

**RICARDO BRAINER MARTINS**

**VARIABILIDADE DE *Cercospora coffeicola* EM MINAS GERAIS COM  
BASE EM COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E PRODUÇÃO DE  
CERCOSPORINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M386v  
2007

Martins, Ricardo Brainer, 1976-

Variabilidade de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais com base em compatibilidade vegetativa e produção de cercosporina / Ricardo Brainer Martins. – Viçosa, MG, 2007.

xi, 86f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luiz Antonio Maffia.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Cercospora coffeicola* - Genética.  
2. *Cercospora coffeicola* - Populações. 3. Marcadores genéticos. 4. Mancha-de-olho-pardo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 632.4

**RICARDO BRAINER MARTINS**

**VARIABILIDADE DE *Cercospora coffeicola* EM MINAS GERAIS COM  
BASE EM COMPATIBILIDADE VEGETATIVA E PRODUÇÃO DE  
CERCOSPORINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 04 de maio de 2007.



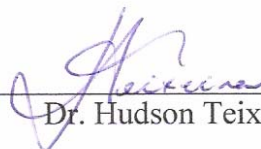
Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti  
(Co-Orientador)



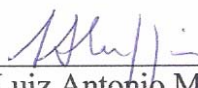
Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias  
(Co-Orientador)



Prof. Acelino Couto Alfenas



Dr. Hudson Teixeira



Prof. Luiz Antonio Maffia  
(Orientador)

Aos meus pais, Ramiro Martins (*in memoriam*) e Maria Brainer Martins.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Antonio Maffia, pela paciência, dedicação, orientação e amizade.

Aos co-orientadores, Prof. Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias, pela orientação e pelas sugestões durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas, pelas sugestões proferidas durante a defesa.

Ao Dr. Hudson Teixeira, pelas sugestões proferidas durante a defesa, pelo contato com os produtores e pelo suporte durante as viagens para coleta de amostras.

Ao Prof. Sami Jorge Michereff (UFRPE), pelos esforços empreendidos para me ensinar os primeiros passos da Fitopatologia e, em especial, pela amizade.

À minha mãe, Cely, aos meus irmãos, Marcos e Sheyla, e demais familiares pelo apoio incondicional e ajuda durante o curso.

À Catarina Mori, pelo amor, pela paciência e dedicação. Sempre ao meu lado me apoiando nos momentos mais difíceis.

Aos alunos da Iniciação Científica, Eugênio Chaves e Hiunes M. Murta, pela dedicação, pelo empenho e pela competência na execução das atividades experimentais.

À Bia Mori, pelo auxílio na confecção dos *abstracts*.

Ao Cristiano Caixeta Nunes, pelo contato com os produtores e suporte durante as viagens para coleta de amostras.

Aos cafeicultores de Minas Gerais, por permitirem a coleta de amostras em suas propriedades.

Ao Leonardus Vergutz, pelo auxílio no início do projeto.

Aos amigos da pós-graduação, em especial, Aderlan, Dani, Dartanhã e Wânia, pelo convívio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia, em especial, ao Valdir, Luciano e André (Coringa), pelo bom convívio, “fritaço” e amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UFV, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial ao Marcão (Marcos Rogério), pela eficiência e ajuda no decorrer do curso.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que involuntariamente não foram citados, mas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

RICARDO BRAINER MARTINS, filho de Ramiro Martins e Maria Brainer Martins, nasceu em Carpina-PE, no dia 09 de janeiro de 1976.

Concluiu o 2º grau na Escola Agrotécnica Federal de Barreiros, Barreiros-PE, no ano de 1993.

Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, em 2000.

Em abril de 2001 iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo a dissertação em 10 de março de 2003.

Em abril de 2003 iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, defendendo tese em 4 de maio de 2007.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências bibliográficas.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
A cercosporiose do cafeeiro.....	5
Etiologia e epidemiologia da cercosporiose do cafeeiro.....	6
Mudanças ocorridas no sistema de cultivo dos cafezais.....	7
Variabilidade de isolados de <i>Cercospora coffeicola</i> .....	8
Mecanismos geradores de variabilidade entre indivíduos.....	8
Mecanismos geradores de variabilidade entre populações.....	9
Estrutura genética de populações.....	13
Estrutura genética da população de <i>Cercospora coffeicola</i> em Minas Gerais.....	15
Caracterização de grupos de compatibilidade vegetativa.....	16
Produção de cercosporina.....	17
Referências bibliográficas.....	20
3. Genetic variability of <i>Cercospora coffeicola</i> in Minas Gerais State, Brazil, characterized by vegetative compatibility.....	27
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Material and methods.....	31
Sampling, isolation, and selection of isolates.....	31
Selection and characterization of <i>nit</i> mutants.....	33
Identification of compatibility among isolates.....	33
Data analysis.....	34
Results.....	36
Selection and characterization of <i>nit</i> mutants.....	36

Identification of compatibility among isolates.....	37
Characterization of vegetative compatibility groups.....	38
Genetic structure based on VCG analysis.....	38
Discussion.....	41
Acknowledgments.....	46
Literature cited.....	47
4. Variabilidade de isolados de <i>Cercospora coffeicola</i> oriundos de cafezais convencionais e orgânicos de três regiões do Estado de Minas Gerais com base na produção de cercosporina.....	62
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
Material e métodos.....	67
Plano de amostragem, isolamento e obtenção e seleção de isolados monospóricos.....	67
Variabilidade de <i>Cercospora coffeicola</i> com base na produção de cercosporina.....	68
Análise dos dados.....	69
Resultados.....	70
Discussão.....	71
Agradecimentos.....	74
Referências bibliográficas.....	75
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	86

## RESUMO

MARTINS, Ricardo Brainer, D. Sc. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2007. **Variabilidade de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais com base em compatibilidade vegetativa e produção de cercosporina.** Orientador: Luiz Antonio Maffia. Co-Orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Luiz Antônio dos Santos Dias.

A cercosporiose é considerada uma doença emergente na cafeicultura. Entretanto, há pouca informação sobre a biologia e ecologia do agente etiológico, *Cercospora coffeicola*. Para caracterizar a variabilidade de populações do patógeno associadas a cafeeiros nos sistemas convencional e orgânico em três regiões de Minas Gerais, efetuou-se um plano de amostragem hierarquizado com os seguintes níveis: 1. Região (Sul, Triângulo e Mata); 2. Sistema de cultivo (orgânico e convencional); 3. Lavouras. De 420 isolados monospóricos obtidos, selecionaram-se, aleatoriamente, 90 para o estudo. Para caracterizar a variabilidade, utilizaram-se dois marcadores: compatibilidade vegetativa e produção *in vitro* de cercosporina. Avaliou-se a compatibilidade vegetativa pelo emprego de mutantes auxotróficos incapazes de utilizar nitrato como única fonte de nitrogênio (Mutantes *nit*). Por meio de testes de complementação, identificaram-se 28 grupos de compatibilidade vegetativa (GCV). Dos 28, 10 foram multimembros, com 56,6% dos isolados, enquanto 18 constituíram-se por apenas um isolado, sendo restritos a lavouras específicas. Com base na distribuição dos GCVs entre os níveis estudados, efetuou-se análise de variância e

estimaram-se índices de diversidade. Atribuiu-se a maior parte da variação encontrada (92,05%) a isolado. Não houve diferença quanto à diversidade para os níveis estudados. Apenas membros de um GCV ocorreram nas três regiões, e os membros dos demais GCVs ocorreram em uma ou duas regiões. Em ensaios *in vitro*, avaliou-se a produção de cercosporina, que variou de 1,71 a 35,327  $\mu\text{Mol}$  por isolado. O percentual em relação à variância total entre isolados foi de 1,9; 7,8 e 48,9% para os níveis região, lavoura e isolados, respectivamente. Não se detectou efeito do sistema de cultivo ( $P=0,88$ ) na variabilidade. Estimaram-se medidas de dissimilaridade entre isolados (índice de Malahanobis) e procedeu-se à análise de agrupamento (UPGMA) para definir grupos de produção similar de cercosporina (GPC). Isolados com produção média e mínima de cercosporina predominaram na população. Com base nos marcadores utilizados, há evidências de que a população estudada tem alta variabilidade, a qual não é afetada por região, sistema de cultivo e lavoura.

## ABSTRACT

MARTINS, Ricardo Brainer, D. Sc. Universidade Federal de Viçosa, May of 2007. **Variability of *Cercospora coffeicola* in Minas Gerais State, Brazil, characterized by vegetative compatibility and production of cercosporina.** Adviser: Luiz Antonio Maffia. Co-Advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Luiz Antônio dos Santos Dias.

The *Cercospora* leaf spot is considered an emergent disease in the coffee culture. However there is little information about the biology and ecology of the causal agent, *Cercospora coffeicola*. The aim of this study was to characterize the variability of pathogens populations associated to coffee trees in both conventional and organic systems in three Minas Gerais regions. A hierarchical sampling plan was performed with the following levels: 1. State geographical regions (Sul, Triângulo, and Mata); 2. Crop system (organic and conventional); 3. Plantings. Out of 420 monosporic isolates collected, 90 were randomly selected. To characterize the variability, two markers were used: vegetative compatibility and production of cercosporin in vitro. Vegetative compatibility was estimated by the use of *nit* mutants, auxotrophic mutants unable to use nitrate as the only nitrogen source. Twenty eight vegetative compatibility groups (VCG) were identified through complementary tests. Out of the 28 VCG's, 10 were multimembers and included 56,6% of the isolates and 18 included just one isolate that were restricted to specific plantings. Considering the distribution of VCG's among the levels studied, a variance analysis was implemented and a diversity

index was estimated. Higher part of variation found (92.05%) was attributed to isolate. There was no difference in diversity for the levels we analyzed. Members of one VCG occurred in the three regions, whereas members of other groups occurred in one or two regions. At in vitro assays, the production of cercosporin was evaluated, and the concentration ranged from 1.71 to 35.327  $\mu\text{Mol/isolate}$ . The percentage of total variance among isolates was 1.9, 7.8, and 48.9% for region, plantings and isolates levels, respectively. No effect of crop system ( $P=0.88$ ) was detected in the variability. Dissimilarity measures were estimated among isolates (Malahanobis index) and the Unweighted pair-group method with arithmetical averages (UPGMA) was performed to determine groups of similar cercosporin production (CPG). Isolates with an low and median levels of production of predominated in the population. Considering the markers used, there are evidences that the studied population has a high variability and the region, crop system and plantings have no effect on the variability.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O café é um dos principais produtos brasileiros de exportação. Em 2006, o país teve uma participação equivalente a 29,8% do total de café exportado no mundo. Além de ser o maior exportador, o país também é o maior produtor mundial (ICO, 2007a; 2007b). No Brasil, Minas Gerais (MG) é o Estado de maior produção: em 2006, 51,72% dos 2,5 bilhões de toneladas de café beneficiado produzidos no Brasil provieram de MG (CONAB, 2007).

Um dos principais problemas fitossanitários do cafeeiro é a mancha-de-olho-pardo ou cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke. Até recentemente a ocorrência da cercosporiose era associada apenas a cafezais mal conduzidos, sob incidência direta do sol e submetidos à condição de estresse nutricional e hídrico (Boldini *et al.*, 2000; Juliatti *et al.*, 2000a; 2000b). Entretanto, de forma semelhante ao constatado em outros países (González *et al.*, 2000; Phiri *et al.*, 2001), profissionais do setor cafeeiro em Minas Gerais têm relatado aumento de intensidade da doença em cafezais sem sinal de estresse, chegando a atribuir a doença importância igual à da ferrugem, principalmente nos cultivos orgânicos (Juliatti *et al.*, 2000a; Peixoto *et al.*, 1998). Por este motivo, a cercosporiose é considerada uma das doenças emergentes na cafeicultura (Barbosa *et al.*, 2001).

Associado ao aumento da intensidade da mancha-de-olho-pardo, há indícios da ocorrência de variabilidade na população de *C. coffeicola* associada aos cafezais. Já se observou variação entre isolados de diferentes regiões de

Minas Gerais quanto a atributos como morfologia de colônias, esporulação *in vitro* e frequência de infecção (Fernandes, 1988; Fernandes, 1989; Soares, 2003). Observações semelhantes também foram feitas na Colômbia (González *et al.*, 2000; Gusmán *et al.*, 2002).

Em vista do aumento de importância da mancha-de-olho-pardo e da escassez de informações sobre a variabilidade de *C. coffeicola*, delineou-se o presente estudo que objetivou caracterizar a população do patógeno associada aos cafezais de Minas Gerais. Compararam-se isolados obtidos de cafezais, sob cultivo orgânico e convencional, de diferentes regiões do Estado, por meio de dois marcadores: compatibilidade vegetativa e produção de cercosporina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, J. C., ISMAEL, M. M. & FELIPPE, J. M. Controle de ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro, no sul de Minas Gerais, em programas com aplicações de fungicidas. Anais, 27º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Uberaba-MG. 2001. pp.325-326.

BOLDINI, J. M., SOUZA, P. E., POZZA, E. A., CHALFOUN, S. M. & FARIA, M. A. Incidência e severidade da cercosporiose em café fertirrigado na região de Lavras-MG. Anais, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG. 2000. pp.273-275.

CONAB. 2º Levantamento de café 2007/2008. Acessado em:23/03/2007. Online: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>. 2007

FERNANDES, A. T. F. Componentes que expressam a intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cook) em progênies de catimor. Dissertação de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 1989.

FERNANDES, C. D. Efeito de fatores do ambiente e da concentração de inóculo sobre a cercosporiose do cafeeiro. Dissertação de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 1988.

GONZÁLEZ, A., FAJARDO, M., LEGUIZAMÓN-CAYCEDO, J., CRISTANCHO-ARDILA, M. A. & CHAVES-CORDOBA, B. Variabilidad morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Cercospora coffeicola*. Cenicafé 51:306-315. 2000.

GUSMÁN, R., GONZALO, H., CAYCEDO, L., EDUARDO, J., HERRERA, R. & MIGUEL, N. Algunos aspectos biológicos de *Cercospora coffeicola*. Cenicafé 53:169-177. 2002.

ICO. Exports by exporting countries to all destinations. Acessado em:25/03/2007. Online: <http://www.ico.org/prices/m1.htm>. 2007a

ICO. Total production of exporting countries. Acessado em:23/05/2007. Online: <http://www.ico.org/prices/po.htm>. 2007b

JULIATTI, F. C., PEIXOTO, A. S., SANTOS, C. M. & TEODORO, R. E. F. Incidência e severidade de *Cercospora* sp. em café irrigado de Araguari-MG. Anais, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG. 2000a. pp.223-225.

JULIATTI, F. C., RAMOS, A. S., MENDONÇA, F. C. & SANTOS, C. M. Incidência e severidade da cercosporiose em lavoura cafeeira conduzida sob diferentes sistemas de irrigação e lâminas d'água. Anais, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG. 2000b. pp.219-222.

