café (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). Em função deste composto, espécies de *Cercospora* estão entre os fungos fitopatogênicos mais bem sucedidos, sendo a produção de cercosporina considerada como importante fator de patogênese nesse gênero (UPCHURCH et al., 1991). De forma geral, apenas organismos produtores dessa toxina resistem aos seus efeitos. A capacidade de esporos fúngicos e de micélio para sobreviver à toxicidade geral de cercosporina é em decorrência da produção de piridoxina (vitamina B6). A piridoxina reage com átomos individuais de oxigênio, formando ligações químicas que inibem a ação da toxina sobre o organismo produtor (AGRIOS, 2005). A cercosporina é um composto influenciado por condições ambientais e nutricionais (JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989). Alguns estudos anteriores sobre o efeito da temperatura no acúmulo de cercosporina tiveram como objetivo otimizar as condições 'in vitro' para produzir esse composto (FAJOLA, 1978, JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989). No trabalho de Jenns, Daub e Upchurch (1989), os autores constataram isolados de diferentes espécies de *Cercospora* com conteúdo de cercosporina sendo influenciado por meio da temperatura, com maior produção aos 20°C em relação a 30°C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados com base em lesões necróticas de folhas de cedro australiano

No mês de fevereiro de 2013, foram observadas em mudas de cedro australiano, localizadas no viveiro florestal do Departamento de Ciências Florestais da UFLA, manchas necróticas na face adaxial do limbo foliar. Folíolos sintomáticos de diferentes mudas foram devidamente coletados e encaminhados para o laboratório de Epidemiologia da UFLA para visualização sob estereomicroscópio. Uma vez constatada a presença de esporodóquios sobre as lesões, procedeu-se ao isolamento direto do fungo. Os esporodóquios foram removidos da superfície das lesões com auxílio de estilete e transferidos para placas de Petri com meio ágar extrato de malte 2% (MEA) (HIMEDIA, Mumbai, Índia). Após uma semana, observou-se o crescimento micelial. Dessas placas obtiveram-se quatro isolados provenientes de diferentes plantas. Os micélios foram transferidos para tubos de ensaio, contendo meio MEA e identificados com as codificações HR01, HR02, HR03 e HR04.

3.2 Obtenção de culturas monospóricas

Para obter culturas monospóricas, cada isolado, crescido em meio MEA, teve seis discos de micélio (8 mm de diâmetro cada) transferidos para frascos Erlenmeyer, contendo 30 mL de meio de cultura líquido de suco de tomate (10%) mais CaCO_3 0,1% (STT líquido) (BRUNELLI et al., 2006) e foram incubados por quatro dias em agitador orbital sob rotação de 120 rpm. Em seguida, as suspensões obtidas foram vertidas em placas de Petri, contendo meio de cultura STT sólido (acrescido de ágar). As placas foram, então, incubadas em

câmaras BOD sob fotoperíodo constante (média de 3707,41° lux) e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para induzir a esporulação do fungo. Após dois dias (necessários para secar as suspensões e induzir a esporulação), cada placa foi lavada com 15 mL de água destilada e esterilizada e a suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril. As suspensões foram vertidas em placas de Petri com meio Ágar-água. Sob microscópio ótico visualizou-se, para cada isolado, os conídios separados. Esses foram, então, individualmente transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura MEA. Assim, foram obtidos os quatro isolados monospóricos (HR01, HR02, HR03 e HR04) utilizados nas demais etapas deste trabalho.

3.3 Caracterização morfológica

As avaliações dos caracteres morfológicos foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia da UFLA. Avaliaram-se as características morfológicas das colônias dos quatro isolados obtidos de cedro australiano, cultivados por 21 dias em câmaras BOD sob as temperaturas de 15°C , 19°C , 23°C , 26°C e 30°C e fotoperíodo de 12 horas. Conídios dos quatro isolados foram obtidos conforme metodologia de esporulação descrita no item 3.2, sob temperatura de 26°C . Em seguida, selecionaram-se, aleatoriamente, 100 conídios de cada isolado para mensurar o comprimento e a largura (na base dos conídios). Também, foram mensurados o comprimento e a largura de 30 conídios e 30 conidióforos, oriundos de folhas do hospedeiro, apresentando sintomas e sinais do patógeno. Os conídios e conidióforos, também, tiveram o número de septos quantificados.

Os dados de comprimento e largura de conídios produzidos ‘in vitro’, por meio dos isolados HR01, HR02, HR03 e HR04, foram analisados no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). As variáveis

significativas no teste F da análise de variância foram submetidas ao teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

3.4 Postulados de Koch

Foram realizados os postulados de Koch para comprovar a etiologia da doença, sendo eles:

- a) Associação constante patógeno-hospedeiro;
- b) Isolamento do patógeno;
- c) Inoculação do patógeno (com reprodução dos sintomas);
- d) Reisolamento do patógeno e comparação com a cultura inicial.

Para realizar os postulados de Koch, foram utilizadas mudas do clone 1210 de cedro australiano, adquiridas do viveiro comercial Bela Vista Florestal, localizado no município de Campo Belo, MG. As mudas apresentavam seis meses de idade, quando foram transplantadas dos tubetes, para sacos plásticos de 2 kg, contendo substrato comercial. As mudas foram mantidas na casa-de-vegetação do Laboratório de Epidemiologia da UFLA, sob temperatura média de 24,8°C (mínima e máxima de 16°C e 42,2°C, respectivamente) e umidade relativa média de 72,2% (mínima e máxima de 31,4% e 93,3%, respectivamente), no período de condução do experimento. Dois meses após o transplante, cada isolado foi inoculado em quatro mudas. Foram utilizados os quatro isolados monospóricos, HR01, HR02, HR03 e HR04, e outras quatro mudas não-inoculadas constituíram a testemunha.

Em ensaio preliminar, verificou-se a necessidade do uso de agentes abrasivos na superfície do limbo foliar para inocular o patógeno. Em cada muda foram demarcados quatro folíolos e, com auxílio de esponja de aço, realizaram-

se ferimentos circulares suaves de, aproximadamente, 1 cm de diâmetro na face adaxial dos mesmos. Em seguida, as suspensões de conídios foram calibradas sob hemacitômetro para concentração de 4×10^4 esporos.mL⁻¹ e pulverizadas sobre os folíolos até o ponto de escorrimento. Para a testemunha, pulverizou-se água sobre os ferimentos, até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as mudas foram mantidas sob câmara úmida na casa-de-vegetação por período de 48 horas. Para tanto, utilizaram-se sacos plásticos transparentes contendo algodão umedecido. Após a inoculação foi observado, diariamente, o aparecimento de sintomas, inclusive, na testemunha. Após o início dos sintomas, foram realizadas avaliações a cada sete dias.

O experimento foi repetido para o isolado HR04 (selecionado em ensaio preliminar por ter apresentado maior incidência da doença), como descrito acima, com modificações no método de inoculação e condições de incubação. Dessa vez, a inoculação foi efetuada de dois modos distintos: 1) pulverização de inóculo sobre folíolos contendo sinais de *P. balansae*, e 2) pulverização de inóculo sobre folíolos tratados com o agente abrasivo carborundum. As mudas foram mantidas em câmara de crescimento do Laboratório de Epidemiologia da UFLA, sob temperatura de 22°C. O fotoperíodo, de 12 horas, foi proporcionado por lâmpadas fluorescentes de 40 W.

3.5 Caracterização molecular

A caracterização molecular dos quatro isolados (HR01, HR02, HR03 e HR04) obtidos de cedro australiano foi realizada no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

3.5.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o Kit ‘Wizard Genomic DNA Purification Kit[®]’ (Promega, Madison, EUA).

Culturas monospóricas dos isolados HR01, HR02, HR03 e HR04 foram cultivadas em meio MEA por 21 dias. As colônias foram raspadas com base na superfície do meio de cultura e submetidas à extração do DNA genômico.

Inicialmente transferiu-se um plug de micélio para tubo Eppendorf, com adição de nitrogênio líquido em cada amostra por duas vezes. Em seguida, adicionaram-se 600 μL de ‘Nuclei Lysis Solution’ e 6 μL de β -mercaptoetanol, sendo, em seguida, agitado em ‘vortex’ e incubado a 65°C por 40 min. Posteriormente, adicionaram-se 3 μL de RNase, com incubação a 37°C por 15 min. Procedeu-se, então, à adição de 200 μL de ‘Protein Precipitation Solution’, com centrifugação por 10 min a 10.000 rpm. Transferiram-se 300 μL do sobrenadante para novo tubo Eppendorf, com adição de 100 μL de acetato de sódio e 300 μL de isopropanol. O material foi, então, incubado a -80°C por 10 min e centrifugado por 15 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e ao ‘pellet’ remanescente adicionaram-se 660 μL de etanol 70%, com nova centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. Em seguida, o etanol foi descartado, e o DNA, ressuspendido em 100 μL de solução de reidratação de DNA ‘Rehydration Solution’.

O DNA obtido de cada isolado foi quantificado e a concentração ajustada para 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, utilizando-se o aparelho ‘Nanodrop[®] 2000c’ (Thermo Fisher Scientific Inc.). Após essas etapas, o DNA obtido foi utilizado para amplificar as regiões ITS e actina.

