

SEVERIDADE E PRODUÇÃO DE CERCOSPORINA EM ISOLADOS DE *CERCOSPORA COFFEICOLA*¹

Maria Eduarda Rodrigues Andrade²; Mário Lucio Vilela de Resende³, Deila Magna dos Santos Botelho⁴, Alexandre Rezende Teixeira⁵; Wilder Douglas Santiago⁶; Matheus Brito Pereira⁷; Fábio de Oliveira Santos⁸; Edson Ampélio Pozza⁹; Bárbara Alves do Santos Ciscón¹⁰; Dario Amadeu de Muniz Oliveira¹¹.

¹ Trabalho financiado Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café-CBPDCafé e Instituto de Ciência e Tecnologia do Café- ICT Café

² Bolsista PIBIC UFLA, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG eduardmaria04@hotmail.com.

³ Professor, PhD, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, mlucio@ufla.br.

⁴ Bolsista Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café –INCT Café, UFLA, Lavras MG deilamagna@hotmail.com

⁵ Técnico Pesquisador, MS, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, alexandre.teixeira@ufla.br.

⁶ Bolsista Capes ,Dr., Universidade Federal de Lavras ,Lavras –MG, wildaoquimica@msn.com

⁷ Bolsista PIBIC CNPQ, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, matheusbritopereira10@gmail.com

⁸ Bolsista PIBIT CNPQ, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, fabio.oliveiras@outlook.com.br

⁹ Professor, Dr., Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, edsonpozza@gmail.com

¹⁰ Doutora, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, barbarasciscón@gmail.com.

¹¹ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, MS darioamadeu@hotmail.com.

RESUMO: Com o presente estudo, objetivou-se avaliar a produção de cercosporina e a severidade da cercosporiose em diferentes isolados de *Cercospora coffeicola*. O estudo foi conduzido *in vitro* e *in vivo*, com os isolados LFP 24, LFP 37, LFP 75 e LFP 68 provenientes dos municípios brasileiros Ilicínea-MG, Bonfinópolis de Minas-MG, Manhuaçu-MG e Nova Fátima-PR, respectivamente. Nos testes *in vitro* foi quantificada a produção de cercosporina nos isolados de *C. coffeicola* avaliados, os quais foram repicados para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), mantidas em incubadora BOD (Bio-Oxygen Demand) à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h. Após 12 dias, 1g de micélio foi extraído dos bordos das colônias, transferido para frascos contendo 20mL de clorofórmio os quais foram centrifugado a 2.800 rpm por 30min. A quantificação da cercosporina foi realizada em Cromatógrafo UFLC 468 nm. O experimento *in vivo* foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, utilizando mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, com três pares de folhas definitivas as quais foram inoculadas com os isolados LFP 24, LFP 37, LFP 75 e LFP 68. As avaliações de severidade da doença foram realizadas 30 dias após a inoculação, utilizando escala diagramática. Observou-se que os isolados de *C. coffeicola* testados apresentaram variação tanto com relação a produção da toxina *in vitro* quanto na severidade da doença. O isolado LFP 75 produziu uma maior quantidade de cercosporina, bem como apresentou maior de severidade da doença, sugerindo que a produção da toxina e a severidade da cercosporiose possivelmente sejam relacionadas.

PALAVRAS-CHAVE: cercosporiose, fitotoxina, cromatógrafo líquido UFLC.

SEVERITY AND PRODUCTION OF CERCOSPORIN IN ISOLATES OF *CERCOSPORA COFFEICOLA*

ABSTRACT: The current study aimed to evaluate the cercosporin production and disease severity caused by different strains of *Cercospora coffeicola*. The study was conducted *in vitro* and *in vivo*, with isolates LFP 24, LFP 37, LFP 75 and LFP 68 from the Brazilian cities of Ilicínia-MG, Bonfinópolis de Minas-MG, Manhuaçu-MG, and Nova Fátima-PR, respectively. Cercosporin production *in vitro* by *C. coffeicola* strains was evaluated and quantified. The colonies were subcultured to 9 cm diameter Petri dishes containing PDA medium (potato, dextrose, agar) and incubated at 25°C and 12h photoperiod (Bio-Oxygen Demand incubator). After 12 days, 1g of mycelium was extracted from the edges of the colonies and transferred to flasks containing 20mL chloroform, which were centrifuged at 2,800rpm for 30min. Cercosporin quantification was performed on UFLC Liquid Chromatograph at 468 nm. The *in vivo* experiment was carried out in a greenhouse of the Department of Plant Pathology of the Federal University of Lavras. Mundo Novo 376/4 coffee seedlings, with three definite leaf pairs, were inoculated with the studied strains. Disease severity assessment was performed 30 days after fungal inoculation. The *C. coffeicola* tested strains differed concerning *in vitro* toxin production and disease severity. Among the studied strains, LFP 75 produced the highest amount of cercosporin, as well as presented the highest disease severity, suggesting that toxin production and severity of brown eye spot disease are possibly related.