PEIXOTO, A. S., JULIATTI, F. C., POZZA, E. A., MOREIRA, J. C., SANTOS, C. M. & TEODORO, R. E. F. Incidência de *Cercospora* sp. em café irrigado de Araguari-MG. Simpósio Brasileiro de Pesquisa em Cafeicultura Irrigada. 1998:95-96. 1998.

PHIRI, N. A., HILLOCKS, R. J. & JEFFRIES, P. Incidence and severity of coffee diseases in smallholder plantations in northern Malawi. *Crop Protection* 20:325-332. 2001.

SOARES, D. J. Esporulação e germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola*. Dissertação de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### A cercosporiose do cafeeiro

Nas últimas décadas, a importância da cercosporiose aumentou. Há relatos de alta intensidade da doença em diferentes sistemas de cultivo, inclusive o orgânico, onde, segundo cafeicultores, é mais severa que a ferrugem (Barbosa *et al.*, 2001). Em vista de diferenças morfológicas entre isolados obtidos de lesões, especula-se até que exista outra espécie de *Cercospora* associada ao aumento de intensidade da doença (Juliatti *et al.*, 2000; Lombardi, 2002).

A doença tem várias denominações: mancha-de-olho-pardo, olho-pardo, mancha-circular, mancha-parda e mancha-olho-de-pombo (Godoy *et al.*, 1997), as quais fazem referência ao aspecto “de olho” das lesões foliares, que são pardo-claras a marrom escuras, circulares, com 0,5 a 1,5 cm de diâmetro, circundadas por anel arroxeado e com centro acinzentado (Chupp, 1953). Em estádios mais avançados, no centro das lesões, podem ocorrer pequenas pontuações escuras que correspondem a estruturas reprodutivas do fungo (Godoy *et al.*, 1997). Nos frutos, ocorrem pequenas manchas castanhas, deprimidas, que se alongam no sentido das extremidades, que tomam aspecto ressecado e escuro. Nestas partes, a polpa seca e a casca adere-se ao pergaminho, dificultando o processo de despulpamento do café (Zambolim *et al.*, 1997).

Apenas uma lesão, principalmente se próxima às nervuras, pode resultar em abscisão foliar (Godoy *et al.*, 1997; Zambolim *et al.*, 1997). A desfolha das plantas resulta em problemas tanto no viveiro, formação de mudas raquíticas, como no campo, redução da produção (Godoy *et al.*, 1997). Há relatos de que

níveis de incidência superior a 10% podem resultar em prejuízo ao produtor (Zambolim *et al.*, 1997; Zambolim *et al.*, 2003). Se os frutos são infectados, as perdas podem ser quantitativas e qualitativas. Neste caso, os frutos infectados têm o processo de maturação acelerado e caem antes da colheita. Outra consequência da infecção de frutos é o aumento da quantidade de grãos chochos (Zambolim *et al.*, 1997).

### **Etiologia e epidemiologia da cercosporiose do cafeeiro**

*Cercospora coffeicola* foi descrito em 1881 (Cooke, 1881), associado a folhas de cafeeiro oriundas da Jamaica, e sua ocorrência no Brasil constatada em 1887 (Godoy *et al.*, 1997). Alguns autores mencionam a existência de fase sexual do patógeno, a qual corresponderia a *Mycosphaerella coffeicola* (Cooke, 1880; Crous & Braun, 2003; Stev & Wellman, 1944). Entretanto, não há trabalhos que confirmem a relação entre as duas espécies. Por essa razão, serão descritas apenas as estruturas morfológicas do estágio mitospórico.

Estruturas reprodutivas, conidióforos e conídios, formam-se no centro das lesões, em ambas as faces das folhas (Zambolim *et al.*, 1997). Os conidióforos são cilíndricos, septados e de coloração pálida a marrom, agrupados em fascículos com 3 a 30 e conformação de esporodóquios (Chupp, 1953). Na extremidade dos conidióforos formam-se conídios hialinos, multisseptados, de extremidade afilada, com 100-270 µm de comprimento e 3-4 µm de diâmetro (Chupp, 1953; Godoy *et al.*, 1997). Em meio de cultura, a cor do micélio depende da condição de luminosidade: no escuro, as colônias variam de preto-esverdeado, no início do desenvolvimento, a branco-leitoso a pardo no final; na presença de luz pode haver produção do pigmento cercosporina, de cor vermelha, e, conseqüentemente, a cor do micélio varia de vermelho claro a intenso, o que depende da capacidade de o isolado em produzir o pigmento. Mesmo a breve exposição à luz pode estimular a produção do pigmento (Daub *et al.*, 2005; Gusmán *et al.*, 2002).

Condições favoráveis à doença são umidade relativa alta e temperatura entre 10 e 25°C. Umidade relativa alta e temperatura amena favorecem a esporulação, que ocorre comumente à noite ou em dias nublados e frios

(Zambolim *et al.*, 1997). Os conídios são dispersos pelo vento, água e insetos. Uma vez depositados nas folhas e na presença de umidade suficiente, o conídio emite tubo germinativo que penetra diretamente através da cutícula ou por aberturas naturais. Comumente mais de um tubo germinativo é emitido por conídio. O período de incubação, de 9 a 15 dias, varia em função da temperatura (Zambolim *et al.*, 1997). Sementes também podem ser infectadas e transmitir o patógeno (Godoy *et al.*, 1997).

### **Mudanças ocorridas no sistema de cultivo dos cafezais**

Nas três últimas décadas a cafeicultura nacional passou por várias mudanças. Parte dessas mudanças foi impulsionada por pesquisas relacionadas ao cultivo de café que reavaliaram padrões climáticos, geográficos, edáficos e, principalmente, levaram ao desenvolvimento e adoção de cultivares mais produtivas, rústicas e/ou compactas (Lima *et al.*, 2003; Marciano Da Costa *et al.*, 2003). Como resultado do conhecimento gerado, houve expansão das lavouras para regiões antes consideradas impróprias à cafeicultura, como as áreas de cerrado de São Paulo, Minas Gerais e Bahia (Fazuoli *et al.*, 2002). Também houve mudança com a implantação de cultivares de menor porte e de maior rusticidade, como Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo, o que possibilitou o uso de novas tecnologias que aumentaram a produtividade.

Em paralelo às mudanças descritas, também se alteraram os problemas fitossanitários da cafeicultura. Doenças e pragas, antes não problemáticas, hoje são limitantes à cultura (Zambolim *et al.*, 2003). Fundamentando-se nas mudanças ocorridas na cafeicultura, há algumas hipóteses para explicar tais limitações: i- cultivo adensado associado à baixa fertilidade dos solos nas novas regiões pode submeter as plantas a situações de estresse nutricional em vista da situação limite de produção e possível aumento da suscetibilidade a doenças (Juliatti, 2001); ii- mudanças de microclima no interior dos plantios, principalmente devido a adoção de cultivos adensados, que propiciam o aumento do tempo de água livre, condição favorável a muitos patógenos (Zambolim *et al.*, 2003); iii- baixa resistência das cultivares a doenças emergentes. A esse respeito, cabe ressaltar que até recentemente no melhoramento da cultura, buscava-se

apenas a resistência à ferrugem e se dispensava pouca atenção as demais doenças (Godoy *et al.*, 1997; Zambolim *et al.*, 1997); e iv- o surgimento de variantes dos patógenos mais adaptados às alterações descritas. Considerando-se o triângulo de doenças, houve alterações nos vértices hospedeiro e ambiente, as quais, aparentemente, levaram à alterações no vértice patógeno.

### **Variabilidade de isolados de *Cercospora coffeicola***

Associados ao aumento da intensidade da cercosporiose, há indícios de ocorrer variabilidade na população de *C. coffeicola*. Já se observaram variações quanto à cor de colônias, sensibilidade a fungicidas, morfologia de conídios, esporulação *in vitro* e frequência de infecção em isolados de diferentes regiões de Minas Gerais (Fernandes, 1989; Fernandes, 1988; Lombardi, 2002; Soares, 2003). Variações semelhantes também foram observadas em isolados colombianos do patógeno (González *et al.*, 2000; Gusmán *et al.*, 2002). Como todas as variações relatadas foram observadas em condições controladas, assume-se que as mesmas sejam de origem genética. No entanto, não há estimativas da amplitude nem da distribuição da variabilidade na população do patógeno.

Discutir-se-ão mecanismos que podem condicionar variabilidade em populações de *C. coffeicola*.

### **Mecanismos geradores de variabilidade entre indivíduos**

**Mutação.** Corresponde a mudanças na seqüência de nucleotídeos que compõem o genoma dos indivíduos. Estas alterações podem ocorrer, por exemplo, por falha na atividade de enzimas responsáveis pela replicação do genoma (Futuyma, 1992). A extensão com que a mutação altera o genoma e as conseqüências ao fenótipo do indivíduo portador são variáveis. Por exemplo, em *Pseudoperonospora cubensis* e *Podospaera fusca*, correlacionou-se mutação pontual à ocorrência de resistência a fungicida (Fraaije *et al.*, 2002); mutantes de *C. kikuchii*, deficientes na produção de cercosporina, tornaram-se menos agressivos (Daub & Ehrenshaft, 2000).

**Recombinação.** Refere-se ao rearranjo de seqüências do genoma ao acaso. Pode ocorrer pela combinação independente de cromossomos e/ou recombinação entre e dentro dos cromossomos, evento denominado de *crossing over* (Milgroom, 1996). A combinação independente de cromossomos assim como os eventos de *crossing over* podem ocorrer durante a meiose, na reprodução sexual, ou mitose, na reprodução assexual. Independente da forma de com que ocorra, a recombinação é importante por misturar a variabilidade gerada pela mutação e gerar indivíduos com novos genótipos, recombinantes. Normalmente, é dada maior ênfase a recombinação meiótica, devido a amplitude com que ocorre rearranjo entre e dentro de cromossomos. Entretanto, eventos de recombinação mitótica também são importantes na geração de variabilidade, principalmente em populações fúngicas sem reprodução sexual (Burdon & Silk, 1997). Conforme já abordado, existem referências a uma possível fase sexual de *C. coffeicola*, a qual corresponderia a *M. coffeicola*; entretanto, não há comprovação da relação entre as duas espécies (Cooke, 1880; Crous & Braun, 2003; Stev & Wellman, 1944). Assim, assume-se que as estruturas propagativas do patógeno originem-se por mitose. Nesse caso, um importante mecanismo de recombinação que pode ocorrer é o **ciclo parassexual** (Alexopoulos *et al.*, 1996). O ciclo parassexual pode iniciar após anastomose de hifas de dois indivíduos geneticamente semelhantes. A partir do ponto de contato, se os indivíduos forem compatíveis, ocorre o desenvolvimento de hifa heterocariótica, contendo os genomas de ambos os indivíduos parentais. Com o crescimento da hifa, ocorrerá haploidização, perda de cromossomos homólogos, e a hifa resultante poderá ter um genoma "híbrido", com cromossomos de ambos os indivíduos parentais. Ainda durante o processo de haploidização, podem ocorrer eventos de *crossing over* e o conjunto de alelos da hifa resultante será diferente do dos indivíduos parentais. Assim, um indivíduo com novo genótipo surge na população (Teunissen *et al.*, 2002).

### **Mecanismos geradores de variabilidade entre populações**

A ocorrência dos mecanismos geradores de variabilidade acontece de forma aleatória entre os indivíduos da população. No entanto, a fixação dos

"novos" genótipos nas gerações seguintes da população dependerá de outros mecanismos, mais abrangentes, geradores de variabilidade que atuam sobre populações, os quais são denominados de mecanismos evolutivos (McDonald & McDermott, 1993).

**Evolução.** Antes de discutir os mecanismos evolutivos, faz-se necessária a definição do que é evolução. Populações evoluem, indivíduos não. Biologicamente, evoluir é sinônimo de mudar. Após "receber" seu genoma, no momento da concepção, o indivíduo não sofrerá mudanças bruscas do conjunto gênico herdado durante sua existência e constituirá um dos genótipos da população da qual faz parte. Portanto, ele não evoluirá. Em contrapartida, populações são formadas por indivíduos que se renovam em períodos cíclicos, em que cada ciclo compreende uma geração. O número de genótipos diferentes e sua distribuição na população podem ou não permanecer estáveis ao longo das gerações. A mudança na composição de indivíduos ao longo das gerações determinará a evolução da população. Aprofundando a idéia apresentada, passando da composição genotípica para composição gênica de uma população, pode-se definir evolução como: mudança no conjunto de genes (alelos) e das características por eles condicionadas em uma população de organismos ao longo do tempo (Futuyma, 1992; Mayr, 2001).

**Mecanismos evolutivos.** Os mecanismos de geração de variabilidade (mutação e reprodução parassexual) criam os genótipos de uma população. A variabilidade genética (riqueza e distribuição) dentro e entre populações, denominada estrutura genética da população, é condicionada pelos seguintes mecanismos evolutivos: deriva genética, migração (fluxo gênico) e seleção (McDonald & McDermott, 1993), descritos a seguir.

**Deriva genética.** Compreende mudanças, ao acaso, na frequência de alelos em uma população. Pode ocorrer sem a ação de qualquer força de seleção: embora todos os indivíduos tenham a mesma chance de repassar seus alelos à geração seguinte, isso não acontece devido a eventos denominados como **erro de**

**amostragem, efeito fundador e efeito gargalo** (McDonald & McDermott, 1993).

No **erro de amostragem**, os indivíduos que se reproduzem e passam seus alelos à geração seguinte não são representativos da população. Considere-se uma população de plantas, infectada por uma população de um fitopatógeno, a qual é constituída de indivíduos com genótipos que diferem em um loco, para o qual existem três alelos (A, B e C) em igual frequência na população. Esse loco não proporciona qualquer vantagem adaptativa aos indivíduos, os quais realizam o ciclo de vida de maneira igual. Ao se reproduzirem, todos os indivíduos geram o mesmo número de esporos, com igual chance de constituir a geração seguinte. Ao serem dispersos, por acaso, mais esporos de indivíduos com o alelo "A" depositam-se sobre plantas hospedeiras. Consequentemente, a geração seguinte terá mais indivíduos com o alelo "A". Se o fato voltar a ocorrer nas gerações seguintes, o alelo "A" tornar-se-á predominante, o "B" e/ou o "C" terão sua frequência reduzida e poderão ser extintos da população em algumas gerações se o mesmo evento voltar a ocorrer.

O **efeito fundador** ocorre quando um grupo de indivíduos (com frequências alélicas não representativas da população original) cria uma nova colônia. Considere-se a mesma população descrita anteriormente. Em um evento de migração, um grupo formado por indivíduos com os alelos "A" e "C" fundam uma nova colônia, uma sub-população, em outra lavoura de plantas suscetíveis. A população de fitopatógenos passa a ser formada pelas sub-populações associadas às duas lavouras. Com o suceder de gerações, na população do fitopatógeno, agora constituída pela sub-população original mais a sub-população criada no novo campo, haverá predominância dos alelos "A" e "C".