3.5.2 Amplificação por PCR e Sequenciamento

Para amplificar o DNA, utilizou-se o 'kit Master Mix GoTaq® Incolor' (Promega), no termociclador 'My Cycler™' (Bio-Rad, Hercules, EUA). O mesmo conjunto de 'primers' foi utilizado para as reações de PCR e sequenciamento. Porções do DNA ribossomal nuclear, incluindo os espaçadores internos transcritos 1 e 2, bem como a região 5.8 (ITS), foram amplificadas com os 'primers' ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TATT GATA TGC- 3'), utilizando as seguintes condições de ciclo: desnaturação a 96°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 30 s e 72°C por 90 s, com extensão final de 72°C por 4 min (WHITE; BRUNS; TAYLOR, 1990). Parte do gene actina foi amplificada com o uso dos 'primers' ACT-512F (5'- ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC-3') e ACT-783R (5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT-3'), utilizando as seguintes condições de ciclo: temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 4 min, seguida por 35 ciclos a 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 45 s, com extensão final de 72°C por 7 min (CARBONE; KOHN, 1999).

Os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % e contrastados em brometo de etídio 1%. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado com o uso do padrão de peso molecular de 1 Kb 'Plus Ladder' (Invitrogen). Os géis foram fotografados por meio do aparelho de foto-documentação 'Locus Biotecnologia Molecular Imaging Transilluminator'.

Os produtos da PCR foram purificados usando o Kit 'GFX PCR DNA and Gel Band Purification', de acordo com o protocolo do fabricante, e armazenados a -20°C. Os materiais obtidos foram encaminhados para sequenciamento genético das regiões amplificadas. Os fragmentos de DNA

foram sequenciados nas direções senso e antisenso por eletroforese capilar em sequenciador automático ‘MEGA BACE[®]’ (GE Healthcare).

3.5.3 Análises filogenéticas

A edição dos eletroferogramas gerados com base no sequenciamento foi realizada com o auxílio do programa SeqAssem versão 2007/2008. As sequências obtidas foram comparadas com sequências de referência, correspondentes às regiões ITS e actina, depositadas no GenBank (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2014). Os códigos de acesso às sequências no GenBank, também, estão disponíveis no trabalho de Groenewald et al. (2012). Por meio do ‘BLAST’, foram verificadas as percentagens de similaridade dos isolados estudados em relação às sequências já depositadas. As sequências homólogas foram incluídas nesse estudo (Tabela 1). Não foram incluídas espécies de *Cercospora* patogênicas à meliáceas por não haver sequências depositadas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank para esses genes. Como ‘outgroup’, utilizaram-se as sequências das regiões ITS e actina de *Septoria provencialis* (isolado CPC 12226) por apresentar relação filogenética com *Cercospora* (GROENEWALD et al., 2012). O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi gerado, por meio da ferramenta ‘ClustalW’, implementada no programa ‘MEGA’ (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), versão 6.06. Foram construídas árvores filogenéticas de máxima parcimônia, visando ao reconhecimento da espécie dos isolados, sendo o suporte dos clados inferido baseado em 1.000 replicações da análise de ‘bootstrap’ (TAMURA et al., 2013).

Tabela 1 Sequências de referência das regiões ITS e actina (ACT), depositadas no GenBank e utilizadas neste estudo para construir as árvores filogenéticas

Espécie	Hospedeiro	N° acesso GenBank	
		ITS	ACT
<i>Cercospora achyranthis</i>	<i>Achyranthes japonica</i>	JX143523	JX143031
<i>C. agavicola</i>	<i>Agave tequilana</i> var. azul	AY647237	AY966898
<i>C. alchemillicola</i>	<i>Alchemilla mollis</i>	JX143525	JX143033
<i>C. althaeina</i>	<i>Malva</i> sp.	JX143528	JX143036
<i>C. apii</i>	<i>Moluccella laevis</i>	AY156918	DQ233371
<i>C. apiicola</i>	<i>Apium</i> sp.	AY840536	AY840467
<i>C. armoraciae</i>	<i>Gaura</i> sp.	JX143538	JX143046
<i>C. beticola</i>	<i>Spinacia</i> sp.	DQ233325	DQ233377
<i>C. campii-silii</i>	<i>Impatiens noli-tangere</i>	JX143561	JX143069
<i>C. capsici</i>	Lesions on calyx attached to fruit	GU214653	JX143076
<i>C. celosiae</i>	<i>Celosia argentea</i> var. cristata	JX143570	JX143080
<i>C. chenopodii</i>	<i>Chenopodium</i> cf. album	JX143571	JX143081
<i>C. chinensis</i>	<i>Polygonatum humile</i>	JX143578	JX143088
<i>C. coniogrammes</i>	<i>Coniogramme japonica</i> var. gracilis	JX143583	JX143095
<i>C. corchori</i>	<i>Corchorus olitorius</i>	JX143584	JX143096
<i>C. delaireae</i>	<i>Delairea odorata</i>	JX143587	JX143099
<i>C. dispori</i>	<i>Disporum viridescens</i>	JX143591	JX143103
<i>C. euphorbiae-sieboldianae</i>	<i>Euphorbia sieboldiana</i>	JX143593	JX143105
<i>C. fagopyri</i>	<i>Fagopyrum esculentum</i>	JX143594	JX143106
<i>C. kikuchii</i>	<i>Glycine soja</i>	DQ835070	DQ835107
<i>C. lactucae-sativae</i>	<i>Ixeris chinensis</i> subsp. strigosa	JX143621	JX143134
<i>C. mercurialis</i>	<i>Mercurialis annua</i>	JX143627	JX143140
<i>C. olivascens</i>	<i>Aristolochia clematidis</i>	JX143632	JX143145
<i>C. pileicola</i>	<i>Pilea pumila</i>	JX143634	JX143147
<i>C. polygonacea</i>	<i>Persicaria longiseta</i>	JX143637	JX143150
<i>C. punctiformis</i>	<i>Cynanachum wilfordii</i>	JX143638	JX143151
<i>C. ricinella</i>	<i>Ricinus communis</i>	JX143646	JX143159
<i>C. rodmanii</i>	<i>Eichhornia crassipes</i>	DQ835076	DQ835122
<i>C. rumicis</i>	<i>Rumex sanguineus</i>	JX143648	JX143161
<i>C. senecionis-walkeri</i>	<i>Senecio walkeri</i>	JX143649	JX143162

“Tabela 1, conclusão”

Espécie	Hospedeiro	Nº acesso GenBank	
		ITS	ACT
<i>C. soja</i>	<i>Glycine soja</i>	GU214655	JX143172
<i>C. vignigena</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	JX143734	JX143247
<i>C. violae</i>	<i>Viola tricolor</i>	JX143737	JX143250
<i>C. zae-maydis</i>	<i>Zea mays</i>	DQ185072	DQ185096
<i>C. zebrina</i>	<i>Medicago arabica</i>	JX143744	JX143257
<i>C. zeina</i>	<i>Zea mays</i>	DQ185081	DQ185105
<i>Septoria provencialis</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	DQ303096	JX143276

3.6 Análise do processo de penetração por Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises de microscopia eletrônica foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, situado no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

3.6.1 Inoculação do patógeno

Com o intuito de avaliar a penetração do isolado HR04 em folhas de cedro australiano, amostras do material vegetal inoculadas com este isolado foram processadas e submetidas à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Avaliou-se a influência de três métodos na penetração do fungo em folhas de cedro: 1) inoculação do fungo sobre a superfície abaxial do folíolo, sem qualquer tipo de ferimento; 2) inoculação sobre ferimentos na face adaxial do folíolo e 3) inoculação do fungo em estudo sobre sinais do fungo *Phyllachora balansae*, presentes na face adaxial do folíolo.

O fungo foi cultivado em meio de cultura MEA por 21 dias e submetido ao processo de esporulação, como descrito em 3.2. A suspensão de conídios foi obtida, vertendo-se 15 mL de água destilada e autoclavada em cada placa de Petri e, com o auxílio de pincel, os conídios foram desagregados. A suspensão obtida foi filtrada em gaze dupla e ajustada para concentração de $1,8 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹.

Para inocular o fungo, 72 folíolos de cedro australiano (clone '1210') foram destacados das folhas novas e distribuídos em caixas gerbox contendo algodão umedecido. Deste total, foram separados 24 folíolos apresentando sintomas da Mancha de *Phyllachora*. Os 48 folíolos restantes foram divididos em dois grupos, um para inocular o fungo com ferimentos na face adaxial com auxílio de multiagulhas, e outro grupo para controle (folíolos sem ferimento). Para realizar a inoculação, foram demarcadas três regiões circulares de 8 mm de diâmetro em cada folíolo e foram aplicados 20 µL de suspensão de esporos do isolado HR04 sobre cada região. A aplicação da suspensão nos folíolos, contendo sinais de *P. balansae*, deu-se na face adaxial, sobre os sinais desse fungo, enquanto nos folíolos apresentando ferimentos, a inoculação foi realizada sobre as regiões feridas, por meio de multiagulhas, na face adaxial. Para o grupo controle, a suspensão de esporos do isolado HR04 foi inoculada na face abaxial dos folíolos.

Visando ao aumento de chances da visualização de esporos do isolado HR04 no momento da penetração, as amostras foram pré-fixadas com o fixador 'Karnovsky' modificado (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001M) em seis tempos diferentes: 6, 9, 12, 18, 24 e 48 horas após a inoculação. As amostras pré-fixadas foram mantidas em geladeira por três dias.