KEY WORDS: brown eye spot, phytotoxin, liquid chromatograph UFLC.

INTRODUÇÃO

A cercosporiose, doença também conhecida por mancha-de-olho-pardo, tem como agente etiológico o fungo *Cercospora coffeicola*, pertencente à família Dematiaceae, ordem Moniliales, classe dos fungos mitospóricos. A doença é endêmica em todas as regiões produtoras de café do Brasil. Os sintomas nas folhas manifestam-se como manchas circulares, com 0,5-1,5cm de diâmetro, com o centro acinzentado, envolvidas por um halo amarelado (Pozza et al., 2010).

A cercosporiose causa perdas significativas na produção devido à queda prematura das folhas, principalmente em mudas nos viveiros e em plantas adultas no campo, além de afetar negativamente produção, rendimento e a qualidade de bebida (Lima et al., 2012; Pozza et al., 2010). Quando práticas adequadas de manejo são negligenciadas e, dependendo dos fatores ambientais (localização geográfica e microclima da região) as perdas podem chegar a 30% da produção (Souza et al., 2015; Zambolim et al., 1997). Segundo Del Peloso et al., (1989), espécies do gênero *Cercospora* apresentam crescimento lento e escassez de esporulação em meios artificiais e produzem um metabólito secundário de coloração vermelha conhecida como cercosporina (Daub & Chung, 2007; Fajola, 1978). A cercosporina é ativada na presença de luz, isto é, em presença de luz a cercosporina torna-se excitada adquirindo capacidade de interagir e danificar macromoléculas.

De acordo com Daub & Chung (2007), essa toxina é um fator de virulência que aumenta significativamente a incidência e severidade da doença. Alguns trabalhos relacionando à produção de cercosporina em isolados de *C. coffeicola* foram realizados utilizando escala de notas (Souza et al., 2012) ou extração em hidróxido de potássio (Silva et al., 2016). Contudo, estudos com a quantificação dessa toxina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) não foram encontrados na literatura.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi quantificar a cercosporina produzida por isolados de diferentes localidades do Brasil, correlacionando esses dados com a severidade da doença em mudas de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras –Lavras, MG. Foram utilizados quatro isolados de *C. coffeicola* provenientes de diferentes municípios do Brasil (Figura1). Os isolados estão preservados e armazenados no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo no Departamento de Fitopatologia.

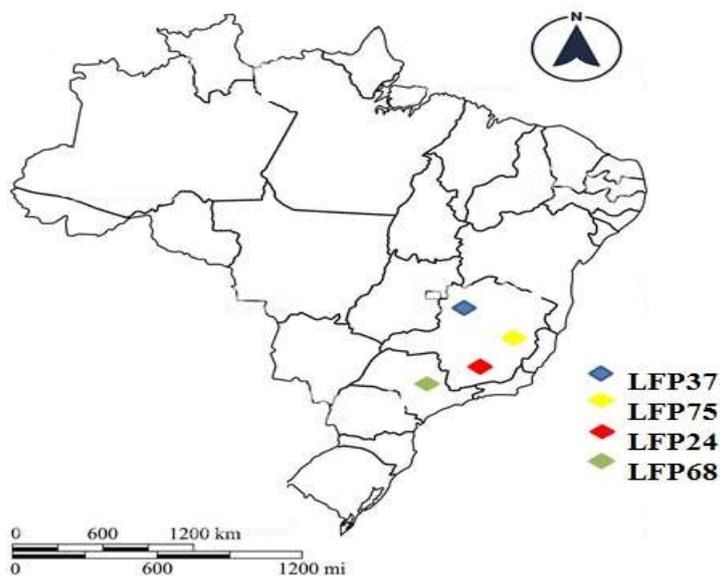


Figura 1. Localização geográfica dos isolados de *C. coffeicola* utilizados no estudo. LFP 24: Ilicínea MG; LFP 37: Bonfinópolis de Minas MG; LFP75: Manhuaçu MG; LFP68: Nova Fátima PR.