O **efeito gargalo** é outro caso de deriva provocado por erro de amostragem. Nesse efeito, durante dado período, há redução significativa da população do fitopatógeno e o conjunto de indivíduos sobreviventes não é representativo da variabilidade genética da população original. Voltando ao exemplo inicial, considere-se ter havido uma queimada na lavoura e que 50% das plantas e, conseqüentemente, 50% da população do patógeno foram mortas. Caso a maioria dos indivíduos associados às plantas eliminadas fossem portadores do

alelo "A", esse teria sua freqüência diminuída na população do fungo.

Conclui-se que os mecanismos de deriva genética atuam de forma aleatória na distribuição e preservação de alelos em uma população.

**Migração.** A migração caracteriza-se pela movimentação de indivíduos entre populações e sub-populações. Como já discutido, as populações estão sujeitas à ocorrência de deriva genética e o resultado na freqüência alélica é aleatório. Caso o evento de migração seja estocástico e as sub-populações permaneçam isoladas, sem troca de indivíduos (fluxo gênico), a freqüência de alelos pode divergir de forma independente, o que resulta em freqüências alélicas distintas entre sub-populações. A recíproca é verdadeira: maiores eventos de migração entre sub-populações diminuem diferenças na freqüência alélica. Estimativas de eventos de migração entre populações podem indicar, por exemplo, a velocidade com que um novo genótipo mais virulento ou resistente a determinadas práticas de manejo pode ser disperso entre áreas (Boeger *et al.*, 1993).

**Seleção.** É o mecanismo mais conhecido e se caracteriza pela taxa diferencial de sobrevivência de indivíduos entre gerações. Como na deriva genética e migração, a seleção atua na freqüência de alelos entre gerações. Mas, ao contrário destes, não gera variabilidade, seleciona genótipos que contenham um conjunto de alelos que confira vantagens adaptativas aos seus portadores sob determinadas condições restritivas. Para a seleção ocorrer, é necessário haver variabilidade de caráter fenotípico vantajoso, o qual seja condicionado pelos alelos. Quanto mais alelos vantajosos possuir um indivíduo para determinada situação ambiental, maior será sua capacidade de sobreviver e produzir descendentes para a geração seguinte. Assim, indivíduos portadores de alelos favoráveis tenderão a aumentar na população durante a sucessão de gerações e enquanto a situação ambiental restritiva persistir. A situação descrita caracteriza o conceito de adaptabilidade (“*fitness*”), em que um indivíduo é capaz de deixar mais descendentes para geração seguinte.

É intuitivo pensar que alelos condicionadores de vantagens adaptativas tendem a ter freqüência dominante em uma população, mas esse raciocínio não é

de todo correto. Tudo dependerá das conseqüências das mudanças a outras características não selecionadas pelo fator restritivo, mas importantes ao desenvolvimento do patógeno. Essa idéia pode ser mais bem compreendida ao se considerar, por exemplo, indivíduos portadores de resistência a fungicidas. Isolados de *C. beticola*, resistentes a fungicidas inibidores da demetilação, quando inoculados em conjunto com isolados sensíveis, não foram capazes de competir na ausência do fator de seleção, aplicação de fungicida (Karaoglanidis *et al.*, 2001). Ou seja, a aquisição de resistência ao fungicida ocasionou também redução em outras características importantes ao ciclo de vida dos isolados resistentes. Por outro lado, em isolados de *Pyrenophora teres*, resistentes ao mesmo grupo de fungicida, não se detectou qualquer redução na adaptabilidade quando estes foram comparados a isolados sensíveis (Peever & Milgroom, 1994).

### **Estrutura genética de populações**

Quantificando-se a variabilidade gênica e genotípica e a distribuição espacial da variabilidade, determina-se a estrutura genética de uma população e pode-se estimar o seu potencial evolutivo (McDonald & McDermott, 1993). Quanto maior a variabilidade genética de uma população, maior seu potencial evolutivo e, conseqüentemente, maior a probabilidade de ela se adaptar a novas condições ambientais (McDonald, 1997). Isto é, quanto maior a variabilidade, maior é a chance de existir um indivíduo que seja adaptado à determinada condição restritiva que incida sobre a população.

Para estimar a estrutura genética de populações de fungos fitopatogênicos há vários marcadores, os quais podem ser morfológicos ou moleculares. Os morfológicos são caracteres observáveis em cultivos *in vitro* ou durante a patogênese (Browning *et al.*, 1999; Pryor & Michailides, 2002). No cultivo *in vitro*, podem se analisar a textura e coloração de colônias, variação nas dimensões de conidióforos e conídios, produção de determinados compostos, taxa de crescimento, reações de compatibilidade vegetativa de isolados, etc. (Correll *et al.*, 1987; González *et al.*, 2000; Gusmán *et al.*, 2002; Inglis *et al.*, 2001; Nauta & Hoekstra, 1996). Durante a patogênese, podem se quantificar variações condicionadoras de adaptabilidade como virulência, agressividade, frequência de

infecção, período de incubação, produção de esporos, etc. (Karaoglanidis *et al.*, 2001; Peever & Milgroom, 1994). Os marcadores moleculares incluem diferenças ao nível de DNA (Kurumae-Izioka *et al.*, 1997; Pryor & Michailides, 2002).

Os marcadores também podem ser seletivos ou neutros. Os marcadores seletivos incluem caracteres que condicionam vantagem(ns) ou desvantagem(ns) adaptativa(s). No caso de conferir vantagem sob dada circunstância ambiental restritiva, o caráter pode ser mais freqüente na população, em vista da pressão de seleção. Como exemplo, tem-se a resistência a fungicida, comum em populações de fungos fitopatogênicos expostas constantemente a este produto (Lamondia & Douglas, 1997). Os marcadores neutros são caracteres que não interferem na adaptabilidade e não habilitam os indivíduos portadores a deixar mais descendentes. Pode-se estimar a variabilidade quanto a estes marcadores pelo emprego de marcadores moleculares, como AFLP e RAPD, ou outras características, como compatibilidade vegetativa. Assume-se que estes marcadores não estão sob pressão de seleção e, em vista da ação dos mecanismos geradores de variabilidade, pode haver variações entre indivíduos de uma mesma população (Almeida *et al.*, 2003; McDonald, 1997; Santini & Capretti, 2000).

O nível de discriminação depende do marcador utilizado e, em geral, os morfológicos discriminam menos que os moleculares (Kohn, 1992; McDonald & McDermott, 1993). Os morfológicos, apesar de condicionados pelo genótipo do indivíduo, sofrem efeito do ambiente. Por exemplo, indivíduos geneticamente diferentes podem não diferir na taxa de crescimento *in vitro* (Suassuna, 2005). O nível de diferenciação varia com o marcador usado. Por exemplo, testes baseados na comparação de proteínas podem ser menos específicos, pois indivíduos diferentes, mas geneticamente relacionados, podem produzir o mesmo conjunto de proteínas. Em geral, os marcadores que comparam ao nível de DNA são mais específicos (Kohn, 1992; McDonald & McDermott, 1993). Em todo o caso, é senso comum que quanto maior o número de marcadores usados, maior a chance de se estimar confiavelmente a estrutura genética de populações (Kohn, 1992; McDonald & McDermott, 1993).

A estrutura genética de uma população é constituída pela variabilidade genética e sua distribuição espacial (Grünwald *et al.*, 2003). A variabilidade

genética inclui a variabilidade gênica e a genotípica (Milgroom & Peever, 2003). Quantifica-se a variabilidade gênica pela frequência de alelos por loco: quanto maior o número de alelos variáveis por loco, maior a variabilidade gênica. A variabilidade genotípica está um nível acima da gênica, pois considera o conjunto de locos (genótipos) dos indivíduos sob análise: quanto maior o número de indivíduos genotipicamente distintos, maior a variabilidade. Em estudos populacionais, pode-se estimar a variabilidade genética seguindo níveis estratificados, hierarquicamente organizados. Ou seja, ela pode ser obtida para a população total, para subpopulações (subgrupos dentro da população total) e para indivíduos dentro das subpopulações. Com esse tipo de abordagem, pode-se inferir sobre diferenças e/ou semelhanças entre subpopulações e entre indivíduos dentro das subpopulações (Nei, 1973; Shannon & Weaver, 1949; Stoddart & Taylor, 1988; Weir & Hill, 2002).

A caracterização da estrutura genética de um fitopatógeno pode auxiliar na implementação de medidas de controle mais eficazes. Pode-se usar o conhecimento gerado para identificar fontes de inóculo, avaliar o papel de práticas culturais na dispersão do patógeno, selecionar patótipos representativos da população no campo para uso no desenvolvimento de cultivares resistentes, entre outros (Andrade *et al.*, 2000; Cortesi *et al.*, 2000; Zwankhuizen *et al.*, 1998).

### **Estrutura genética da população de *Cercospora coffeicola* em Minas Gerais**

Já se evidenciou haver variabilidade de isolados de *C. coffeicola* (Fernandes, 1989; Fernandes, 1988; Soares, 2003). No único trabalho em que se buscou caracterizar a variabilidade genética de *C. coffeicola* em Minas Gerais e São Paulo, não se usaram isolados representativos da população estabelecida nas lavouras (Lombardi, 2002). Conhecendo-se a variabilidade genética do patógeno e sua distribuição espacial, poder-se-ão estimar processos geradores de variabilidade na população, o que fornecerá subsídios para prever a durabilidade de medidas de controle como fungicidas e variedades resistentes. Para se atingir esse nível de compreensão, demanda-se determinar inicialmente o quanto de variabilidade genética existe na população e como ela se distribui espacialmente

dentro e entre populações, especialmente entre lavouras sob diferentes sistemas de produção (McDonald, 1997).

Os marcadores usados para caracterizar a estrutura genética diferem quanto ao nível de discriminação (McDonald & McDermott, Kohn, 1992; McDonald & McDermott, 1993). Enfatizar-se-ão dois marcadores morfológicos, um de caráter neutro (compatibilidade vegetativa) e um de caráter seletivo (produção de cercosporina).

### **Caracterização de grupos de compatibilidade vegetativa**

Compatibilidade vegetativa é uma característica multigênica que tem sido utilizada para avaliar a estrutura populacional de fungos fitopatogênicos (Correll *et al.*, 1987; Liu & Sundheim, 1996; Nitzan *et al.*, 2002; Pildain *et al.*, 2004). É uma habilidade geneticamente controlada de isolados fúngicos, de uma mesma espécie, que permite a formação de heterocárions viáveis pela fusão de hifas entre eles se os mesmos forem compatíveis vegetativamente (Glass *et al.*, 2000; Nauta & Hoekstra, 1996). Neste caso, isolados compatíveis entre si são classificados como pertencentes ao mesmo Grupo de Compatibilidade Vegetativa (GCV) e são, em geral, geneticamente similares. Por exemplo, a separação em *formae speciales* e o tamanho de colônia em *Fusarium oxysporum*, dentre outros caracteres, já foram correlacionados a GCV (Correll *et al.*, 1987; Puhalla, 1985). Quanto maior o número de GCV, maior a variabilidade (Leslie, 1993).

A compatibilidade vegetativa é tida como marcador neutro e a identificação de GCV's pode ser feita visualmente de forma indireta e direta. De forma indireta, a compatibilidade vegetativa é presumida pela formação de barreira, zona sem crescimento de hifas, entre colônias de isolados cultivados em conjunto. A observação direta da compatibilidade vegetativa é feita pelo estabelecimento de um heterocáron prototrófico em condição de cultivo em que nenhum dos dois componentes auxotróficos sobreviva (Leslie, 1993). Em outras palavras, dois indivíduos não crescem em dado meio de cultura se cultivados isoladamente, mas são capazes de se desenvolver se cultivados em conjunto, em condição de heterocariose. Preferem-se marcadores auxotróficos, quando possível, porque se pode distinguir visualmente o heterocáron de seus

componentes auxotróficos (Jacobson & Gordon, 1988; Leslie, 1993). Dentre os marcadores auxotróficos, emprega-se a não utilização de nitrato como fonte de nitrogênio (mutantes *nit*) para caracterizar GCV em fungos fitopatogênicos (Brooker *et al.*, 1991; Correll *et al.*, 1987; Korolev *et al.*, 2000). A técnica, desenvolvida inicialmente para *Aspergillus nidulans* (Cove, 1976), foi adaptada para *Fusarium oxysporum* (Correll *et al.*, 1987) e posteriormente aplicada a outros fungos fitopatogênicos (Brooker *et al.*, 1991; Korolev *et al.*, 2000). E, recentemente, o seu uso foi descrito para *C. kikuchii* e *C. beticola* (Cai & Schneider, 2005; Moretti *et al.*, 2006).

A técnica baseia-se no fato de que o crescimento de muitos fungos é restrito em meio de cultura contendo clorato de potássio (KClO<sub>3</sub>). Isso ocorre porque enzimas produzidas para absorver nitrogênio reduzem o KClO<sub>3</sub> a cloreto de potássio (KClO<sub>2</sub>), o qual é altamente tóxico, (Correll *et al.*, 1987; Várzea *et al.*, 2002). Meios com KClO<sub>3</sub> exercem seleção nos organismos, pois permitem que se desenvolvam apenas setores insensíveis ou resistentes a KClO<sub>3</sub>. Em geral, esses setores são resistentes ao KClO<sub>3</sub> porque não o reduzem a KClO<sub>2</sub>, em vista da perda de atividade da nitrato redutase (Liu & Sundheim, 1996). Assim, os mutantes resistentes a KClO<sub>3</sub> também são deficientes em absorver nitrogênio. As mutações que levam à perda da atividade da nitrato redutase podem ocorrer em locos diferentes. Mutantes *nit*, com mutações em locos distintos, quando pareados em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio, podem formar um heterocáion no ponto de contato, com crescimento prototrófico, se forem compatíveis vegetativamente, isto é, se pertencerem ao mesmo GCV. A vantagem deste método é que a confirmação da compatibilidade vegetativa é feita de forma direta, pela expressão de crescimento prototrófico. Este só ocorre se houver formação de hifa heterocariótica viável entre os indivíduos auxotróficos (Correll *et al.*, 1987)

### **Produção de cercosporina**

A adaptabilidade é conceito relativo, em que se classificam os indivíduos segundo sua contribuição para a população na geração seguinte. O conceito é relativo porque um indivíduo só pode ser classificado como mais ou menos

adaptado quando comparado a outro indivíduo. Indivíduos mais adaptados deixam mais descendentes. A produção de cercosporina foi escolhida como marcador seletivo, que condiciona maior adaptabilidade, porque em *Cercospora* spp. já se comprovou seu envolvimento e contribuição para que esses fungos completem seu ciclo de vida (Daub & Chung, 2007; Daub & Ehrenshaft, 2000; Daub *et al.*, 2005).