3.6.2 Preparo das amostras

O preparo das amostras foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Alves et al. (2012). Para tanto, as mesmas foram lavadas por três vezes (10 minutos cada lavagem) com tampão cacodilato 0,05M, e imersas em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2, por uma hora.

Para desidratar as amostras fixadas em tetróxido de ósmio, essas foram lavadas com água destilada e submetidas ao tratamento com soluções de acetona em concentrações crescentes (25, 50, 75, 90 e 100%), permanecendo 10 minutos em cada solução. As amostras foram passadas por três vezes na solução de 100%. Após a desidratação, as amostras foram colocadas em gaiolas devidamente identificadas e submetidas à secagem ao ponto crítico.

Em seguida, as amostras foram montadas sobre os 'stubs' e levadas ao 'Sputtering' para o banho de ouro, cuja finalidade foi a de aumentar a resistência das amostras, bem como a sua condutividade.

Por fim, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura, onde se capturaram imagens para observar os mecanismos de penetração do isolado HR04 nos folíolos de cedro australiano.

3.7 Crescimento micelial sob diferentes temperaturas

Para avaliar o crescimento micelial dos isolados, conduziu-se um ensaio em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x5, sendo quatro isolados e cinco temperaturas. Os isolados HR01, HR02, HR03 e HR04 foram cultivados em meio MEA em câmara BOD sob fotoperíodo de 12 horas (média de 3.707,41° lux) nas temperaturas de 15°C, 19°C, 23°C, 26°C e 30°C. Utilizaram-se quatro repetições de cada isolado por temperatura.

Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. Como variável resposta, foram mensurados os diâmetros das colônias, medidos em posição ortogonal, 21 dias após a inoculação. Os dados obtidos foram analisados no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). As variáveis significativas no teste F da análise de variância foram submetidas ao teste de Tukey (nível de 5% de significância) e à análise de regressão. O ajuste do modelo de regressão foi realizado utilizando-se as repetições da variável estudada. Avaliou-se o ajuste de modelos lineares, sendo escolhido aquele com maior R^2 , menor Quadrado Médio dos Desvios e melhor gráfico de distribuição de resíduos. Para estimar a temperatura ótima ou o ponto de máximo crescimento micelial, foi realizada a derivada de primeira ordem da equação de regressão com melhor ajuste.

3.8 Produção de cercosporina sob diferentes temperaturas

Para o ensaio de produção de cercosporina sob diferentes temperaturas, foram utilizadas colônias de 21 dias de idade, mantidas em placas de Petri com meio MEA e incubadas sob as temperaturas de 15°C, 19°C, 23°C, 26°C e 30°C, com fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente (média de 3.707,41° lux). O ensaio foi realizado para os quatro isolados (HR01, HR02, HR03 e HR04). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x5, sendo quatro isolados e cinco temperaturas. Utilizaram-se três repetições de cada isolado por temperatura. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. De cada placa, obtiveram-se três discos de micélio (8 mm de diâmetro) do bordo das colônias, os quais foram transferidos para frascos contendo 8 mL de solução de KOH 5N. Todas as amostras foram incubadas na ausência total de luz, por quatro horas, e a leitura das mesmas foi realizada após esse período, em absorbância, conforme metodologia proposta por Jenns, Daub e

Upchurch (1989). A concentração da toxina no extrato foi estimada com o uso do coeficiente de extinção molar de 23.300 para leituras de A_{480} nm (JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989). Para determinar a produção de cercosporina por disco, dividiu-se o resultado por três. O tratamento controle constou de três discos de meio MEA, imersos em solução de KOH 5N, incubados sob as mesmas condições dos demais tratamentos. Após a leitura das amostras, descontou-se de cada parcela o valor correspondente ao do tratamento controle. Como variável resposta mensurou-se o conteúdo de cercosporina, em $\mu\text{mol.disco}^{-1}$.

As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014). As variáveis significativas no teste F da análise de variância foram submetidas ao teste de Tukey (nível de 5% de significância) e à análise de regressão. O ajuste do modelo de regressão foi realizado utilizando-se as repetições da variável estudada. Avaliou-se o ajuste de modelos lineares, sendo escolhido aquele com maior R^2 , menor Quadrado Médio dos Desvios e melhor gráfico de distribuição de resíduos. Para estimar a temperatura ótima ou o ponto de máximo conteúdo de cercosporina, foi realizada a derivada de primeira ordem da equação de regressão com melhor ajuste.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfológica

As estruturas formadas sobre as folhas de cedro australiano foram identificadas como esporodóquios de fungos cercosporioides. Os quatro isolados obtidos formaram colônias com superfície de cor branca, às vezes entremeada com tons de rosa e/ou cinza (Figura 1). De forma geral, sob as temperaturas de 15°C a 26°C, os isolados formaram colônias com bordo avermelhado (Figuras 1.A e 1.B), e sob a temperatura de 30°C, todos os isolados formaram colônias desprovidas dessa coloração (Figuras 1.C e 1.D). A pigmentação vermelha observada nas colônias foi decorrente da presença de cercosporina, toxina liberada por espécies de *Cercospora* quando cultivadas na presença de luz, sob condições favoráveis de temperatura (DAUB; EHRENSHAFT, 2000).

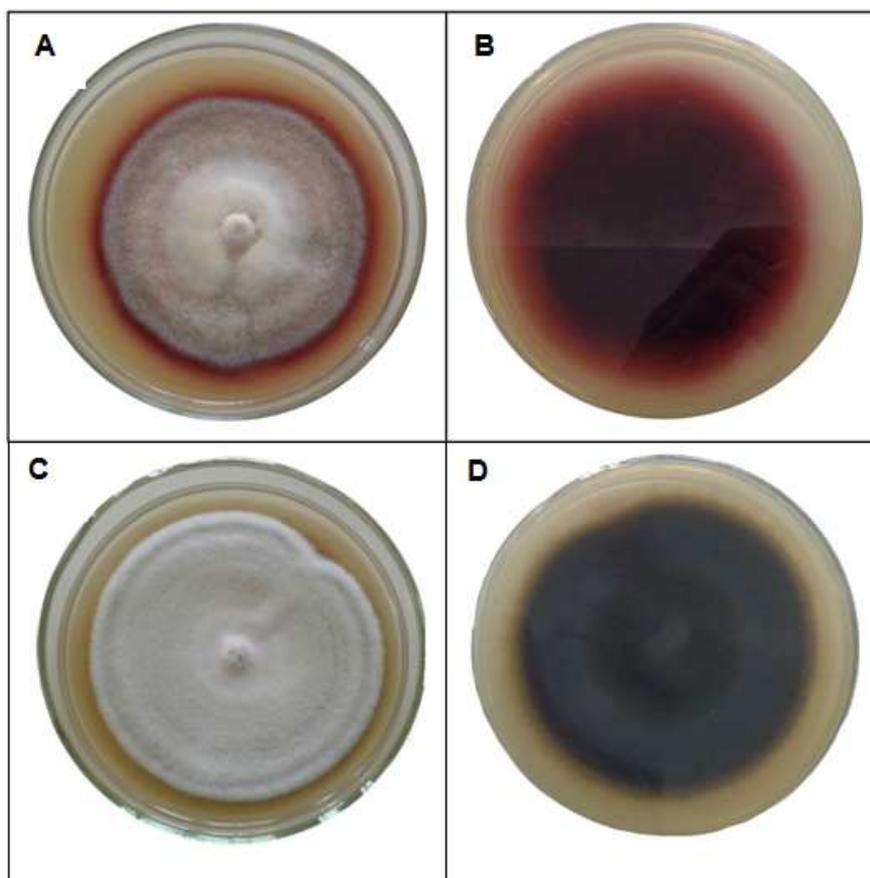


Figura 1 Colônias de isolados de cedro australiano em meio MEA

Legenda: Em A e B, superfície e verso de colônia com pigmentação vermelha; em C e D, superfície e verso de colônia desprovida de pigmentação vermelha.

Os conídios apresentaram-se hialinos, tanto quando produzidos sobre o hospedeiro, como 'in vitro'. De acordo com Crous e Braun (2003), geralmente esperam-se conídios de *Cercospora* com coloração oliváceo pálido ou desprovidos de pigmentação (hialinos). Quanto ao formato, observaram-se conídios retos e curvados, aciculares e filiformes, assim como descrito na literatura para várias espécies do gênero *Cercospora* (Figura 2) (CROUS; BRAUN, 2003). Os conidióforos apresentaram coloração marrom e dimensões

de comprimento e largura de 62-160 x 5-7 μm (\bar{x} =126 x 5,6 μm), respectivamente, com número de septos variando entre 1 e 3 (Tabela 2). Já as dimensões obtidas para o comprimento e a largura dos conídios, quando produzidos sobre o hospedeiro, foram de 105-316 x 3-5 μm (\bar{x} =196 x 3,9 μm), respectivamente, com número de septos variando entre 6 e 17 (Tabela 2). Quando produzidos 'in vitro', os valores de comprimento e largura dos conídios não diferiram, significativamente, entre os quatro isolados, com média geral de 86 x 2,4 μm , respectivamente (Tabela 2). Já o número de septos dos conídios variou de 1 a 9 quando produzidos 'in vitro'.