Para realização do experimento *in vitro* os isolados foram repicados para placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo 9 mL de meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar), as quais foram mantidas em incubadora BOD (Bio-Oxygen Demand) à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12h. Após 12 dias, foi extraído 1g de micélio dos bordos das colônias, transferido para frascos contendo 20 mL de clorofórmio os quais foram centrifugado a 2.800 rpm por 30 min. Após a centrifugação e filtragem foram realizadas análises cromatográficas no Laboratório de Análises Químicas, localizado na Agência de Inovação do Café (Inova Café).

A quantificação da concentração de cercosporina nos isolados LFP 24, LFP 37, LFP 75 e LFP 68 foi realizada em cromatógrafo UFLC Shimadzu, equipado com bomba quaternária de alta pressão modelo LC-20AT, degaseificador modelo DGU-20A5, injetor automático modelo SIL-20A HT, forno CTO-20A operado a temperatura ambiente e detector UV-Vis SPD-20A utilizando-se o comprimento de onda de 468 nm e interface modelo CBM-20A. Para realização das análises foi utilizada a coluna Shim-pack CLC-ODS (15cm x 6.0mmD.I., 5µm) conectada a uma pré-coluna Eclipse XDB-C18 (4,6 x 12,5mm, 5µm). O método cromatográfico utilizado foi adaptado de Gunasinghe et al. (2016), que propõe a análise em modo gradiente consistindo de uma fase móvel formada por 5% v/v de ácido acético em água (eluente A), acetonitrila (eluente B) e fluxo de 1,5mL. Min-1. Utilizou-se gradiente linear variando de 50 a 70% do eluente B nos primeiros 8 minutos, seguida por uma mudança para 100% do eluente B em 1 minuto. A fase móvel de 100% acetonitrila (eluente B) foi mantida por 6 minutos, após isto, uma mudança para 50% do eluente B com gradiente linear no decorrer de 10 minutos foi realizado para reequilibrar a coluna.

O experimento *in vivo*, foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, utilizando mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4, suscetível a cercosporiose. O experimento foi instalado em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições e a parcela experimental constituída por três plantas. Para esporulação dos isolados realizou-se metodologia proposta por Souza et al. (2012) com modificações. Oito discos de micélio do fungo, obtidos de colônias com 15 dias, foram macerados e depositados em erlenmeyers contendo 20 mL do meio de cultura V8 líquido (10% de suco V8, 90% de água destilada) e agitados a 100 rpm por quatro dias em temperatura ambiente. Posteriormente, o líquido contendo o micélio foi vertido em placas contendo ágar-água e as mesmas permaneceram abertas em BOD por quatro dias para a secagem. Após esse período, foram adicionados a cada placa 10mL de água esterilizada para a remoção dos conídios com o auxílio de alça de Drigasliki. A suspensão de conídios foi filtrada em gaze para a remoção dos resíduos e padronizada para concentração de 3×10^4 esporos/mL em câmara de Neubauer. A inoculação das mudas foi realizada pela pulverização da suspensão na face abaxial das folhas de cafeeiro. Posteriormente as mudas foram mantidas em câmara úmida, por 72 horas, para propiciar molhamento foliar para o processo de infecção. A avaliação da severidade cercosporiose foi realizada 30 dias após a inoculação. Foram avaliados dois pares de folhas inoculadas em cada planta. A severidade foi quantificada por meio da escala diagramática proposta por Custódio et al. (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se variação na concentração de cercosporina produzida pelo isolados testados (Figura 2). A concentração da toxina no isolado LFP 24 não foi detectada. Já nos isolados LFP 37 e LFP 68 as concentrações foram 1,9µM e 2,1µM, respectivamente. O isolado LFP 75 destacou-se na produção da toxina 7,5µM sendo o maior produtor entre os isolados testados. Outros trabalhos conduzidos no patossistema cafeeiro x *C. coffeicola* também verificaram variação na produção da toxina em diferentes isolados. Souza et al. (2012) avaliando 60 isolados de *C. coffeicola* constataram diferença na produção de cercosporina nos isolados estudados. Silva et al. (2016), quantificando a concentração de cercosporina em 10 isolados de *C. coffeicola* por meio do método colorimétrico (Jenns et al., 1989), verificaram variação de 0,5µM a 1,43µM nos isolados testados. No presente trabalho, utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para quantificação da cercosporina. Apesar de não existirem relatos na literatura acerca da quantificação de cercosporina em *C. coffeicola* por meio de HPLC, esta técnica é altamente precisa e eficaz na detecção e quantificação de metabólitos.