A cercosporina é incluída no grupo químico das *perylenequinonas*, o qual inclui compostos sintéticos e naturais de moléculas fotossensibilizadoras (Daub & Ehrenshaft, 2000). A principal característica do grupo é a capacidade de absorver energia luminosa. Na presença de luz, a cercosporina torna-se excitada e capaz de reagir com outras moléculas. O principal alvo de reação é o oxigênio. Esse, ao reagir com a cercosporina, é convertido em espécies de oxigênio reativo, altamente tóxicas por poderem interagir e danificar macromoléculas como DNA e proteínas (Daub, 1982b; Daub & Briggs, 1983). Geralmente, apenas organismos produtores dessas toxinas resistem a seus efeitos. Células de vários organismos não produtores (plantas, fungos, bactérias e animais) são sensíveis à cercosporina (Batchvarova *et al.*, 1992; Daub, 1982a; , 1987; Daub & Ehrenshaft, 2000).

A cercosporina foi isolada em 1956, a partir de micélio de culturas de *C. kikuchii* (Kuyama & Tamura, 1956a; 1956b), e suas propriedades fotodinâmicas e tóxicas foram descritas quase duas décadas após (Yamazaki *et al.*, 1975). Posteriormente, confirmou-se a importância da incidência de luz na produção da toxina e desencadeamento do seu efeito (Batchvarova *et al.*, 1992; Daub, 1982b) e detectou-se correlação positiva de intensidade luminosa e atividade da toxina a células vegetais (Daub, 1982b). Pode-se detectar a cercosporina em extratos de cultivos *in vitro* de *Cercospora* spp. (Daub & Ehrenshaft, 2000) ou a partir de tecidos lesionados de plantas infectadas (Robeson & Jalal, 1993). O papel da toxina na patogênese é bem conhecido (Balis & Payne, 1971; Daub & Chung, 2007; Daub & Ehrenshaft, 2000; Daub *et al.*, 2005). Ela funciona como fator de agressividade do patógeno (Steinkamp *et al.*, 1981). Isolados mutantes de *C. kikuchii* (com produção de cercosporina inferior a 2% do normal) infectaram plantas, mas foram menos agressivos que isolados não mutados, com produção normal de cercosporina (Daub & Ehrenshaft, 2000).

A intensidade luminosa correlaciona-se à atividade e produção da toxina (Batchvarova *et al.*, 1992; Daub, 1982a; 1982b; Lynch & Geoghegan, 1979). Há conexão entre exposição à luz e desenvolvimento de manchas necróticas e de queima típicas de cercosporioses, e, por essa razão, não é coincidência o fato de que, em geral, as cercosporioses sejam mais severas em plantas expostas ao sol. Em cafeeiro, evidenciou-se a importância da luminosidade na ocorrência e desenvolvimento da doença em 1959, antes mesmo da descoberta da toxina (Echandi, 1959; Gusmán *et al.*, 2002; Kuyama & Tamura, 1956a; 1956b; Yamazaki *et al.*, 1975). Fato semelhante também ocorre com cercosporiose em beterraba e bananeira (Calpouzos & Stallknecht, 1967; Daub & Ehrenshaft, 2000). Como constatado com *C. beticola* em beterraba e *C. coffeicola* em cafeeiro, a toxina não afeta a penetração e infecção, mas influencia o desenvolvimento do patógeno a partir da infecção (Calpouzos & Stallknecht, 1967; Daub & Chung, 2007; Daub & Ehrenshaft, 2000; Daub *et al.*, 2005; Echandi, 1959).

A produção de cercosporina *in vitro* varia entre espécies e entre isolados de uma espécie (Fajola, 1978; Jenns *et al.*, 1989). Nas espécies em que se detectou a toxina *in vitro*, houve relação entre a quantidade detectada e a agressividade nas respectivas plantas hospedeiras (Fajola, 1978). Para *C. kikuchii*, por exemplo, houve correlação de 83% entre a concentração detectada *in vitro* e a severidade em plantas de soja inoculadas com isolados do patógeno (Almeida *et al.*, 2005).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. Introductory Mycology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1996.

ALMEIDA, A. M. R., ABDELNOOR, R. V., ARIAS, C. A. A., CARVALHO, V. P., JACOUD FILHO, D. S., MARIN, S. R. R., BENATO, L. C., PINTO, M. C. & CARVALHO, C. G. P. Genotypic diversity Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. Fitopatologia Brasileira 28:279-285. 2003.

ALMEIDA, A. M. R., PIUGA, F. F., MARIN, S. R. R., BINNECK, E., SARTORI, F., COSTAMILAN, L. M., TEIXEIRA, M. R. O. & LOPES, M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. Fitopatologia Brasileira 30:594-602. 2005.

ANDRADE, D. E. T., MARTINS, R. B. & MICHEREFF, S. J. Avaliação de cultivares de tomateiro para resistência à raça 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Summa Phytopathologica 26:416-421. 2000.

BALIS, C. & PAYNE, M. G. Triblycirides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production. Phytopathology 61:1477-1484. 1971.

BARBOSA, J. C., ISMAEL, M. M. & FELIPPE, J. M. Controle de ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro, no sul de Minas Gerais, em programas com aplicações de fungicidas. Anais, 27<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Uberaba-MG. 2001. pp.325-326.

BATCHVAROVA, R. B., REDDY, V. S. & BENNETT, J. Cellular resistance in rice to cercosporin, a toxin of *Cercospora*. Phytopathology 82:642-646. 1992.

BOEGER, J. M., CHEN, R. S. & MCDONALD, B. A. Gene flow between geographic populations of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) detected with restriction fragment length polymorphism markers. Phytopathology 83:1148-1154. 1993.

BROOKER, N. L., LESLIE, J. F. & DICKMAN, M. B. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. Phytopathology 81:672-677. 1991.

BROWNING, M., ROWLEY, L. R., ZENG, P., CHANDLEE, J. M. & JACKSON, N. Morphological, pathogenic, and genetic comparisons of *Colletotrichum graminicola* isolates from poaceae. Plant Disease 83:286-292. 1999.

BURDON, J. J. & SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. Phytopathology 87:664-669. 1997.

- CAI, G. & SCHNEIDER, R. W. Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain in soybean. *Phytopathology* 95:257-261. 2005.
- CALPOUZOS, L. & STALLKNECHT, G. F. Symptoms of cercospora leaf spot of sugar beets influenced by light intensity. *Phytopathology* 57:799-780. 1967.
- CHUPP, C. A. Monograph of the Fungus Genus *Cercospora*. Ithaca, NY.: Publicado pelo autor. 1953.
- COOKE, M. C. *Sphaerella coffeicola*. *Grevillea* 9:11. 1880.
- COOKE, M. C. *Cercospora coffeicola*. *Grevillea* 9:99. 1881.
- CORRELL, J. C., KLITTICH, C. J. R. & LESLIE, J. F. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646. 1987.
- CORTESI, P., FISCHER, M. & MILGROOM, M. G. Identification and spread of *Formitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca. *Phytopathology* 90:967-972. 2000.
- COVE, D. J. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics* 146:147-159. 1976.
- CROUS, P. W. & BRAUN, U. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passarola*. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2003.
- DAUB, M. E. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology* 72:370-374. 1982a.
- DAUB, M. E. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. *Plant Physiology* 69:1361-1364. 1982b.
- DAUB, M. E. Resistance of fungi to the photosensitizing toxin, cercosporin. *Phytopathology* 77:1515-1520. 1987.
- DAUB, M. E. & BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by cercosporin. *Plant Physiology* 71:763-766. 1983.
- DAUB, M. E. & CHUNG, K. R. Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. Acessado em:12/03/2007. Online: <http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin/>. 2007

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

DAUB, M. E., HERRERO, S. & CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. FEMS Microbiology Letter 252:197-206. 2005.

ECHANDI, E. La chasparria de los cafetos causada por el hongo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. Turrialba 9:54-67. 1959.

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

FAZUOLI, L. C., MEDINA FILHO, H. P., GONÇALVES, W., GUERREIRO FILHO, O. & SILVAROLLA, M. B. Melhoramento do Cafeeiro: Variedades Tipo Arábica Obtidas no Instituto Agrônômico de Campinas. In: Zambolim, L. (Ed.). Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café. Viçosa. 2002. pp.163-212

FERNANDES, A. T. F. Componentes que expressam a intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cook) em progênies de catimor. Dissertação de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 1989.

FERNANDES, C. D. Efeito de fatores do ambiente e da concentração de inóculo sobre a cercosporiose do cafeeiro. Dissertação de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 1988.

FRAAIJE, B. A., BUTTERS, J. A., COELHO, J. M., JONES, D. R. & HOLLONDON, D. W. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. Plant Pathology 51:45-51. 2002.

FUTUYMA, D. J. Biologia Evolutiva. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1992.

GLASS, N. L., JACOBSON, D. J. & SHIU, P. K. T. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete fungi. Annual Review of Genetics 34:165-186. 2000.

GODOY, C. V., BERGAMIN FILHO, A. & SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. (Eds.). Manual de Fitopatologia. Vol.2. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo-SP. Ceres. 1997. pp.184-200

GONZÁLEZ, A., FAJARDO, M., LEGUIZAMÓN-CAYCEDO, J., CRISTANCHO-ARDILA, M. A. & CHAVES-CORDOBA, B. Variabilidad

morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Cercospora coffeicola*. *Cenicafé* 51:306-315. 2000.

GRÜNWALD, N. J., GOODWIN, S. B., MILGROOM, M. G. & FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:738-746. 2003.

GUSMÁN, R., GONZALO, H., CAYCEDO, L., EDUARDO, J., HERRERA, R. & MIGUEL, N. Algunos aspectos biológicos de *Cercospora coffeicola*. *Cenicafé* 53:169-177. 2002.

INGLIS, P. W., TEIXEIRA, E. A., RIBEIRO, D. M., VALADARES-INGLIS, C. & TIGANO, M. S. Molecular markers for the characterization of Brazilian *Cercospora caricis* isolates. *Current Microbiology* 42:194-198. 2001.

JACOBSON, D. J. & GORDON, T. R. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 78:668-672. 1988.

JENNS, A. E., DAUB, M. E. & UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79:213-219. 1989.

JULIATTI, F. C. Avaliação da incidência e severidade da ferrugem e da cercosporiose e produtividade da lavoura cafeeira no cerrado, conduzida sob diferentes sistemas de irrigação e lâminas d'água'. Anais, II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Vitória-ES. 2001. pp.1050-1056.

JULIATTI, F. C., PEIXOTO, A. S., SANTOS, C. M. & TEODORO, R. E. F. Incidência e severidade de *Cercospora* sp. em café irrigado de Araguari-MG. Anais, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG. 2000. pp.223-225.

KARAOGLANIDIS, G. S., THANASSOULOPOULOS, C. C. & LOANNIDIS, P. M. Fitness of *Cercospora beticola* field isolates - resistant and - sensitive to demethylation inhibitor fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 107:337-347. 2001.

KOHN, L. M. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* 84:139-153. 1992.

KOROLEV, N., KATAN, J. & KAYAN, T. Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology* 90:529-536. 2000.

KURUMAE-IZIOKA, E. E., LOPES, C. R., SOUZA, N. L. & MACHADO, M. A. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from

citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 103:323-329. 1997.

KUYAMA, S. & TAMURA, T. Cercosporin. A pigment of *Cercospora kikuchii*. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. *Journal of the American Chemical Society* 79:5725-5726. 1956a.

KUYAMA, S. & TAMURA, T. Cercosporin. A pigment of *Cercospora kikuchii*. II. Physical and chemical properties of cercosporin and its derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 79:5726-5729. 1956b.

LAMONDIA, J. A. & DOUGLAS, S. M. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut greenhouses to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease* 81:729-732. 1997.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31:127-150. 1993.

LIMA, P. C., MOURA, W. M. & LISBOA, J. M. M. Avanços Tecnológicos para a Produção Orgânica de Café. In: Zambolim, L. (Ed.). *Produção Integrada de Café*. Viçosa. 2003. pp.319-366

LIU, W. & SUNDHEIM, L. Nitrate nonutilizing mutants and vegetative compatibility groups in *Fusarium poae*. *Fungal Genetics and Biology* 20:12-17. 1996.

LOMBARDI, A. P. Z. Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola*. Dissertação de Mestrado. Botucatu-SP. Universidade Estadual Paulista. 2002.

LYNCH, F. J. & GEOGHEGAN, M. J. Regulation of growth and cercosporin photoinduction in *Cercospora beticola*. *Transactions of the British Mycological Society* 73:311-327. 1979.

MARCIANO DA COSTA, L., OLSZEWSKI, N. & MÔNACO, P. A. L. Manejo e conservação de solos para a cultura do cafeeiro. In: Zambolim, L. (Ed.). *Produção Integrada de Café*. Viçosa. 2003. pp.367-396

MAYR, E. *What Evolution Is*: Basic Books. 2001.

MCDONALD, B. A. The populations genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87:448-452. 1997.

MCDONALD, B. A. & MCDERMOTT, J. M. Population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience* 43:311-319. 1993.

MILGROOM, M. G. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review Phytopathology* 34:457-477. 1996.

- MILGROOM, M. G. & PEEVER, T. L. Population biology of plant pathogens. *Plant Disease* 87:608-617. 2003.
- MORETTI, M., SARACCHI, M. & FARINA, G. Vegetative compatibility groups in *Cercospora beticola*. (Abstr.). *Phytopathology* 96(suppl.):S11. 2006.
- NAUTA, M. J. & HOEKSTRA, R. F. Vegetative incompatibility in Ascomycetes: highly polymorphic but selectively neutral? *Journal of Theoretical Biology (London)* 183:67-76. 1996.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70:3321-3323. 1973.
- NITZAN, N., HAZANOVSKY, M., TAL, M. & TSROR (LAHKIM), L. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of Black Dot on Potato. *Phytopathology* 92:827-832. 2002.
- PEEVER, T. L. & MILGROOM, M. G. Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 84:515-519. 1994.
- PILDAIN, M. B., VAAMONDE, G. & CABRAL, D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology* 93:31-40. 2004.
- PRYOR, B. M. & MICHAILIDES, T. J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with alternaria late blight of pistachio. *Phytopathology* 92:406-416. 2002.
- PUHALLA, J. E. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63:179-183. 1985.
- ROBESON, D. J. & JALAL, M. A. F. A *Cercospora* isolate from soybean roots produces cebetin B and cercosporin. *Phytochemistry* 33:1546-1548. 1993.
- SANTINI, A. & CAPRETTI, P. Analysis of the Italian population of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* using RAPD and minisatellite markers. *Plant Pathology* 49:461-467. 2000.
- SHANNON, C. E. & WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana, IL: University of Illinois Press. 1949.
- SOARES, D. J. Esporulação e germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola*. Dissertação de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

- STEINKAMP, M. P., MARTIN, S. S., HOEFERT, L. L. & RUPPEL, E. G. Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by cercosporin, a toxin from *Cercospora beticola*. *Phytopathology* 71:1272-1281. 1981.
- STEV, J. A. & WELLMAN. *Mycosphaerella coffeicola*. *Journal of the Washington Academy of Science* 34:262. 1944.
- STODDART, J. A. & TAYLOR, J. W. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. *Genetics* 118:705-711. 1988.
- SUASSUNA, N. D. Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, controle químico e resistência em algodoeiro. Tese de Doutorado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- TEUNISSEN, H. A. S., VERKOOIJEN, J., CORNELISSEN, B. J. C. & HARING, M. A. Genetics exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Genetics and Genomics* 268:298-310. 2002.
- VÁRZEA, V. M. P., RODRIGUES JR, C. J. & LEWIS, B. G. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawe* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology* 51:202-207. 2002.
- WEIR, B. S. & HILL, W. G. Estimating F-Statistics. *Annual Review of Genetics* 36:721-750. 2002.
- YAMAZAKI, S., OKUBO, A., AKIYAMA, Y. & FUWA, K. Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from *Cercospora kikuchii*. *Agricultural and Biology Chemistry* 39:287-288. 1975.
- ZAMBOLIM, L., DO VALE, F. X. R., PEREIRA, A. A. & CHAVES, G. M. Café (*Coffea arabica* L.) - Controle de Doenças. In: Do Vale, F. X. R. & Zambolim, L. (Eds.). *Controle de Doenças de Plantas - Grandes Culturas*. Vol.1. Viçosa. 1997. pp.83-180
- ZAMBOLIM, L., DO VALE, F. X. R. & ZAMBOLIM, E. M. Produção Integrada do cafeeiro: Manejo de doenças. In: Zambolim, L. (Eds.). *Produção Integrada de Café*. Viçosa. 2003. pp.443-508
- ZWANKHUIZEN, M. J., GOVERS, F. & ZADOKS, J. C. Development of potato late blight epidemics: disease foci, disease gradients, and infection sources. *Phytopathology* 88:754-763. 1998.