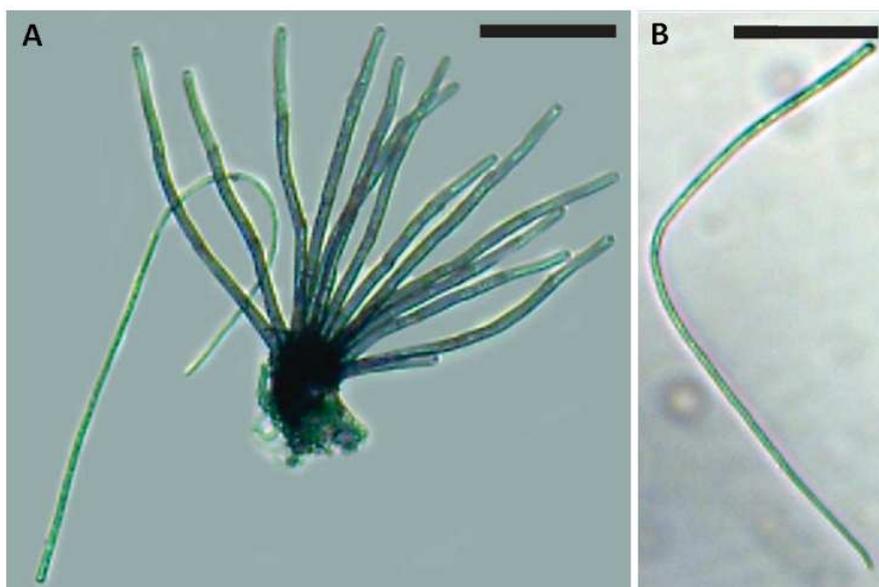


Figura 2 Estruturas formadas por isolado obtido de cedro australiano: A) Esporodóquio formado sobre folha do hospedeiro; B) conídio em detalhe

Legenda: Barra=60 μm .

Os dados biométricos dos isolados obtidos de cedro australiano foram comparados com os de espécies de *Cercospora* em meliáceas (Tabela 2). Com auxílio da chave de classificação de espécies de *Cercospora* em meliáceas, proposta por Chupp (1954), verificou-se semelhança morfológica dos isolados de cedro australiano com a espécie *C. meliicola* (Tabela 2). Esta espécie já foi relatada em *Azadirachta indica* A. Juss., *Chukrasia tabularis* A. Juss., *Melia azadirachta* L. e *Toona sinensis* (A. Juss.) M. Roem. (meliáceas), com distribuição na Ásia (China, Índia e Laos), América Central (Panamá) e América do Sul (Argentina) (PHENGSIINTHAM et al., 2013).

Tabela 2 Dados biométricos de comprimento (C), largura (L) e número de septos (NS) por conidióforo e conídio de espécies de *Cercospora* associadas a espécies da família Meliaceae

Espécie	Hospedeiro	Conidióforo		Conídio	
		CxL (µm)	NS	CxL (µm)	NS
<i>Cercospora</i> sp. ¹	<i>Toona ciliata</i>	62-160 x 5-7 (\bar{x} =126 x 5,6)	1-3	105-316 x 3-5 (\bar{x} =196 x 3,9)	6-17
<i>Cercospora</i> sp. ²	<i>Toona ciliata</i>	-	-	32-210 x 2-3 (\bar{x} =86 x 2,4)	1-9
<i>C. didymochetonis</i> Wakefield	<i>Dysoxylum richii</i>	20-70x3-5	1-5	30-70x3-5	3-7
<i>C. meliae</i> Ellis & Everhart	<i>Melia azedarach</i>	20-50x4-5	*	40-120x2-4	***
<i>C. meliicola</i> Spegazzini	<i>M. azedarach</i>	50-250x4,5-7	**	40-200x2,5-4	***
<i>C. subsessilis</i> H.& P. Sydow	<i>M. azedarach</i>	5-20x2-4	0	25-80x2-4	3-9

¹ Do presente estudo, produzidos sobre o hospedeiro

² Média geral dos quatro isolados do presente estudo, produzidos 'in vitro'

* Indistinto ou ausente

** Multiseptado

*** Indistintamente multiseptado

4.2 Postulados de Koch e descrição dos sintomas

As mudas de cedro australiano, localizadas no viveiro florestal do Departamento de Ciências Florestais da UFLA, foram observadas apresentando manchas de cor marrom no limbo foliar, com formato circular irregular a angular e diâmetro entre 2 e 7 mm, sem formação de halo (Figura 3). Independente do formato, quando as lesões foram observadas em estereomicroscópio, estavam presentes sobre as mesmas, esporodóquios do patógeno. Variações no formato das lesões podem ocorrer em fungos do gênero *Cercospora*. Por exemplo, *C. meliae* e *C. subsessilis* podem formar nas folhas dos seus hospedeiros, manchas cujo formato varia do circular ao angular (CHUPP, 1954).



Figura 3 Sintomas da Mancha de *Cercospora* em folíolos de mudas de cedro australiano, localizadas no viveiro florestal da UFLA

Quando inoculados no clone comercial '1210' de cedro australiano, os isolados formaram lesões semelhantes nos folíolos das mudas mantidas em casa-de-vegetação (Figura 4.A e B). Os sintomas foram observados a partir dos 50 dias após a inoculação.

Quando o teste de patogenicidade foi repetido para o isolado HR04 sob condições controladas (câmara de crescimento), as mudas com ferimentos apresentaram sintomas semelhantes aos observados no hospedeiro doente original (Figura 4.C). Também, observaram-se sintomas do patógeno associados aos sinais de *P. balansae* nessa mesma avaliação (Figura 4.D). Em ambos os casos, os sintomas foram observados 21 dias após a inoculação. Rosa et al. (2009) conduziram teste de patogenicidade de *C. meliae* em *Melia azedarach* em casa-de-vegetação (temperatura de 22°C e fotoperíodo com 12 horas de luz), encontrando período de incubação para o patógeno igual a 10 dias. Na primeira realização do teste de patogenicidade do presente trabalho, as mudas de cedro foram mantidas em casa-de-vegetação sem controle das variáveis ambientais. Essa condição pode ter interferido no período de incubação do patógeno, prolongando-o.

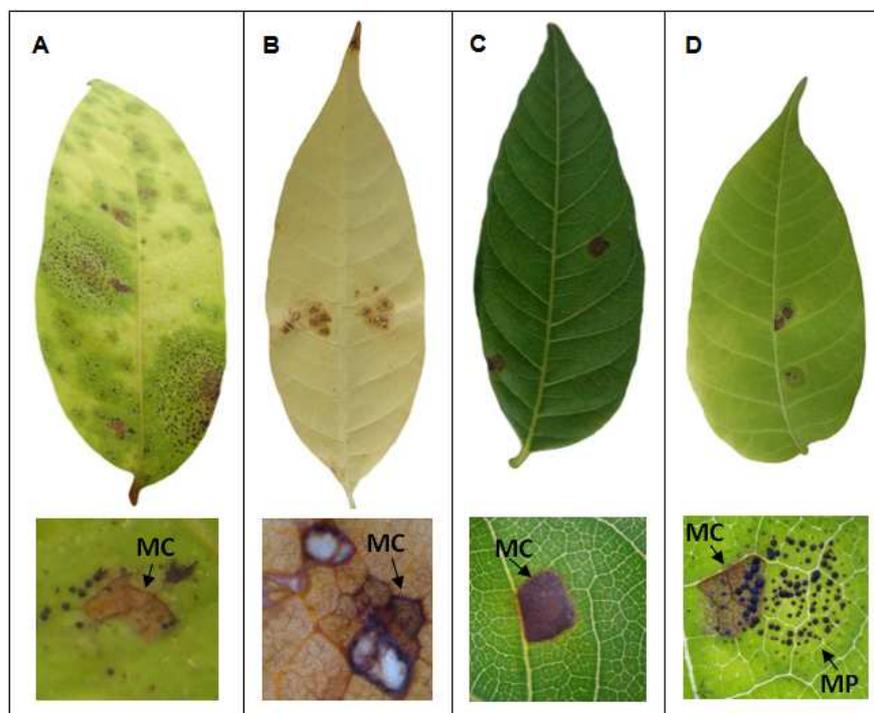


Figura 4 Sintomas da Mancha de *Cercospora* em folíolos de cedro australiano com detalhes observados em estereomicroscópio: A) hospedeiro original doente; B) hospedeiro tratado com esponja de aço e inoculado artificialmente; C) hospedeiro tratado com carborundum e inoculado artificialmente e D) hospedeiro com inóculo de *Cercospora* aplicado sobre lesões de *P. balansae*

Legenda: MC: Mancha de *Cercospora*. MP: Mancha de *Pyllachora*.

As mudas inoculadas nos ensaios descritos anteriormente apresentaram esporodóquios sobre as lesões, que foram isolados de forma direta. Todos os isolados inoculados foram reisolados das lesões observadas nos hospedeiros. Nas testemunhas, verificou-se ausência de sintomas do patógeno. Após 15 dias, as colônias obtidas do hospedeiro doente original foram comparadas com as colônias obtidas dos hospedeiros doentes inoculados artificialmente (Figura 5).