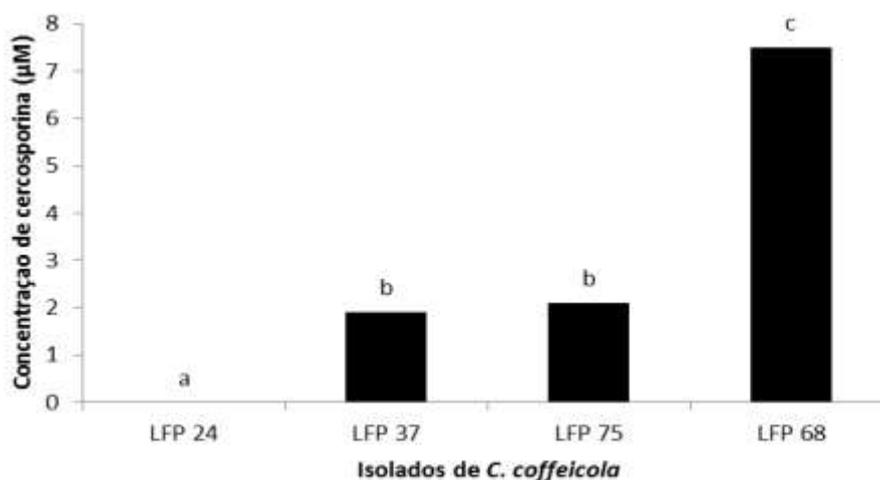


Figura 2. Produção de cercosporina nos isolados de *C. coffeicola* LFP 24, LFP 68, LFP 37 e LFP 75. Medias seguidas pela mesma letra minúscula na barra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Assim como observado para produção de cercosporina, os isolados também apresentaram variação com relação à severidade da doença (Figura 3). Os isolados LFP 37 e LFP 68 apresentaram menor severidade da doença. O isolado LFP 75 apresentou maior concentração da toxina e severidade da doença. Resultados semelhante foi constatado para o isolado LFP 24, o qual apresentou a menor severidade da doença e a concentração de cercosporina não foi detectada pelo método utilizado. No entanto, nos isolados LFP 37 e LFP 68 a severidade da doença não relacionou-se com a produção da toxina, sugerindo a interferência de outros fatores na interação planta patógeno. Outros trabalhos relatam a variabilidade de isolados de *C. coffeicola* em relação a severidade da cercosporiose (Souza et al., 2012; Dell'Acqua et al., 2011). De acordo com Narayanasamy (2011) a variabilidade de severidade em isolados de fungos pode ser devida a fatores genéticos os quais são condicionados por condições ambientais. Vale ressaltar que a avaliação de severidade da doença foi realizada apenas uma vez, aos 30 dias após a inoculação. Possivelmente, avaliações da doença por um período prolongado pode constatar uma variação do progresso da doença, quantificando maior ou menor maior severidade da doença, de acordo com característica intrínseca do isolado. Desse modo, estudos futuros poderão comprovar possivelmente que a concentração da fitotoxina cercosporina em isolados de *C. coffeicola* quando inoculados, seja relacionada com a severidade da cercosporiose em plantas de cafeeiro

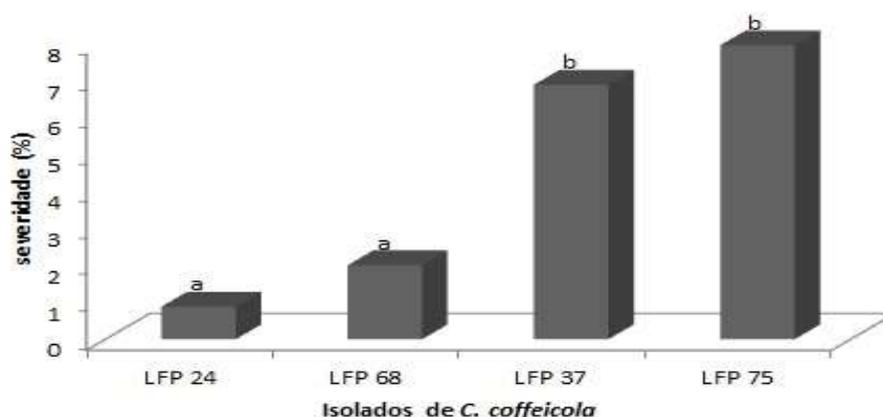


Figura 3. Severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro inoculadas com isolados de *C. coffeicola*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na barra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