**Genetic variability of *Cercospora coffeicola* in Minas Gerais State, Brazil,  
characterized by vegetative compatibility**

Ricardo B. Martins, Luiz A. Maffia, Eduardo S. G. Mizubuti, and Luiz A. S.  
Dias

First, second, and third authors: Departamento de Fitopatologia; fourth  
author: Departamento de Fitotecnia; Universidade Federal de Viçosa, MG,  
Brazil.

Accepted for publication:

Corresponding author: L.A. Maffia; E-mail: lamaffia@ufv.br.

**ABSTRACT**

Martins, R. B., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., and Dias, L. A. S. 200?.  
Genetic variability of *Cercospora coffeicola* in Minas Gerais State, Brazil,  
characterized by vegetative compatibility.

Minas Gerais (MG) is the leading state in coffee production in Brazil.  
Although *Cercospora* leaf spot is becoming a threat for the state coffee  
industry, little is known about populations of the pathogen, *Cercospora*  
*coffeicola*. We evaluated the potential of using nitrogen nonutilizing (*nit*)  
mutants and vegetative compatibility groups (VCG's) to characterize  
genetic variability of pathogen population associated to coffee plantings in  
MG. A total of 420 isolates were collected according to a hierarchical

sampling scheme of three levels: 1. state geographical regions (Sul, Mata, and Triângulo), 2. crop systems (conventional and organic), and 3. plantings. Ninety monosporic isolates were randomly chosen to be used in VCG tests. We identified 28 VCG's. The ten largest VCG's included 57% of the isolates, whereas each of the remaining 18 VCG's included just one isolate. Isolates of a single VCG were found in the three regions sampled. Population genetic structure was inferred using an AMOVA approach. Most of the variation was attributed to the differences among isolates. Based on the frequencies of VCG's at each sampled level, we estimated the Shannon and Wiener diversity index, as well as its richness and distribution components. There was high diversity in all levels and *C. coffeicola* populations associated with both conventional and organic fields are highly variable.

## INTRODUCTION

Brazil is the largest coffee (*Coffea* spp.) producing country in the world. About 30% of all coffee beans traded in 2006 were from Brazil. Coffee is mostly grown in the southeast part of the country, and Minas Gerais (MG) is the leading state in coffee production. More than 50% of the 2.5 million ton of Brazilian-processed coffee in 2006 were produced in MG.

Coffee production is threatened by many diseases. An important one is cercospora leaf spot, caused by *Cercospora coffeicola* Berk. & Cke. The pathogen infects leaves, fruits, and occasionally stems. Leaf

symptoms are characterized by round necrotic lesions, in which the outer portion is brown and the center gray-white, giving an eye-like appearance. Fruit spots appear as sunburn, black, dried, elliptical scars on the skin that difficult pulping of the affected cherries and reduce coffee quality. The major problem associated with the disease is leaf fall that may reduce production up to 30% (50). Until recently, the disease was of secondary importance and usually associated with plants under nutritional or water stress. However, in the last two decades, professionals of the coffee business sector have noticed an increase in cercospora leaf spot intensity on plantations countrywide (1, 25).

Coffee production systems in Brazil have changed during the last decades. Planting of new cultivars, expansion of production to new areas as the Cerrado, with peculiar edaphoclimatic conditions, adoption of new crop systems as organic, and use of denser plantings, are some changes that may be modifying the relationships in the host-environment-pathogen triangle. Epidemiologically, it is expected that as host and environment change pathogen also changes. Considering the present disease status, two questions arise: What is the amount and distribution of genetic variability in populations of *C. coffeicola* associated to coffee plantings in MG? Do the new crop systems and/or edaphoclimatic conditions affect fungal variability?

An investigation of the genetic structure of the pathogen population is the starting point to answering both questions. By using this approach, it is possible to make inferences regarding population subdivision (26) and whether a specific crop system favors a given genotype (52). Breeding for

resistance can also be improved, considering that new coffee cultivars can be challenged by isolates more representative of pathogen population. Genetic structure of a pathogen population is characterized by morphological, molecular, selective, or neutral markers (4). Regarding the *C. coffeicola* - *Coffea* spp. pathosystem, it is not known whether crop systems, varieties, and/or regions are strong selection factors that act shaping pathogen population. Therefore a selectively neutral marker should be used because of the low chance of affecting fitness components (28). It is assumed that variation associated to a selectively neutral marker would better reflect variation in the sampled population (35).

Vegetative compatibility can be considered as a neutral marker that provides information for the analysis of genetic diversity of fungal population (28), assuming that individuals of the same VCG are more similar (17, 45, 51). However, it should be pointed out that there is no consensus about the neutrality of this marker (8, 38). For fungal populations in which extranuclear deleterious elements are associated with hypovirulence, VCG's can be under selection to prevent dissemination of these elements in the population (8). On the other hand, VCG's do not affect virulence and aggressiveness and thus can be considered as selectively neutral (38). It has been observed that after identifying compatible individuals, morphological variations that were *a priori* observed were correlated to a given VCG (2, 26, 44). Nitrate-nonutilizing (*nit*) mutants, that do not use nitrate as nitrogen source, have been used to study VCG in many plant pathogenic fungi (3, 11, 27). The use of *nit* mutants to assess vegetative compatibility was firstly developed

for *Aspergillus nidulans* (13) and then adapted for *Fusarium oxysporum* (40) and other plant pathogenic fungi (3, 26), including *C. kikuchii* (7) and *C. beticola* (37). No report of using *nit* mutants or other techniques to assess VCG's in *C. coffeicola* populations was found.

Although the increased importance of cercospora leaf spot in Brazil, there are few studies related to variation of *C. coffeicola* (30, 43). Therefore this research was conducted to estimate the genetic variability of pathogen population associated to coffee plantations in the MG state. We tested two hypotheses: i- *nit* mutants can be used to study VCG in *C. coffeicola*; and ii- region and coffee crop system affect the genetic structure of *C. coffeicola* population.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Sampling, isolation, and selection of isolates**

To represent variation in pathogen population, a plan using a hierarchical sampling scheme with three levels was set: 1. State regions (Mata, Sul, and Triângulo); 2. crop systems (organic and conventional); and 3. coffee plantations. In each region, diseased leaves were sampled from six plantations, three under organic and three under conventional crop systems, with 18 plantations in the state (Figure 1). In each plantation, a W-pattern of systematic sampling was followed in about 1 ha, and 24 plants were randomly chosen. About 20 diseased leaves were collected from the lower, middle, and upper thirds of each plant, from October 2004 to February 2005. In each plantation, the sampling point

was georeferenced using a portable global positioning system apparatus.

In the lab, *C. coffeicola* isolates were directly isolated from the leaves and considered as “wild-type isolates”. Monosporic cultures were obtained for each wild-type isolate, as previously described (18). Five monosporic isolates from other Brazilian states or plant species were considered as “tester isolates”: CC27 (*C. coffeicola* collected in Mucugê, BA); CC30, CC31 (*C. coffeicola* collected in Brasília, DF) CK50 (*C. kikuchii* from soybean); and CL51 (*C. longissima* from lettuce). The CC27 was collected by the authors and the others were supplied by Dr. A. Reis (EMBRAPA-Hortaliças, Brasília-DF). The monosporic isolates were characterized by morphology of colonies, conidia, and conidiophores (10, 14) and were preserved by both dehydrated mycelial discs in flasks with silica gel (42), kept at lab conditions in the dark, and culture tubes with potato-dextrose-agar (PDA) (16).

For the experiments, five wild-type isolates were randomly selected for each plantation. A total of 90 isolates from MG plus the five tester isolates were used in the experiments (Table 1).

Five culture media were used in different stages to determine VCG's: i- modified Czapek dox agar: 1 g  $K_2HPO_4$ , 0.5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g KCl, 0.01 g  $FeSO_4$ , 30 g Sucrose, 20 g agar, 1 L water (MCDA); ii- nitrate Czapek dox agar: MCDA plus 2 g  $NaNO_3$  (NCDA); iii- chlorate Czapek dox agar: MCDA plus 2 g  $NaNO_3$  and 30 g  $KClO_3$  (CCDA); iv- hypoxanthine Czapek dox agar: MCDA plus 0.2 g hypoxanthine (HCDA); and v- ammonium tartrate Czapek dox agar: MCDA plus 1 g ammonium tartrate (TCDA) (11, 16).

### **Selection, characterization, and preservation of *nit* mutants**

To obtain and characterize the *nit* mutants, we adapted the procedure developed by Cove (13) and modified by Puhalla (40). A 4 mm diameter disc from a colony grown in NCDA was centrally planted in CCDA in a 90 mm diameter Petri dish (five dishes per isolate), incubating in the dark at 25°C (these incubation conditions were followed in the remaining procedures). The colonies were weekly inspected, during 6 weeks, to find chlorate resistant sectors, that had a faster growth than the remaining parts of the colony. Portions of these sectors were transferred to NCDA in plates, incubating for 7 days. The resulting colonies, with a thin growth, of a little or no aerial mycelium were considered as *nit* mutants (11). To separate the mutants in the NitM or *nit1/nit3* phenotypic classes, *nit* mutants were grown again in NCDA and HCDA. Colonies with a thin growth in both media were considered as NitM mutants, whereas colonies with a thin growth in NCDA but a wild type growth in HCDA, were considered *nit1/nit3* mutants (11). After three attempts to recover and characterize both mutant types for most isolates, 812 *nit* mutants were obtained and preserved in the culture tubes with TCDA, at 5°C in the dark. One *nit1/nit3* mutant and one NitM mutant (when possible) were selected for each original isolate, totaling 152 mutants (88 *nit1/nit3* and 64 NitM) that were selected for the complementation tests.

### **Identification of compatibility among isolates**

To determine the vegetative compatibility among isolates, *nit1/nit3* and NitM mutants were paired in NCDA in Petri dishes. Before the pairing,

preserved mutants were grown on NCDA, at 25°C in the dark during 7 days. Mycelial disks taken from these colonies were used for pairings. To allow for the 5,632 possible pairing combinations (88 *nit1/nit3* x 64 NitM), the isolates were arranged 6-7 mm apart from each other in a plate, resulting in 42 pairings/plate. The NitM mutants were grouped in 22 sets (each set with three mutants from different isolates) and the *nit1/nit3* were grouped in 17 sets (each set with 14 mutants from different isolates). Disks (4 mm diameter) taken from colonies grown in NCDA for 7 days were distributed in a Petri dish, to account for that: the mutants of each *nit1/nit3* were set surrounding the mutants of each NitM set (Figure 2A). As 17 Petri plates were used for pairing each set of NitM mutants and the 17 sets of *nit1/nit3* mutants, a total of 154 plates were spent in pairing all sets of NitM x *nit1/nit3* for each replication. Each pairing was replicated at least twice. When the results was doubtful, the pairing was replicated two additional times. Thus, approximately 11,950 pairings were done in total. Vegetative compatibility was checked visually at 3-day intervals, during 3 weeks. Two paired mutants were considered as compatible when a prototrophic growth developed in the region where both colonies contacted (Figure 2B).

### Data analysis

A multilocus haplotype was constructed for each *nit1/nit3* mutant after drawing a matrix with the positive (1) and negative (0) pairings between *nit1/nit3* (lines) and NitM mutants (columns). From the matrix, dissimilarity measurements among the mutants were estimated, by

calculating the complement of the Jaccard's similarity coefficient,  $D_j = 1 - [a/(a + b + c)]$ , in which  $a$ = number of counts of positive pairings in both mutants (type 1 1);  $b$ = number of discordant counts (type 0 1); and  $c$ = number of discordant counts (type 1 0). This coefficient does not consider negative pairings. From the dissimilarity matrix, pair grouping analysis through the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) was carried out and a hierarchical arrangement represented by a dendrogram of the VCG's (44).

Population genetic structure was estimated by analyzing the multilocus haplotypes, considering the different hierarchical levels of population sampled. To account for the percent variation associated to each level, an analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted to partition variance into covariance components due to intra-individual, intersubpopulation, and interpopulation differences (49). Covariance components were used to calculate  $\Phi$  fixation indices (49). Significance of fixation indices was tested using 2,024 nonparametric permutations. Analyses were conducted in four steps: i - all isolates from a single plantation were considered as a subpopulation; ii - all isolates from a single region were considered as a subpopulation; iii - all isolates from a single plantation of a given crop system (conventional or organic) were considered as a subpopulation; and iv. the same as in iii but analyzing each region (Sul, Mata, and Triângulo) independently.

Genetic diversity was estimated by analyzing the frequency of VCG among *C. coffeicola* isolates through Shannon-Wiener's  $H'$  index (41), considering the different hierarchical levels of population sampled

(similarly to the design used to analyse genetic structure). To scale the indices,  $H'$  was divided by  $\ln[E(g_n)]$ , the observed number of VCG. To estimate how the genotypes were distributed in a sample, we calculated the distribution index  $E_5$  (31). Richness,  $E(g_n)$ , (number of phenotypes in a sample) was estimated through rarefaction curves (22). To support for the differences in the  $H'$  and  $E_5$  values among populations, bootstrapping was conducted using 1,000 resamples at a 90% confidence level (22).

The analyses were conducted with Arlequin (version 3.11; University of Geneva, Switzerland) (AMOVA), Genes (version 4.1; Universidade Federal de Viçosa, Brazil) (disimilarity measurements and grouping analysis), and SAS (version 9.1; SAS Institute; Cary, NC) (diversity and distribution indices and confidence intervals estimate - BCa, Accelerated bootstrap observed).