Verificou-se semelhança entre as colônias obtidas inicialmente e aquelas reisoladas, cumprindo-se, assim, todas as etapas dos postulados de Koch.

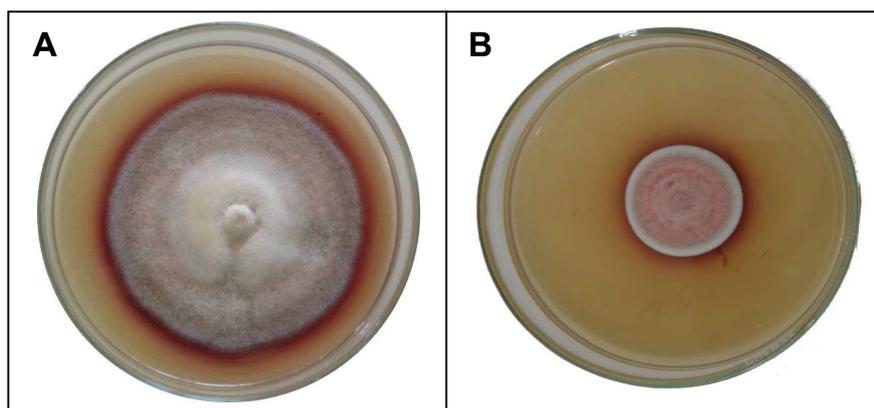


Figura 5 Em A) colônia com 21 dias de idade obtida de hospedeiro original doente apresentando sintomas da Mancha de *Cercospora*; B) colônia com 15 dias de idade reisolada de hospedeiro inoculado artificialmente

4.3 Caracterização molecular

As sequências da região ITS (ITS1 e ITS2, incluindo o gene 5.8S rDNA), bem como as sequências parciais da região actina dos quatro isolados obtidos de cedro australiano, foram editadas e comparadas com aquelas depositadas no GenBank. Quando se realizou o ‘BLAST’ das sequências, estas apresentaram alta similaridade (valores de até 100%) com várias outras espécies do gênero *Cercospora*. Por meio da região ITS, os quatro isolados foram agrupados como *Cercospora* sp. (suporte de ‘bootstrap’ de 74%) (Figura 6). Essa região apresentou baixa resolução para discriminar os isolados de *Cercospora* do cedro ao nível de espécie (Figura 6).

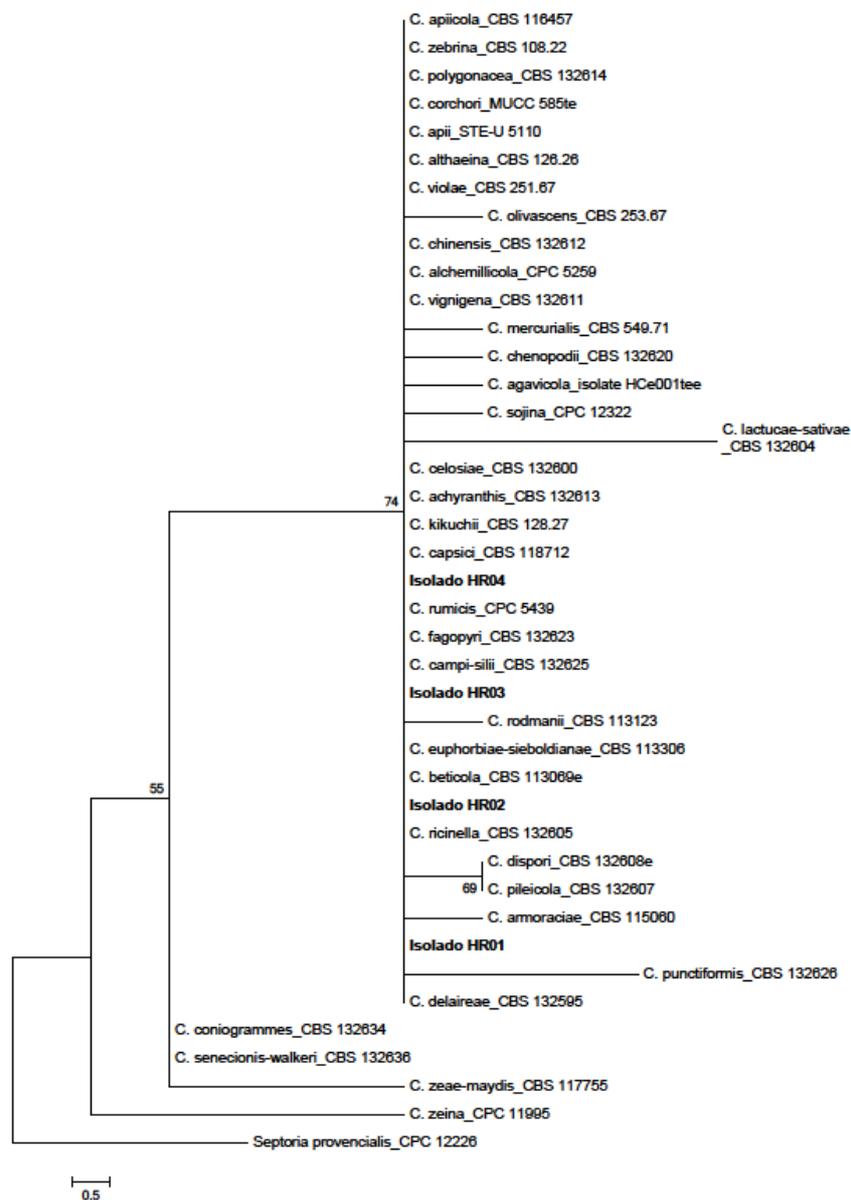


Figura 6 Árvore filogenética da região ITS obtida por método de máxima parcimônia, apresentando o posicionamento dos isolados obtidos de cedro australiano (HR01, HR02, HR03 e HR04), tendo *Septoria provencialis* como 'outgroup'

Já a árvore filogenética, resultante da análise da região actina, agrupou os quatro isolados de cedro australiano com a espécie *C. alchemillicola*, formando um clado com suporte 'bootstrap' de 85% (Figura 7). Em situações onde as regiões gênicas em estudo são pouco informativas ou não-conclusivas, uma alternativa é a abordagem filogenética usando 'multilocus sequence typing' (MLST). Essa abordagem consiste na análise de diferentes regiões gênicas, e da combinação dessas informações para estudar a diversidade de espécies ou mesmo, de categorias infraespecíficas. De acordo com Groenewald et al. (2012) e Montenegro-Calderón et al. (2011), essa tem sido uma das abordagens mais eficazes para reconhecer diferentes espécies do gênero *Cercospora*.

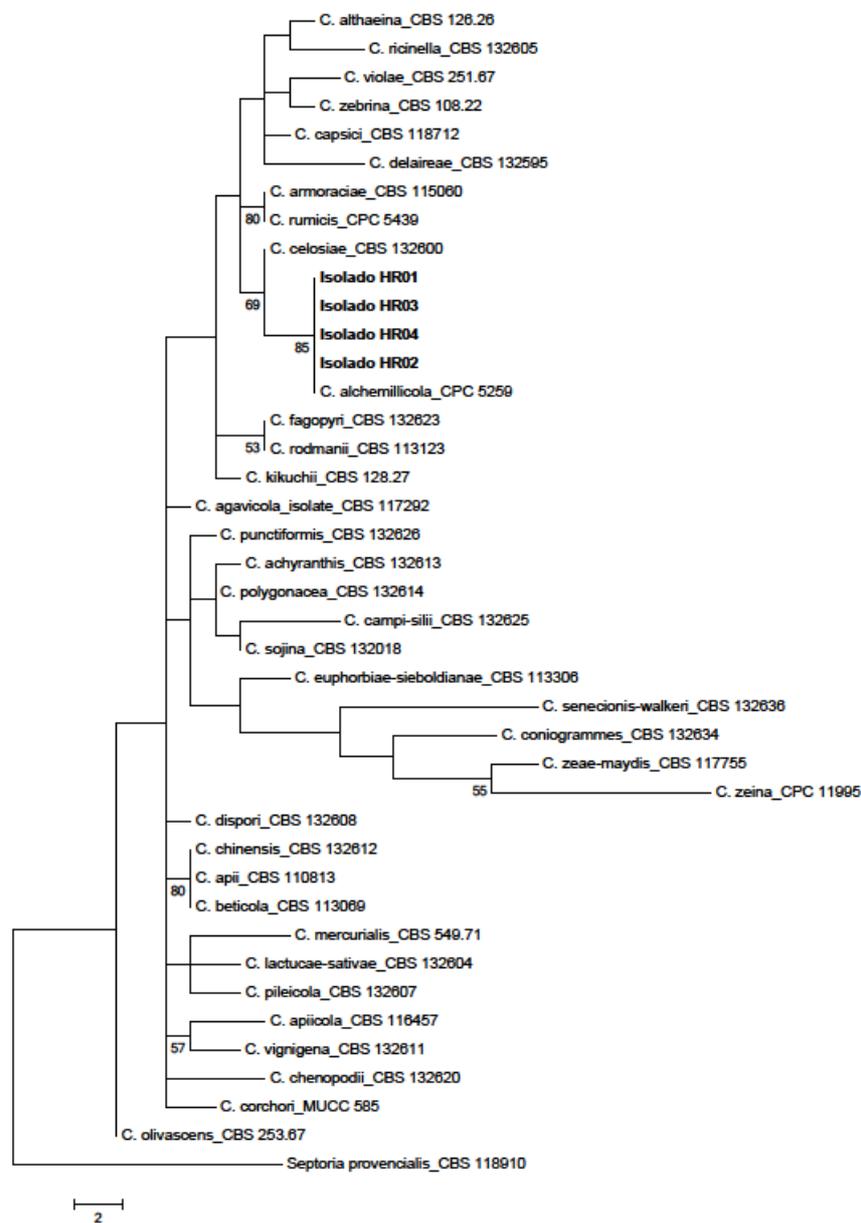


Figura 7 Árvore filogenética da região actina obtida por método de máxima parcimônia, apresentando o posicionamento dos isolados obtidos de cedro australiano (HR01, HR02, HR03 e HR04), tendo *Septoria provencialis* como 'outgroup'