CONCLUSÕES

1. A concentração de cercosporina apresenta variação entre isolados de *C. coffeicola*.
2. Os isolados de *C. coffeicola* diferem quanto à severidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro.
3. A produção da toxina e a severidade da cercosporiose possivelmente sejam relacionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHALFOUN, S.M. *Doenças do cafeeiro: importância, identificação e métodos de controle*. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 93p.
- GUNASINGHE, N.; YOU, M. P.; CAWTHRAY, G. R.; BARBETTI, M. J. Cercosporin from *Pseudocercospora capsellae* and its critical role in White Leaf Spot development. *Plant Disease*. August 2016. pag 1521-1531.
- CUSTÓDIO, A. A. P., POZZA, E. A., GUIMARÃES, S. S. C., KOSHIKUMO, E. S. M., HOYOS, J. M. A., SOUZA, P. E. Comparação e validação de escalas diagramáticas para cercosporiose em folhas de cafeeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1067–1076, 2011.
- DAUB, ME.;BRIGGS,S.P. As alterações na composição da membrana celular do tabaco e da estrutura causadas pela toxina fúngica cercosporina. *Plant Physiology*, Glasgow, Reino Unido, v.7, p.763-766.1983.
- DAUB, ME.; CHUNG, K.R. Cercosporin: A Phytoactivated Toxin in Plant Disease **Journal, Saint Paul, USA**. Online APSnet. 2007.
- DELL' ACQUA, R., MANTOVANI, E. S., BRAGHINI, M. T., OLIVEIRA,C. M. G., HAKAKAVA, R., ROBAINA A. S., PETEK, M. R., PATRICIO, F. R. A. Variabilidade *in vitro*, *in vivo* e molecular de isolados de *Cercospora coffeicola* *Tropical Plant Pathology*, v. 36, 5, 313-326, 2011.
- DEL PELOSO,M.J.;CARDOSO,A.A;VIEIRA,C.;SARAIVA,L.S.AND ZIMMERMANN,M.J.DE O. Genetic system for the reaction of *Phaseolus vulgaris* to the BA-2(alpha) race of *Colletorichum lindemuthianum*. *Revista Brasileira de Genética*. Ribeirão Preto, Brasil, v.12, p.313-318.1989.

- FAJOLA, A.O. Cercosporin, a phytotoxina from *Cercospora* spp. *Physiological Plant Pathology*. Maryland, EUA, v.13, p.157-164.1978.
- LIMA, L. M., POZZA, E. A., SANTOS, F. S. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. *Journal of Phytopathology*, v.160, n.4,p. 209– 211, 2012.
- JENNS, A. E., DAUB, M. E., UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology*, v. 79, p.213– 219, 1989.
- 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.
- SILVA, M. G., POZZA, E. A., MONTEIRO, F. P., LIMA, C. V. R. (2016). Effect of light and temperature on *Cercospora coffeicola* and *Coffea arabica* pathosystem. *Coffee Science*, v.11, n.2, p. 148– 160, 2016.
- SOUZA, A. G. C., MAFFIA, L. A., SILVA, F. F., MIZUBUTI, E. S. G., TEIXEIRA, H. A time series analysis of brown eye spot progress in conventional and organic coffee production systems. *Plant Pathology*, v.64, p. 157– 166, 2015.
- SOUZA A. G. C., MAFFIA, L. A., MIZUBUTI, E. S. G. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. *Journal of Phytopathology*, v.160, n.10, p.540–546,2012
- NARAYANASAMY, P. Assessment of variability in fungal plant pathogens. In: P. Narayanasamy (Ed.), *Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis* (Vol. 4, pp. 245– 272).Dordrecht, the Netherlands: Springer, 291p, 2011.