## RESULTS

### Selection and characterization of *nit* mutants

A total of 429 wild-type isolates and 420 monosporic isolates were obtained. Most isolates were chlorate sensitive, which was characterized by morphological changes in colonies grown in CCDA, given that the morphology and growth of isolates in NCDA was normal. The level of chlorate sensitivity varied among isolates. The most sensitive isolate had extreme sinuous colony border (Figure 3A to C). Identifying resistant sectors was not easily performed because of irregularities on colonies shape (Figure 3B, C). After several attempts, the selection of possible

mutant sectors was set to be at colony points as far as possible of the initial growth point (Figure 3C, D).

Largest recovery frequency was for colonies growing 20 to 30 days in CCDA. Frequency of recovering *nit* mutants varied among isolates and apparently was proportional to chlorate sensitivity. Low number of or even no mutant isolates were recovered when growth in CCDA approached a radial pattern (Figure 3A). No mutant sector was recovered from six chlorate insensitive isolates. From the remaining isolates, 812 sectors were recovered, 683 *nit1/nit3* and 129 NitM mutants. One reversion from *nit1/nit3* to wild type took place during the experiments. Mutants of both phenotypes were recovered for 64 isolates whereas only *nit1/nit3* mutants were recovered for the remaining 25 isolates.

### **Identification of compatibility among isolates**

Both compatible and incompatible reactions were clearly distinguishable with the arrangement of mutants in the Petri plates (Figure 2B). Compatible reactions, observed between the 7<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days after pairing, were characterized by a prototrophic mycelium in the contact zone of the confronted mutants, development of abundant aerial mycelium, and the expansion of prototrophic growth alongside the contact zone (Figure 2B). At the incompatible reactions, no morphological change was observed in the contact zone (Figure 2B). Eventually we observed weak complementation reactions, characterized by a thin prototrophic mycelium that remained restricted to the points observed initially. From a total of 88 isolates, 18 were incompatible with any other. For the 64

isolates that were reciprocally paired, 16 were self-incompatible.

### **Characterization of vegetative compatibility groups**

The 18 isolates in which incompatible reaction was observed were excluded from the analysis. Positive reactions were considered when intense prototrophic growth developed in the contact zone. VCG's groups were determined based on the dendrogram. The dissimilarity among the VCG's was 100% (Figure 4).

Considering the isolates from different regions, 28 VCG's were found. The testers CC27, CC30, and CC 31 (all *C. coffeicola*) were included in one of the 28 groups, whereas CK50 (*C. kikuchii*) and CL51 (*C. longissima*) were self-compatible and incompatible with all other isolates (Figure 4; Table 1).

### **Genetic structure based on VCG analysis**

Six VCG's (VCG-01 to VCG-06), each with 4 to 12 isolates, included 44.6% of the isolates. Four VCG's (VCG-07 to VCG-10), each with 3 to 4 isolates, included 12.1% of the isolates. The remaining groups (VCG-11 to VCG-28) included 1.2% of the isolates, and each group had just one isolate, that was self-compatible but incompatible with any other isolate. These VCG's were referenced as rare VCG's (Table 1).

According to the estimates of variance in the different hierarchical levels, lowest percent of variation was due to differences in subpopulations among regions. Thus, considering subpopulations associated to the different regions, most genetic variability was detected

between isolates (87,01%;  $\Phi_{ST}=0.13$ ;  $P=0.024$ ). Similar values were calculated for all levels studied (Table 2).

Distribution and frequency of VCG's differed among regions. Considering the 28 VCG's detected, 11, 12, and 12 VCG's were from Triângulo, Sul, and Mata, respectively (Table 3). Many groups were restricted to specific regions. Isolates of VCG-05 were detected in the three regions, VCG-01 and VCG-03 were detected in the Sul and Triângulo, and VCG-02 and VCG-04 in the Sul and Mata regions. The Sul region included isolates of the six largest VCG's. The VCG's with two and three isolates were found in the Mata (VCG-7 and VCG-10) and Triângulo (VCG-08 and VCG-09). The rare VCG's were distributed in the three regions: VCG-11 to VCG-15 in the Triângulo; VCG-16 to VCG-21 in the Sul; and VCG-22 and VCG-28 in the Mata (Figure 5A). Multimember VCG's (VCG-01 to VCG-09) commonly occurred in both crop systems (Figure 5B). Within region, similar trend was observed (Figure 5C-D).

Largest diversity was estimated for subpopulations of both Sul and Mata, with a scaled  $H'$  of 1.102 and 1.009, respectively, whereas for Triângulo scaled  $H'$  was 0.922. The trend of the other indices, either scaled or not, was similar among regions (Table 3). Diversity was lowest in the Triângulo as well as richness and distribution indices,  $E(g_n) = 10.98$  and  $E_5 = 0.528$  (Table 3), which is due to a small number and unequal distribution of VCG's (Figure 5A). However, considering the estimated confidence intervals for  $H'$  and  $E_5$ , the estimated intervals overlapped (Table 3).

Diversity estimates also differed among regions regarding crop systems. For Mata, largest diversity was associated to subpopulations from organic system, scaled  $H' = 1.149$ , whereas for subpopulations from conventional system the scaled  $H'$  was 1.012 (Table 3). For subpopulations from Triângulo and Sul, largest population diversity was associated to conventional plantations (Table 3). Similar trend was found on the scaled indices (Table 3). Considering richness in the Mata region, the largest value was for subpopulations from organic system,  $E(g_n) = 9.98$ , whereas for the Triângulo, largest richness was associated to subpopulations from conventional system,  $E(g_n) = 8.98$  (Table 3). For the Sul, no difference was found regarding richness between subpopulations from organic and conventional systems,  $E(g_n) = 6.98$  (Table 3). Largest  $E_5$  values were for subpopulations from organic system in the Mata and for subpopulations from conventional system in the Sul. For the Triângulo,  $E_5$  values did not differ between subpopulations on both crop systems (Table 3).

Considering plantations in the regions, scaled  $H'$  varied from 1.093 to 1.385 for Triângulo, 1.237 to 1.385 for Mata, and 0 to 1.385 for Sul (Table 4). Largest difference among diversity estimate among subpopulations in plantations was attributed to the richness component. For 10 plantations, the estimated  $E(g_n)$  was 2.98 and for four plantations  $E(g_n)$  was 3.98 (Table 4). For one plantation, the estimated richness approached the maximum,  $E(g_n) = 4.98$ , and for three the estimates were low, and  $E(g_n)$  was between 0.98 to 1.98. For these three (10-SO, 14-SC, and 6-TO), estimates of  $E(g_n)$  were low due to the small number of

isolates per plantation (Table 4). Populations of the remaining 15 plantations did not differ according to the estimated confidence intervals indices, either scaled or not.

## DISCUSSION

This is the first report on vegetative compatibility among *C. coffeicola* isolates. We demonstrated that the technique developed by Cove (13) and modified by Puhalla (40) can be used to study vegetative compatibility reactions in *C. coffeicola* isolates. There was high genetic variability in the population of *C. coffeicola*, the lowest proportion of variation being attributed to the difference in regions, and most VCG's were restricted to specific regions.

Mutants were successfully gotten for 89 out of 95 isolates tested. Probably, the lack of mutants for six isolates was due to the  $\text{KClO}_3$  concentration we used. As reported for other fungi, specially for apparently chlorate insensitive isolates,  $\text{KClO}_3$  concentration directly affects the formation of mutant sectors (23, 29, 46). Increasing the proportion of  $\text{KClO}_3$  in the CCDA may probably recovering mutants of these isolates. Another difficulty was in identifying chlorate resistant sectors in the colony. For most sensitive isolates, in which growth was strongly inhibited, identifying resistant sectors was not difficult they fast-growing sectors in a V-shape. However for most isolates, that were moderately inhibited, identifying resistant sectors was difficult and subjective. Because of colony borders sinuosity, finding the V- shaped sectors was confusing and we

decided to choose the farthest points away from the colony center as presumptive mutant sectors. After following this rule, the success in recovering mutants increased considerably. Similar problems seem to have occurred to recover mutant sectors in *C. kikuchii* (7).

The genetic basis of nitrogen absorption by *C. coffeicola* is not known. The two phenotypic classes we identified correspond to mutations in several loci in *Aspergillus nidulans* and *Fusarium moniliforme* (11-13, 48). However there is no evidence regarding the amount of mutated loci that govern both phenotypes in *C. coffeicola*. Therefore we followed the terminology proposed by Correl *et al.* (11), and widely accepted in the research with *nit* mutants (7, 26, 47). Considering the types of mutants identified, largest success in complementation tests is related to pairing either *nit1* or *nit3* with NitM mutants (7, 11, 47, 48). Thus we searched for these mutants. With the culture media used, we could distinguish NitM from both *nit 1* and *nit3* mutants. We did not attempt to separate *nit1* and *nit3* mutants, and the terminology *nit1/nit3* mutant was used; separating both was irrelevant to our objectives, as mutants of either class are capable of pairing with NitM mutants (7, 11, 48). The proportion NitM : *nit1/nit3* mutants in *C. coffeicola* was about 1:5, similar to the proportion of mutants reported in studies carried out with other fungi (7, 39, 46).

Self-incompatibility among fungal isolates is commonly reported with *nit* mutants (11, 45) and this reaction was detected in 16 *C. coffeicola* isolates. However, before concluding about self-incompatibility reactions, one needs to examine the response carefully since it may be artifact of the technique. Fungal vegetative compatibility is ruled by multiple loci of

vegetative incompatibility (loci *vic* or *het*) (12, 34, 36). Two fungal isolates are compatible only if they share the same alleles at all incompatibility loci. Thus if just one allele differs between two isolates, they will be incompatible and consequently no heterokaryon will be formed (20, 28). No mutagenic agent is used to generate *nit* mutants, but the process induces a stress condition that may trigger several mutation events once the activity of transposable elements is increased in the fungal genome (15). With the experimental procedures employed, only mutants with phenotypes related to nitrogen absorption are identified (11), and there is no control on mutation on the loci of vegetative incompatibility. A selected *nit* mutant could also be mutated on a locus of vegetative incompatibility. If this happens, a false incompatibility reaction may be observed when such mutant is paired with other to which it is actually compatible. Thus, possibly some reactions may be erroneously considered as incompatible. Following this reasoning, positive reactions are reliable, as there is low probability that the same mutation takes place in two incompatible isolates resulting in the formation of the same alleles in the same incompatibility loci. It is highly likely that the *nit1/nit3* and NitM mutants obtained for the self-incompatible isolates have mutations in the loci that govern vegetative incompatibility, and are not capable of forming heterokaryon with other isolates.

Related to the weak compatibility reactions, it is hypothesized that eventually the process of cell death triggered in the incompatible reaction may have happened slowly, allowing the production of enzymes responsible for nitrogen absorption in the contact point before death of the

heterokaryotic cells (24, 33). Thus the weak reactions were not considered as positive in identifying groups. Some authors also described this type of reaction and it seems there is a consensus of not considering them as positive (9, 27).

Little information on how to preserve *nit* mutants is available. Preservation is crucial, mostly when VCG is to be used as marker on studies of fungal populations genetic structure. These studies require a high number of isolates and commonly the mutants to be paired are not produced at the same time. By using CDA amended with ammonium tartrate (TCDA), the mutants were preserved for long time. Most organisms absorb nitrogen basically as ammonium (11). As *nit* mutants can not reduce other forms of nitrogen to ammonium (11, 13, 48), we hypothesized that growing these mutants in TCDA would preserve them efficiently. The phenotype of *nit* mutants of *C. coffeicola* preserved in TCDA in tubes was kept throughout this study lasting more than 10 months. Just one reversion from the mutant to the wild type was observed when it was cultivated in NCDA.

The isolates of *C. coffeicola* were included in 28 VCG's many of them with just one isolate. Similar results regarding genetic variability were related for other *Cercospora* spp. (5-7, 37).

Region, crop system, and plantation had no effect on the genetic structure of pathogen population. Regardless the levels studied, larger percent of variability was due to differences among isolates. Similar conclusion may be drawn by analyzing diversity estimates and components. We propose two reasons to explain this: i. Coffee crop

systems were changed recently, less than three decades ago (19, 32). Therefore time span may be short to allow changes on genetic composition of pathogen populations associated to the crop systems compared; and ii. *C. coffeicola* is dispersed by water, insects, and mostly wind (21) and coffee plantings regardless of crop systems are geographically closely established. Thus considering proximity between two plantings within regions and considering wind dispersal of conidia, it is expected that the regions share common individuals. For example planting 1-TO is 1.9 km far from 2-TC, and both have similar estimates of diversity and composition.

Regarding VCG distribution, it seems that *C. coffeicola* population associated to coffee in MG follows a regional pattern. Among the 28 VCG's characterized, only VCG-05 was found in the three regions, although it did not prevail in any region. The most prevalent groups at the Triângulo, Sul, and Mata were VCG-01, VCG-03 and VCG-02, respectively. The most prevalent VCG's in the Triângulo were not detected in the Mata, and vice-versa. Both VCG's were found in the Sul. Thus we assumed that there is a narrow flux of individuals between regions.

In conclusion, this is the first report on the use of vegetative genetic compatibility to study *C. coffeicola* isolates. It is also the first one to report usage of VCG to identify pathogen *nit* mutants. With the sampling design we used, it was possible to evaluate pathogen genetic structure. However these three subpopulations are not completely isolated and they share few isolates of the same VCG. No difference regarding genetic diversity was found on populations associated to the two crop systems and regions we

compared. The same collection of isolates is being studied with other markers (morphological and molecular) to characterize the variability on *C. coffeicola*.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Acknowledgments are due to Dr. A. Reis (CNPq- EMBRAPA), who provided the tester isolates from Brasília, and Dr. H. Teixeira (EPAMIG) and C. C. Nunes (North Carolina State University, Department of Plant Pathology), who contacted the coffee growers. L.A. Maffia, L.A.S. Dias and E.S.G. Mizubuti acknowledge the CNPq research fellowship.

## LITERATURE CITED

1. Boldini, J. M., Souza, P. E., Pozza, E. A., Chalfoun, S. M., and Faria, M. A. 2000. Incidência e severidade da cercosporiose em café fertirrigado na região de Lavras-MG. Pages 273-275 in: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil EMBRAPA Café, Poços de Caldas-MG.
2. Botseas, D. D., and Rowe, R. C. 1994. Development of potato dying in response to infection by two pathotypes of *Verticillium dahliae* and co-infection by *Pratylenchus penetrans*. *Phytopathology* 84:275-282.
3. Brooker, N. L., Leslie, J. F., and Dickman, M. B. 1991. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* 81:672-677.
4. Burdon, J. J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:305-323.
5. Cai, G., and Schneider, R. W. 2002. Use of nitrate nonutilizing mutants to examine vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*. (Abstr.). *Phytopathology* 92(suppl.):S11.
6. Cai, G., and Schneider, R. W. 2003. Vegetative compatibility grouping in *Cercospora kikuchii*. (Abstr.) *Phytopathology* 92(suppl.):S11.
7. Cai, G., and Schneider, R. W. 2005. Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain in soybean. *Phytopathology* 95:257-261.
8. Carbone, I., Liu, Y. C., Hillman, B. I., and Milgroom, M. G. 2004. Recombination and migration of *Cryphonectria hypovirus 1* as inferred from gene genealogies and coalescent. *Genetics* 166:1611-1629.
9. Chandelier, A., Laurent, F., Dantinne, D., Mariage, L., Etienne, M., and Cavelier, M. 2003. Genetic and molecular characterization of *Verticillium dahliae* isolates from woody ornamentals in Belgian nurseries. *Eur. J. Plant Pathol.* 109:943-952.
10. Chupp, C. A. 1953. Monograph of the Fungus Genus *Cercospora*. Published by autor, Ithaca, NY.