Quando se utilizou a abordagem filogenética MLST, mediante combinação das sequências de ITS e actina, também, classificaram-se os isolados de *Cercospora* do cedro como *C. alchemillicola*, com um suporte de 'bootstrap' de 82% (Figura 8). *C. alchemillicola* é patogênico à *Alchemilla mollis*, espécie vegetal pertencente à família rosácea. Nessa espécie, o fungo desenvolve manchas foliares de formato subcircular à angular-irregular com 1,5 mm de diâmetro e coloração inicialmente marrom, adquirindo aspecto branco-acinzentado com o avanço do tempo, e bordos estreitos de cor marrom-escuro. Seus conidióforos apresentam coloração marrom-oliváceo e dimensões de comprimento e largura de 30-110 x 2,6 µm, respectivamente, podendo ser desprovidos de septos, embora sejam geralmente multiseptados. Os conídios são hialinos, com formato acicular à obclavado subcilíndrico, com dimensões de comprimento e largura de 40-110 x 2,4 µm, respectivamente, e 3 a 10 septos (BRAUN; HILL, 2002). Se comparados aos dados de conídios e conidióforos de *Cercospora* do cedro, quando produzidos sobre o hospedeiro, *C. alchemillicola* difere, morfológicamente, desses, principalmente, quanto à largura dos conidióforos e comprimento dos conídios. Em decorrência da divergência entre os resultados obtidos por morfologia com os dados obtidos por filogenia, verifica-se a necessidade do estudo de novas regiões gênicas visando ao maior esclarecimento da espécie de *Cercospora* associada ao cedro australiano no Brasil.

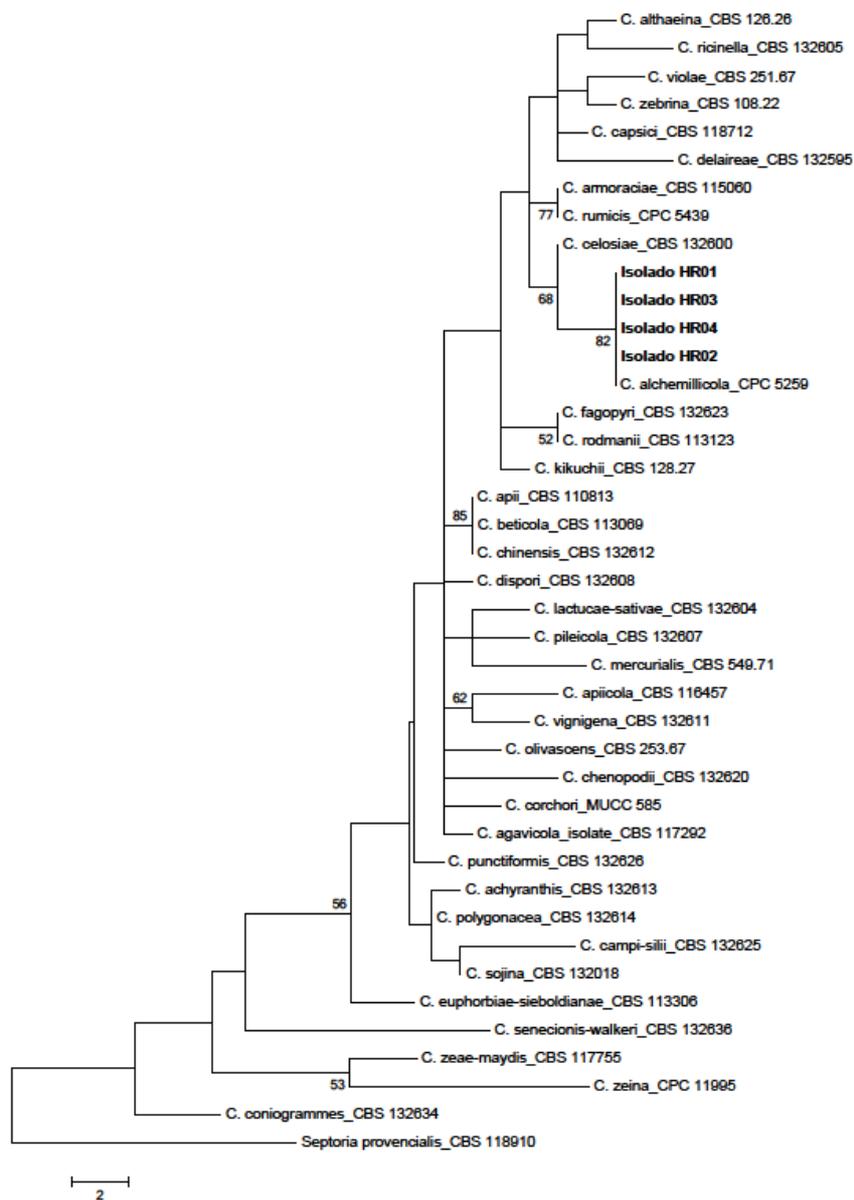


Figura 8 Árvore filogenética obtida por método de máxima parcimônia com base na combinação das regiões ITS e actina, apresentando o posicionamento dos isolados obtidos de cedro australiano (HR01, HR02, HR03 e HR04), tendo *Septoria provencialis* como 'outgroup'

4.4 Penetração de *Cercospora* em cedro australiano

Com seis horas após a inoculação, os conídios do isolado HR04 não haviam iniciado a germinação (Figura 9.A). No tratamento onde os conídios foram inoculados, sem a presença de ferimentos, não houve penetração de hifas infectivas por estômatos, nem mesmo com 48 horas (Figura 9.B e 9.C). Já, nos ferimentos proporcionados por meio de multiagulhas, observaram-se conídios emitindo tubo germinativo e penetrando, abundantemente, a partir de 12 horas após a inoculação (Figura 9.D). Esses resultados estão de acordo com a hipótese inicial de que o patógeno necessita de ferimentos para penetrar e iniciar a infecção do hospedeiro. Ayala-Escobar e Yanez-Morales (2005) relataram a ocorrência de nova espécie de *Cercospora* (*C. agavicola* Ayala-Escobar) em folhas de *Agave tequilana* var. *azul*, espécie vegetal utilizada no México para produzir bebida alcoólica. Os autores observaram, no teste de patogenicidade, que o fungo só foi capaz de causar doença quando se utilizaram de ferimentos no limbo foliar antes da inoculação. Assim, este trabalho corrobora com a afirmativa de que determinadas espécies de *Cercospora* necessitam de ferimentos para penetrar nos seus hospedeiros e causar doenças.

Nas amostras inoculadas sobre sinais de *P. balansae*, observaram-se ferimentos na epiderme dos folíolos nos locais de desenvolvimento dos sinais deste fungo. O rompimento da epiderme dos folíolos causado por *P. balansae* foi importante para criar portas de entrada para a penetração de *Cercospora* (Figura 9.E). A dilaceração ou a morte dos tecidos podem resultar da ação de fatores ambientais, tais como quebra-vento e granizo, insetos, bem como de ferimentos ou lesões causados por outros agentes patogênicos (AGRIOS, 2005). De forma geral, tem-se observado o desenvolvimento de lesões de *Cercospora* do cedro iniciando-se próximas aos sinais de *P. balansae*, quando esta se faz presente nas folhas. Foram observados poucos ferimentos nos locais de

desenvolvimento de *P. balansae* (muitas vezes, um único peritécio com a superfície danificada em toda uma lesão), sendo o suficiente para a hifa germinativa de *Cercospora* penetrar e causar danos no hospedeiro.

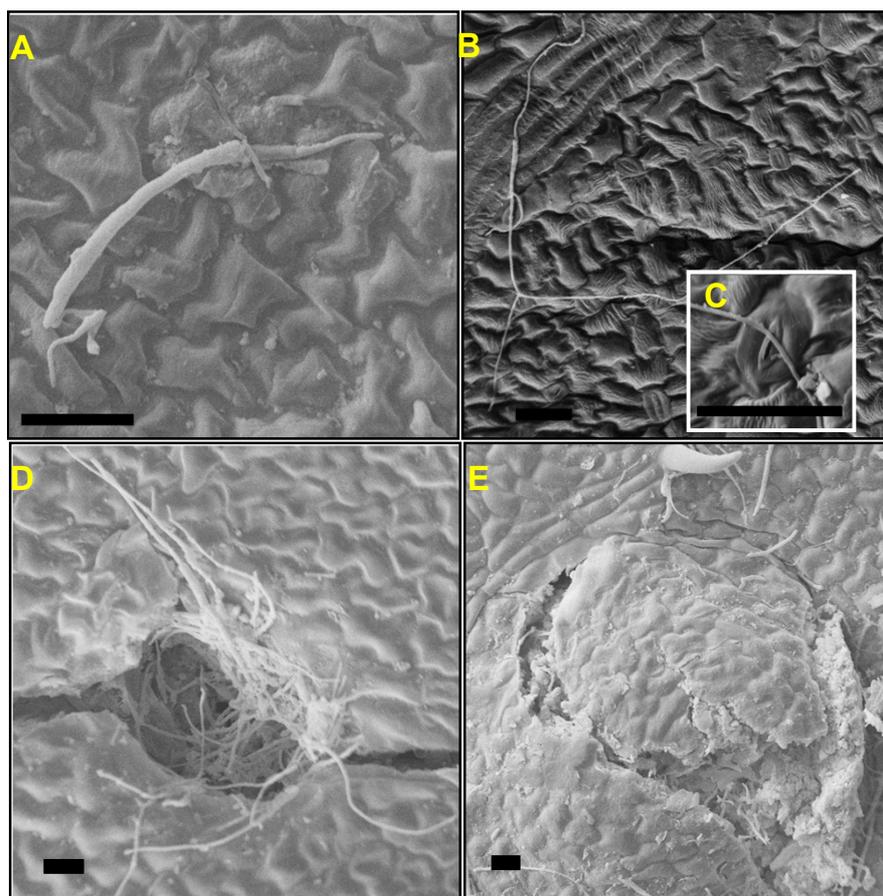


Figura 9 Eletromicrografia de varredura da fase de penetração de isolado de *Cercospora* em folíolos de cedro australiano: A) ilustração de conídios 6 horas após inoculação; B) alongamento do tubo germinativo após 18 horas, sem penetração por estômatos; C) detalhe do tubo germinativo ignorando estômato como porta de entrada; D) penetração de conídios por ferimento, observada 12 horas após a inoculação e E) visualização da superfície de peritécio de *P. balansae* causando fissuras na epiderme do folíolo de cedro australiano

Legenda: Barra=20 μ m.

4.5 Crescimento micelial sob diferentes temperaturas

Não houve interação significativa entre isolados e temperaturas para o crescimento micelial. Não houve diferença significativa entre os isolados sobre o crescimento micelial, sendo a média geral igual a 4,47 cm (Tabela 3).

Tabela 3 Crescimento micelial de isolados de *Cercospora* de cedro australiano 21 dias após a inoculação em meio de cultivo MEA

Isolados	Crescimento micelial (cm)
HR01	4,35 A
HR02	4,42 A
HR03	4,53 A
HR04	4,57 A
Média geral	4,47
cv(%)	12,59

*Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si por meio do teste de Tukey, a 5% de significância.

O crescimento micelial dos isolados de cedro sofreu influência das temperaturas de cultivo, com máximo crescimento observado, quando submetidos à temperatura de 24,8°C, cuja média geral do diâmetro das colônias foi de 5,95 cm (Figura 10). Os menores valores de crescimento micelial foram observados para as temperaturas extremas, com diâmetros médios das colônias iguais a 3,01 cm e 2,14 cm, quando mantidos sob as temperaturas de 15,6°C e 30,0°C, respectivamente (Figura 10). Fajola (1978) avaliou o efeito de temperaturas entre 10 e 35°C sobre o crescimento micelial de *C. ricinella* Sacc. & Berl. e verificou que a temperatura de 30°C foi a que permitiu maior crescimento do fungo em questão. Já Groenewald et al. (2006) avaliaram o efeito de temperaturas entre 6°C e 40°C sobre o crescimento micelial de *C.*

beticola, *C. apii* e *Cercospora* sp. (isolado proveniente da Venezuela), cultivados por oito dias em meio MEA. Os autores encontraram maiores valores de diâmetro de colônias na temperatura de 27°C para *C. beticola* e *C. apii*, enquanto o isolado de *Cercospora* sp. proveniente da Venezuela apresentou maior crescimento micelial quando submetido à temperatura de 24°C.

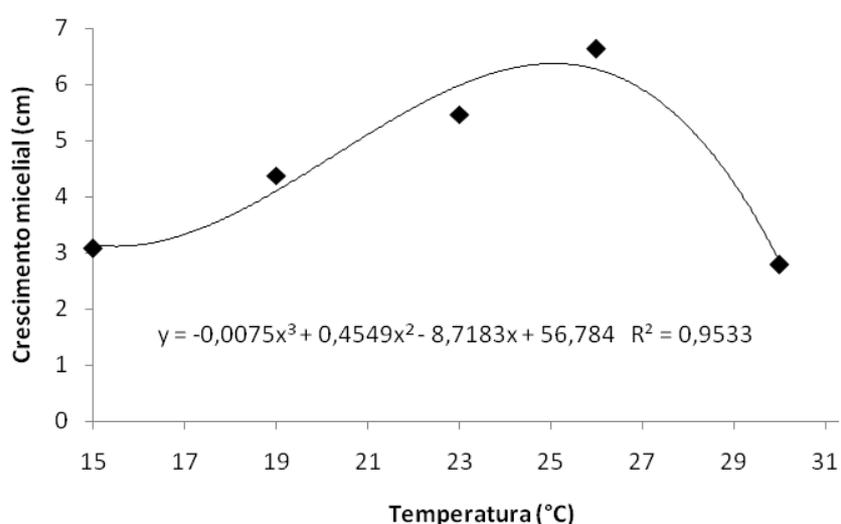


Figura 10 Curva de crescimento micelial de isolados de *Cercospora* de cedro australiano (cultivados por 21 dias em MEA) em função de diferentes temperaturas de incubação (15, 19, 23, 26 e 30°C)

4.6 Produção de cercosporina sob diferentes temperaturas

Houve interação significativa entre isolados e temperaturas para a variável conteúdo de cercosporina. Os isolados comportaram-se de forma diferenciada de acordo com as temperaturas. Os isolados com maior capacidade de produção de cercosporina foram HR01 e HR02, cujas médias foram de 2,63 e 2,70 $\mu\text{mol}.\text{disco}^{-1}$, respectivamente (Figura 11). O isolado HR04 apresentou

conteúdo de cercosporina de $1,47 \mu\text{mol.disco}^{-1}$, e a menor média foi observada para o isolado HR03 (Figura 11).

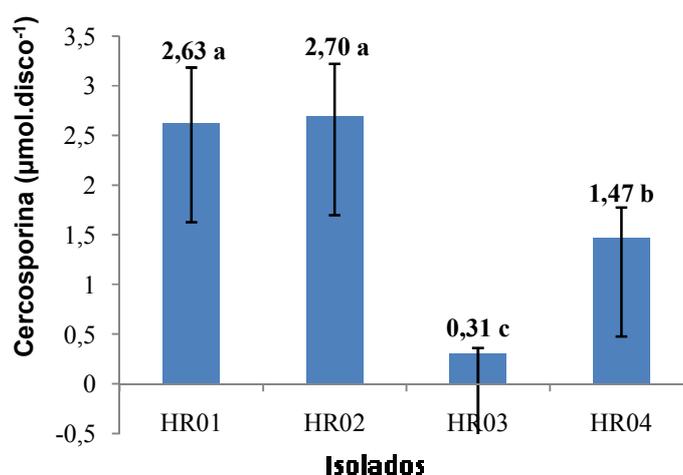


Figura 11 Conteúdo de cercosporina produzido por diferentes isolados de *Cercospora* do cedro australiano

Legenda: Barras nas colunas indicam o erro padrão de cada tratamento.

Avaliando-se a produção de cercosporina dos isolados quando submetidos às diferentes temperaturas, verificou-se que o isolado HR01 apresentou maior pico de produção dessa toxina aos 23°C , com média de $4,84 \mu\text{mol.disco}^{-1}$ (Figura 12). O isolado HR02 apresentou maior capacidade de produção de cercosporina sob temperaturas amenas, com maior acúmulo observado sob $21,6^{\circ}\text{C}$, com média de $4,61 \mu\text{mol.disco}^{-1}$ (Figura 12). Para o isolado HR04, o pico de produção deu-se sob $22,1^{\circ}\text{C}$, com média de $2,30 \mu\text{mol.disco}^{-1}$ (Figura 12). Fajola (1978) avaliou o efeito de temperaturas entre 10 e 35°C sobre o acúmulo de cercosporina em *C. ricinella* Sacc. & Berl. As culturas foram incubadas por dez dias em câmaras BOD com fotoperíodo de 12

horas, seguindo a extração em acetona. O autor encontrou 22,5°C como temperatura ideal para produção da toxina, cuja média foi de 120 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de superfície de cultura. No presente trabalho, as máximas médias observadas para os isolados de *Cercospora* do cedro australiano ficaram entre 21,6 e 23°C (Figura 12), faixa de temperatura próxima à temperatura ideal obtida por Fajola (1978) para *C. ricinella*. Sob temperatura elevada (30°C), todos os isolados deste ensaio apresentaram baixo conteúdo de cercosporina (Figura 12). De acordo com Daub e Chung (2009), a produção de cercosporina é, nitidamente, inibida quando o fungo é submetido a temperaturas elevadas (30°C). Jenns, Daub e Upchurch (1989) verificaram maior acúmulo de cercosporina quando as culturas (de cinco espécies de *Cercospora*) foram submetidas à temperatura de 20°C do que quando mantidas a 30°C. Além disso, os autores verificaram padrão de bandas de proteínas formadas por *C. kikuchii* aos 20°C distinto daquele observado para o mesmo fungo quando cultivado sob 30°C. Independente da temperatura, o isolado HR03 apresentou baixa produção de cercosporina, com média geral igual a 0,308 $\mu\text{mol}\cdot\text{disco}^{-1}$ (Figura 12). Todavia, a cultura monospórica obtida inicialmente apresentou, visualmente, coloração mais avermelhada que as culturas do mesmo isolado no momento em que foram utilizadas para realizar este ensaio. Jenns, Daub e Upchurch (1989), também, observaram nos isolados individuais de sua coleção, variações na produção de cercosporina ao longo do tempo, mesmo mantidos sob as mesmas condições. Dessa forma, pode-se inferir que essa variação é uma particularidade observada nesse grupo de fungos.