11. Correll, J. C., Klittich, C. J. R., and Leslie, J. F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646.
12. Cortesi, P., and Milgroom, M. G. 1998. Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2988-2994.
13. Cove, D. J. 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 146:147-159.
14. Crous, P. W., and Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passarola*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
15. Daboussi, M. J., and Capy, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:275-299.
16. Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press.
17. Dobinson, K. F., Harrington, M. A., Omer, M., and Rowe, R. C. 2000. Molecular characterization of vegetative compatibility group 4A and 4B isolates of *Verticillium dahliae* associated with potato early dying. *Plant Dis.* 84:1241-1245.
18. Fernandes, C. D. 1988. Efeito de fatores do ambiente e da concentração de inóculo sobre a cercosporiose do cafeeiro. M.S. thesis. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa-MG, Brazil.
19. Ferraz, L. C. L., Souza, N. L., Ambrosano, E. J., and Rossi, F. 2006. Patógenos de plantas dentro de um sistema orgânico de cultivo tropical. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 14:181-218.
20. Glass, N. L., Jacobson, D. J., and Shiu, P. K. T. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.* 34:165-186.
21. Godoy, C. V., Bergamin Filho, A., and Salgado, C. L. 1997. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Pages 184-200 in: *Manual de Fitopatologia*, H. Kimati, L. Amorim, A. Bergamin Filho, L. E. A. Camargo and J. A. M. Rezende, eds. Ceres, São Paulo-SP.

22. Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., and Fry, W. E. 2003. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:738-746.
23. Jacobson, D. J., and Gordon, T. R. 1988. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology* 78:668-672.
24. Joaquim, T. R., and Rowe, R. C. 1990. Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate-nonutilizing mutants. *Phytopathology* 80:1160-1166.
25. Juliatti, F. C., Peixoto, A. S., Santos, C. M., and Teodoro, R. E. F. 2000. Incidência e severidade de *Cercospora* sp. em café irrigado de Araguari-MG. Pages 223-225 in: I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil EMBRAPA Café, Poços de Caldas-MG.
26. Korolev, N., Katan, J., and Kayan, T. 2000. Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology* 90:529-536.
27. Korolev, N., and Katan, T. 1997. Improved medium for selecting nitrate-nonutilizing (*nit*) mutants of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 87:1067-1070.
28. Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:127-150.
29. Liu, W., and Sundheim, L. 1996. Nitrate nonutilizing mutants and vegetative compatibility groups in *Fusarium poae*. *Fungal Genet. Biol.* 20:12-17.
30. Lombardi, A. P. Z. 2002. Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicida de *Cercospora coffeicola*. M.S. thesis. Universidade Federal Paulista, Departamento de Agronomia, Botucatu-SP, Brazil.
31. Ludwig, J. A., and Reynolds, J. F. 1988. *Statistical Ecology: A primer on methods and computing*. John Wiley & Sons, New York.
32. Marciano Da Costa, L., Olszewski, N., and Mônico, P. A. L. 2003. Manejo e conservação de solos para a cultura do cafeeiro. Pages 367-396 in: *Produção Integrada de Café*, L. Zambolim, ed., Viçosa.

33. Marek, S. M., Wu, J., Glass, N. L., and Gilchrist, D. G. 2003. Nuclear DNA degradation during heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 40:126-137.
34. Marra, R. E., and Milgroom, M. G. 2000. The mating system of the fungus *Cryphonectria parasitica*: selfing and self-incompatibility. *Heredity* 86:134-143.
35. McDonald, B. A., and McDermott, J. M. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience* 43:311-319.
36. McGuire, I. C., Davis, J. E., Double, M. L., McDonald, W. L., and Rauscher, J. T. 2005. Heterokaryon formation and parasexual recombination between vegetatively incompatible lineages in a population of chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Ecol.* 14:3657-3669.
37. Moretti, M., Saracchi, M., and Farina, G. 2006. Vegetative compatibility groups in *Cercospora beticola*. (Abstr.). *Phytopathology* 96(suppl.):S11.
38. Nauta, M. J., and Hoekstra, R. F. 1996. Vegetative incompatibility in Ascomycetes: highly polymorphic but selectively neutral? *J. Theor. Biol.* 183:67-76.
39. Nitzan, N., Hazanovsky, M., Tal, M., and Tsrur (Lahkim), L. 2002. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of Black Dot on Potato. *Phytopathology* 92:827-832.
40. Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* 63:179-183.
41. Shannon, C. E., and Weaver, W. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL.
42. Smith, D., and Onions, A. H. S. 1983. *The preservation and maintenance of living fungi*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
43. Soares, D. J. 2002. Esporulação e germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola*. M.S. thesis. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa-MG, Brazil.
44. Strausbaugh, C. A., Schroth, M. N., Weinhold, A. R., and Hancock, J. G. 1992. Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium*

*dahliae* tester strains and isolates from California potatoes. *Phytopathology* 82:61-68.

45. Suassuna, N. D. 2005. Caracterização de populações de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, controle químico e resistência em algodoeiro. D. Sc. thesis. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa-MG, Brazil.
46. Swift, C. E., Wickliffe, E. R., and Schwartz, H. F. 2002. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Colorado. *Plant Dis.* 86:606-610.
47. Tsrer (Lahkim), L., and Levin, A. G. 2006. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* Kleb. Isolates of Olive Israel. *J. Phytopath.* 151:451-455.
48. Vannacci, G., and Cristani, C. 1998. Characterization of chlorate-resistant sectors from isolates of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum*. *J. Microbiol. Meth.* 31:175-184.
49. Weir, B. S., and Hill, W. G. 2002. Estimating F-Statistics. *Annu. Rev. Genet.* 36:721-750.
50. Zambolim, L., Do Vale, F. X. R., Pereira, A. A., and Chaves, G. M. 1997. Café (*Coffea arabica* L.) - Controle de Doenças. Pages 83-180 in: Controle de Doenças de Plantas - Grandes Culturas, F. X. R. Do Vale and L. Zambolim, eds., Viçosa.
51. Zeise, K., and Von Tiedmann, A. 2001. Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. *J. Phytopath.* 149:469-475.
52. Zwankhuizen, M. J., Govers, F., and Zadoks, J. C. 1998. Development of potato late blight epidemics: disease foci, disease gradients, and infection sources. *Phytopathology* 88:754-763.

**Table 1.** Isolates of *Cercospora coffeicola* from different regions and vegetative compatibility group (VCG) of isolates used to characterize pathogen genetic structure population associated to coffee plantations in Minas Gerais state, Brazil.

Isolate <sup>a</sup>	VCG	Isolate	VCG	Isolate	VCG
TO1a10	01	TO1a2	06	TO4a6	n.d.
TO1a12	01	TO1a3	06	TO4a10	n.d.
TC2a8	01	TC2a10	06	TO6a12	n.d.
TC2a19	01	SC8b5	06	TC7a13	n.d.
TO4a12	01	MO19a4	07	SC8a4	n.d.
TC5a6	01	MC20a23	07	SC8a12	n.d.
TC5a7	01	MC26a3	07	SO10a22	n.d.
TC5a12	01	TC2a2	08	SO10b22	n.d.
TO6a11	01	TC2a14	08	SO12a8	n.d.
TO6b20	01	TO6a4	08	SO12a13	n.d.
SC8a3	01	TO4a2	09	SC14a23	n.d.
SO17a8	01	TC7a24	09	SC15a12	n.d.
SO17d20	02	MO19b19	10	SO17a15	n.d.
MC20a12	02	MO23a3	10	MO19a1	n.d.
MC21a8	02	TO1a1	11	MC20b1	n.d.
MC21c20	02	TC5a15	12	MC20a6	n.d.
MC26a20	02	TC5a19	13	MC21a7	n.d.
MC26a22	02	TC7a2	14	MO23a12	n.d.
TC7a16	03	TC7a7	15	TO6a1	*
SC8b23	03	SO12a1	16	SO10b23	*
SO10a5	03	SO12a6	17	SC14b5	*
SO10a24	03	SC14b23	18	SC14b22	*
SO12a23	03	SC15d1	19	SC14b23	*
SO17a5	04	SC15a4	20	SC15b21	*
MC20a16	04	SO17b23	21	MO25c11	*
MO23c19	04	MO19a11	22		
MO25a22	04	MO19b20	23		
MC26a11	04	MC21a2	24	Testers <sup>b</sup>	VCG
MC26a16	04	MC21a4	25	CC27	01
TO4a14	05	MO23a1	26	CC30	01
SC15a8	05	MO25a6	27	CC31	05
MO23a8	05	MO25c17	28	CK50	sc
MO25a7	05			CL51	sc.

<sup>a</sup> Letters after the numbers indicate the state region (T = Triângulo, S = Sul, and M = Mata) and coffee crop system (O = organic and C = conventional).

<sup>b</sup> Tester isolates: CC27, CC30 and CC31 (*C. coffeicola* from coffee), the first two are from Brasília, DF, the third from Mucugê, Bahia; CK50 (*C. kikuchii* from soybean) and CL51 (*C. longissima* from lettuce).

n.d. Isolate did not pair with any other isolate

\* No *nit* mutant was obtained

<sup>sc</sup> Isolates of other species, self-compatible, but incompatible with isolates of *C. coffeicola*

**Table 2.** Analysis of molecular variance using vegetative compatibility data from isolates of *Cercospora coffeicola* collected from coffee plantings in three regions (Triângulo, Mata and Sul) and two crop systems (Organic and conventional), in Minas Gerais, Brazil.

Hierarchical level	Variation (%)	$\Phi$	$P > \Phi$
<b>Region/Crop system</b>			
<b>Triângulo population <sup>a</sup></b>			
$\Phi_{CT}$ (among crop system)	-9.11	-0.09	0.88 <sup>e</sup>
$\Phi_{SC}$ (among plantations within crop system)	11.48	0.1	0.14 <sup>f</sup>
$\Phi_{ST}$ (within plantations)	97.63	0.02	0.25 <sup>g</sup>
<b>Sul population <sup>a</sup></b>			
$\Phi_{CT}$ (among crop system)	-3.25	-0.032	0.79 <sup>e</sup>
$\Phi_{SC}$ (among plantations within crop system)	-0.74	-0.007	0.43 <sup>f</sup>
$\Phi_{ST}$ (within plantations)	104	-0.04	0.5 <sup>g</sup>
<b>Mata population <sup>a</sup></b>			
$\Phi_{CT}$ (among crop system)	9.63	0.099	<0.0001 <sup>e</sup>
$\Phi_{SC}$ (among plantations within crop system)	-6.61	-0.073	0.88 <sup>f</sup>
$\Phi_{ST}$ (within plantations)	96.68	0.033	0.5 <sup>g</sup>
<b>Total population/Crop system <sup>b</sup></b>			
$\Phi_{CT}$ (among crop system)	-1.81	-0.018	0.82 <sup>e</sup>
$\Phi_{SC}$ (among plantations within crop system)	10.87	0.11	0.013 <sup>f</sup>
$\Phi_{ST}$ (within plantations)	90.94	0.09	0.024 <sup>g</sup>
<b>Total population/Region <sup>c</sup></b>			
$\Phi_{CT}$ (among regions)	11.61	0.116	0.004 <sup>e</sup>
$\Phi_{SC}$ (among plantations within regions)	1.39	0.016	0.28 <sup>f</sup>
$\Phi_{ST}$ (within plantations)	87.01	0.13	0.024 <sup>g</sup>
<b>Total population/Plantations <sup>d</sup></b>			
(among plantations)	9.83		
$\Phi_{ST}$ (within plantations)	90.17	0.098	0.026 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Variance partitioned within and between two subpopulations associated with plantings conducted under organic or conventional crop systems in each region (Triângulo, Sul and Mata).

<sup>b</sup> Variance partitioned within and between two subpopulations associated with plantings conducted under organic or conventional crop systems in Minas Gerais State.

<sup>c</sup> Variance partitioned within and between three subpopulations associated with plantings located in three geographical regions (Triângulo, Sul and Mata)

<sup>d</sup> Variance partitioned within and between two subpopulations associated with plantings regardless of crop system and region, in Minas Gerais State.

<sup>e</sup> Probability of obtaining equal or lower  $\Phi$  value determined by 2,024 randomizations by permuting subpopulations among populations.

<sup>f</sup> Probability of obtaining equal or lower  $\Phi$  value determined by 2,024 randomizations by permuting haplotypes among subpopulations within populations.

<sup>g</sup> Probability of obtaining equal or lower  $\Phi$  value determined by 2,024 randomizations by permuting haplotypes among subpopulations among populations.

**Table 3.** Estimate of diversity indices, richness and distribution of *Cercospora coffeicola* populations in coffee plantations in Minas Gerais collected hierarchically with the following levels in a decreasing sequence: regions (Sul, Triângulo, and Mata) and crop systems (organic and conventional).

Hierarchical level	Sample size ( <i>n</i> )	$g_{obs}^c$	$E(g_n)^d$	$H'^e$	confidence interval <sup>f</sup>	$H'\ln[E(g_n)]^g$	$E_s^h$	confidence interval <sup>f</sup>
<b>Region/Crop system</b>								
Mata/Organic	13	10	9.98	2.644	2.362-2.926	1.149	0.993	0.898-1.089
Sul/Conventional	6	6	6.98	2.274	1.900-2.649	1.170	1.097	0.991-1.203
Sul/Organic	9	7	6.98	2.218	1.822-2.614	1.142	0.819	0.683-0.956
Triângulo/Conventional	14	9	8.98	2.293	1.931-2.656	1.045	0.649	0.496-0.802
Triângulo/Organic	11	6	5.98	1.802	1.407-2.198	1.008	0.656	0.491-0.812
Mata/Conventional	11	5	4.98	1.625	1.267-1.983	1.012	0.756	0.592-0.920
<b>Crop system<sup>a</sup></b>								
Organic MG	33	19	17.99	3.056	2.834-3.277	1.058	0.768	0.658-0.879
Conventional MG	32	18	17.98	2.965	2.737-3.193	1.026	0.725	0.615-0.835
<b>Region<sup>b</sup></b>								
Sul	16	12	11.98	2.737	2.434-3.039	1.102	0.770	0.644-0.896
Mata	24	12	11.98	2.505	2.245-2.765	1.009	0.746	0.627-0.866
Triângulo	25	11	10.98	2.208	1.881-2.535	0.922	0.528	0.380-0.677
<b>Total population<sup>c</sup></b>								
	65	28	27.98	3.180	2.98-3.78	0.955	0.626	0.526-0.726

<sup>a</sup> Estimate for the total population combined considering crop system

<sup>b</sup> Estimate for the total population combined not considering crop system

<sup>c</sup> Number of VCG observed

<sup>d</sup> Number of VCG expected for the sample size (*n*) calculated by using the rarefaction method (22).