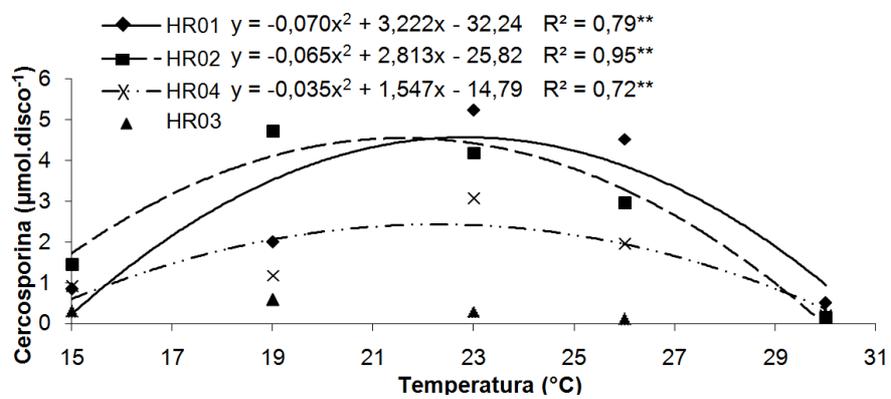


Figura 12 Níveis de produção de cercosporina de quatro isolados de *Cercospora* do cedro australiano quando submetidos a diferentes temperaturas

5 CONCLUSÕES

Os quatro isolados obtidos de cedro australiano apresentam características morfológicas de *Cercospora meliicola*.

A região gênica ITS permite identificar os isolados do cedro ao nível de gênero como *Cercospora* sp. A região actina, bem como sua combinação com a região ITS, classificam os quatro isolados de *Cercospora* do cedro como *C. alchemillicola*.

A *Cercospora* do cedro penetra por ferimentos e *Phyllachora balansae* auxilia na penetração criando portas de entrada.

Os isolados de *Cercospora* do cedro apresentam maior crescimento micelial quando cultivados sob a temperatura de 24,8°C.

Os isolados HR01 e HR02 apresentam maior conteúdo de cercosporina. Temperaturas entre 21,6°C e 23°C favorecem a produção dessa toxina.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectiva futura para este trabalho tem-se o estudo de novas regiões gênicas visando à obtenção de informações que corroborem com a resolução da filogenia da espécie de *Cercospora* associada ao cedro australiano no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. New York: Academic, 2005. 922 p.
- ALVES, E. et al. Scanning electron microscopy for fungal sample examination. In: GUPTA, V. K.; TUOHY, M. (Org.). **Laboratory protocol in fungal biology**: current methods in fungi biology. New York: Springer, 2012. v. 1, p. 133-150.
- AYALA-ESCOBAR, V.; YANEZ-MORALES, M. J. *Cercospora agavicola*: a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. *azul* from Mexico. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 93, p. 115-121, July/Sept. 2005.
- BEGEROW, D. et al. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, p. 99-108, Apr. 2010.
- BELA VISTA FLORESTAL. **Recomendações de plantio para cedro australiano**: versão mudas clonais 2.0. Campo Belo, 2013. Disponível em: <http://www.belavistaflorestal.com.br/informativos_e_documentos.php>. Acesso em: 10 mar. 2014.
- BRAUN, U.; HILL, C. F. Some new micromycetes from New Zealand. **Mycological Progress**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2002.
- BRUNELLI, K. R. et al. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 1, p. 92-94, 2006.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, New York, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.
- CHUPP, C. **A monograph of the fungus genus *Cercospora***. Ithaca: Science, 1954. 667 p.

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

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

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

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa, MG: SIF, 1989. 570 p.

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

GRIJPMAN, P.; RAMALHO, R. S. *Toona* spp., posibles alternativas para el problema del barrenador *Hypsipyla grandella* de las Meliaceae en America Latina. **Turrialba**, San José, v. 19, n. 4, p. 531-547, 1969.

GROENEWALD, J. Z. et al. *Cercospora* speciation and host range. In: LARTEY, R. T. et al. (Ed.). **Cercospora leaf spot of sugar beet and related species**. Ames: APS, 2010. p. 21-37.

GROENEWALD, J. Z. et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 75, p. 115-170, Sept. 2012.

GROENEWALD, M. et al. Host range of *Cercospora appi* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. **Mycologia**, New York, v. 98, n. 2, p. 275-285, 2006.

HENNEBERT, G. L.; SUTTON, B. C. Unitary parameters in conidiogenesis. In: HAWKSWORTH, D. L. (Ed.). **Ascomycete systematics, problems and perspective in the nineties**. New York: ASI, 1994. p. 65-76. (NATO ASI Series, 296).

HIGHTOWER, R. C.; MEAGHER, R. B. The molecular evolution of actin. **Genetics**, Austin, v. 114, p. 315-332, 1986.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.

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, p. 213-219, 1989.

KALIL FILHO, A. N.; WENDLING, I. **Produção de mudas de cedro australiano**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2012. 5 p. (Comunicado Técnico, 309).

KUYAMA, S.; TAMURA, T. Cercosporin a pigment of *Cercospora kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu: I., cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. **Journal of the American Chemistry Society**, Washington, v. 79, p. 5725-5726, 1957.

LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos**. Eschborn: GTZ, 1990. 343 p.

MANGLIAVORI, A. et al. Dasometria en plantaciones comerciales de toona (*Toona ciliate* var. *australis*) em la Provincia de Salta. In: JORNADAS TÉCNICAS FORESTALES Y AMBIENTALES, 10., 2003, Eldorado. **Anais...** Eldorado: Facultad de Ciências Forestales, 2003. 1 CD-ROM.

MONTENEGRO-CALDERÓN, J. G. et al. Molecular identification of two strains of *Cercospora rodmanii* isolated from water hyacinth present in Yuriria lagoon, Guanajuato, Mexico and identification of new hosts for several other strains. **Fungal Biology**, New York, v. 115, n. 11, p. 1151-1162, 2011.

MYCOBANK. **Fungal databases nomenclature and species banks.**

Disponível em: <<http://www.mycobank.org>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank sequence database.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>.

Acesso em: 10 fev. 2014.

PHENGSIINTHAM, P. et al. Monograph of Cercosporoid fungi from Laos.

Current Research in Environmental & Applied Mycology, Chicago, v. 3, n. 1, p. 34-158, 2013.

PINHEIRO, A. L.; LANI, J. L.; COUTO, L. **Cedro-Australiano: cultivo e utilização** (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis* (F. Muell) Bahadur). Viçosa, MG: UFV, 2003. 42 p.

PORTER, T. M.; GOLDING, G. B. Are similarity – or phylogeny – based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytologist**, Oxford, v. 192, n. 3, p. 1-8, 2011.

POZZA, E. A.; CARVALHO, L. V.; CHALFOUN, S. M. 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.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

ROSA, D. D. et al. Ocorrência de queima foliar em árvores de Santa Bárbara (*Melia azedarach*) causado por *Cercospora meliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 72-73, 2009.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **PNAS**, Washington, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SCHWARTZ, H. F.; GENT, D. H. **Safflower: cercospora leaf spot: high plains IPM guide**, a cooperative effort of the University of Wyoming, University of Nebraska, Colorado State University and Montana State University. Disponível em: <<http://www.highplainsipm.org>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

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

SOUZA, J. C. A. V.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. **Cedro australiano (*Toona ciliata*)**. Niterói: Programa Rio Rural, 2010. 12 p. (Manual Técnico, 21).

TAINTER, F. H.; BAKER, F. A. **Principles of forest pathology**. New York: J. Wiley, 1996. 803 p.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, Oct. 2013.

TO-ANUN, C.; HIDAYAT, I.; MEEBOON, J. Genus *Cercospora* in Thailand: taxonomy and phylogeny: with a dichotomous key to species. **Plant Pathology & Quarantine**, Chiang Rai, v. 1, n. 1, p. 11-87, 2011.

ULLOA, M.; HANLIN, R. T. **Illustrated dictionary of mycology**. Saint Paul: APS, 1999. 448 p.

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.

WHITE, T. J. T.; BRUNS, S. L.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

ZACARONI, A. B. et al. Occurrence of *Phyllachora balansae* in *Toona ciliata* in Southern Minas Gerais State, Brazil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 3, p. 219-220, 2013.