<sup>e</sup> VCG diversity based on Shannon-Wiener's index (41).

<sup>f</sup> Confidence interval calculated by bootstrapping, by using 1000 resamples at a confidence level of 90% (BCa method) (22).

<sup>g</sup> Evenness calculated by scaling Shannon-Wiener's index by the expected number of VCG  $g_n$  to adjust for sample size dependence (22).

<sup>h</sup> Evenness (22).

**Table 4.** Indices of diversity, richness, and distribution for populations de *Cercospora coffeicola* associated to coffee plantations in three regions of Minas Gerais state, Brazil.

Plantation <sup>a</sup>	Sample size ( <i>n</i> )	$g_{obs}$ <sup>b</sup>	$E(g_n)$ <sup>c</sup>	$H^d$	confidence interval <sup>e</sup>	$H/\ln[E(g_n)]^f$	$E_5^g$	confidence interval <sup>e</sup>
25-MO	5	5	4.98	2.096	1.654-2.538	1.306	1.101	0.984-1.218
7-TC	4	4	3.98	1.846	1.327-2.365	1.336	1.089	0.984-1.195
17-SO	4	4	3.98	1.846	1.327-2.365	1.336	1.089	0.984-1.195
19-MO	4	4	3.98	1.846	1.327-2.365	1.336	1.089	0.984-1.195
23-MO	4	4	3.98	1.846	1.327-2.365	1.336	1.089	0.984-1.195
4-TO	3	3	2.98	1.512	0.905-2.119	1.385	1.061	0.979-1.142
8-SC	3	3	2.98	1.512	0.905-2.119	1.385	1.061	0.979-1.142
12-SO	3	3	2.98	1.512	0.905-2.119	1.385	1.061	0.979-1.142
15-SC	3	3	2.98	1.512	0.905-2.119	1.385	1.061	0.979-1.142
20-MC	3	3	2.98	1.512	0.905-2.119	1.385	1.061	0.979-1.142
21-MC	4	3	2.98	1.351	0.840-1.862	1.237	0.939	0.815-1.063
26-MC	4	3	2.98	1.351	0.840-1.862	1.237	0.939	0.815-1.063
1-TO	5	3	2.98	1.299	0.892-1.707	1.190	1.023	0.867-1.180
2-TC	5	3	2.98	1.298	0.890-1.706	1.189	1.024	0.867-1.181
5-TC	5	3	2.98	1.193	0.702-1.684	1.093	0.76	0.592-0.927
6-TO	3	2	1.98	0.849	0.355-1.343	1.243	0.899	0.899-0.899
10-SO	2	1	0.98	0	0	0.000	*	**
14-SC	1	1	0.98	0	0	0.000	*	**

<sup>a</sup> Letters after the numbers indicate the state region (T = Triângulo, S = Sul, and M = Mata) and coffee crop system (O = organic and C = conventional).

<sup>b</sup> Number of VCG observed.

<sup>c</sup> Number of VCG expected for the sample size (*n*) calculated by using the rarefaction method (22).

<sup>d</sup> VCG diversity based on Shannon-Wiener's index (41).

<sup>e</sup> Confidence interval calculated by bootstrapping, which was conducted using 1000 resamples at a confidence level of 90% (BCa method) (22).

<sup>f</sup> Evenness calculated by scaling Shannon-Wiener's index by expected number of VCG  $g_n$  to adjust for sample size dependence (22).

<sup>g</sup> Evenness (22).

\*  $E_5$  not calculated.

\*\* Confidence interval was not calculated.

**Figure 1.** Localities in the Minas Gerais state, Brazil, where *Cercospora coffeicola* isolates were collected. Letters after the numbers indicate the region (T = Triângulo, S = Sul, and M = Mata) and coffee crop system (O = organic and C = conventional).

**Figure 2. A,** arrangement of mutants in a Petri plate for a complementation test (full circles = NitM mutants; empty circles = *nit1/nit3* mutants). Pairing of a set of NitM mutants with a set of *nit1/nit3* mutants is represented; **B,** positive results of a pairing (P= prototrophic growth between discs).

**Figure 3. A,** *Cercospora coffeicola* colony with low sensitivity to chlorate, grown in Czapek dox agar amended with 3% KClO<sub>3</sub> (CCDA). **B,** *C. coffeicola* colony with moderate sensitivity to chlorate, grown in CCDA. **C,** *C. coffeicola* colony grown in CCDA. Circled areas (a, b, and c) are presumably chlorate resistant sectors that were transferred to nitrate Czapek dox agar (NCDA). **D,** Colonies in NCDA resulting from the transference in “C”. Sectors a and b originated colonies with characteristics of the wild type (colony 0 in the upper end) and sector c resulted in a Nit mutant colony with auxotrophic growth.

**Figure 4.** Disimilarity among isolates de *Cercospora coffeicola* based on the complement of Jaccard similarity coefficient. The dendrogram was drawn after Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean pair grouping. Bar on the right sets the limits of vegetative compatibility groups (VCG).

**Figure 5.** Distribution and frequency of vegetative compatibility groups (VCG) in coffee plantations in: **A** - the regions of Triângulo, Sul, and Mata of Minas Gerais state, Brazil; **B** - the crop system organic and conventional on Minas Gerais, Brazil; **C, D** and **E** - the crop system organic and conventional on regions of Triângulo, Sul, and Mata.

Fig. 1. Martins, R. B., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., and Dias, L. A. S.

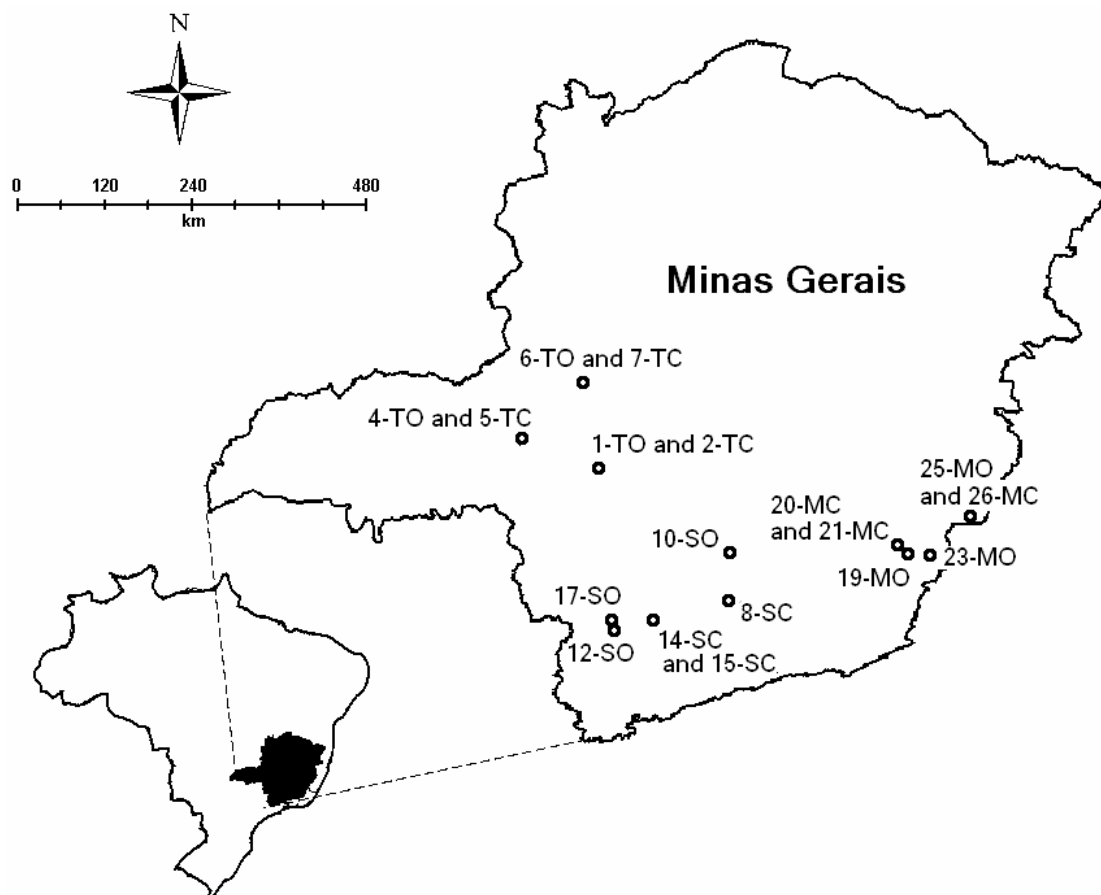


Fig. 2. Martins, R. B., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., and Dias, L. A. S.

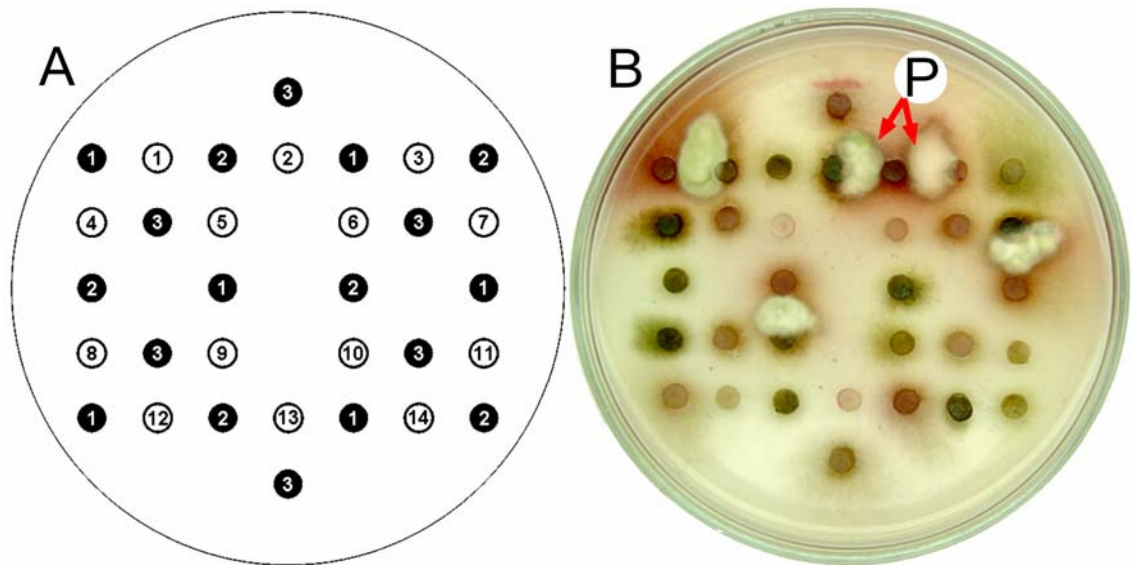


Fig. 3. Martins, R. B., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., and Dias, L. A. S.

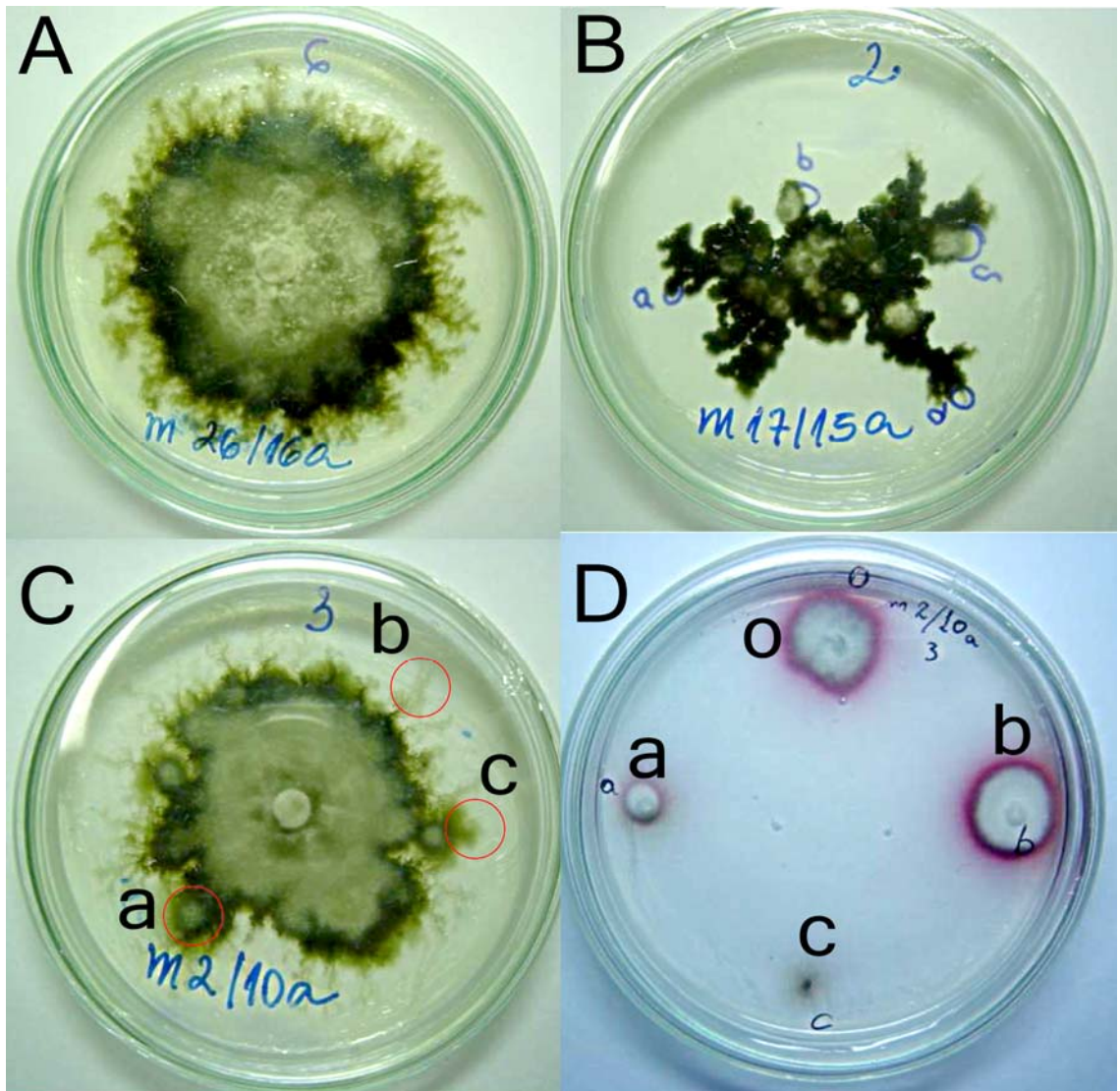


Fig. 4. Martins, R. B., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., and Dias, L. A. S.

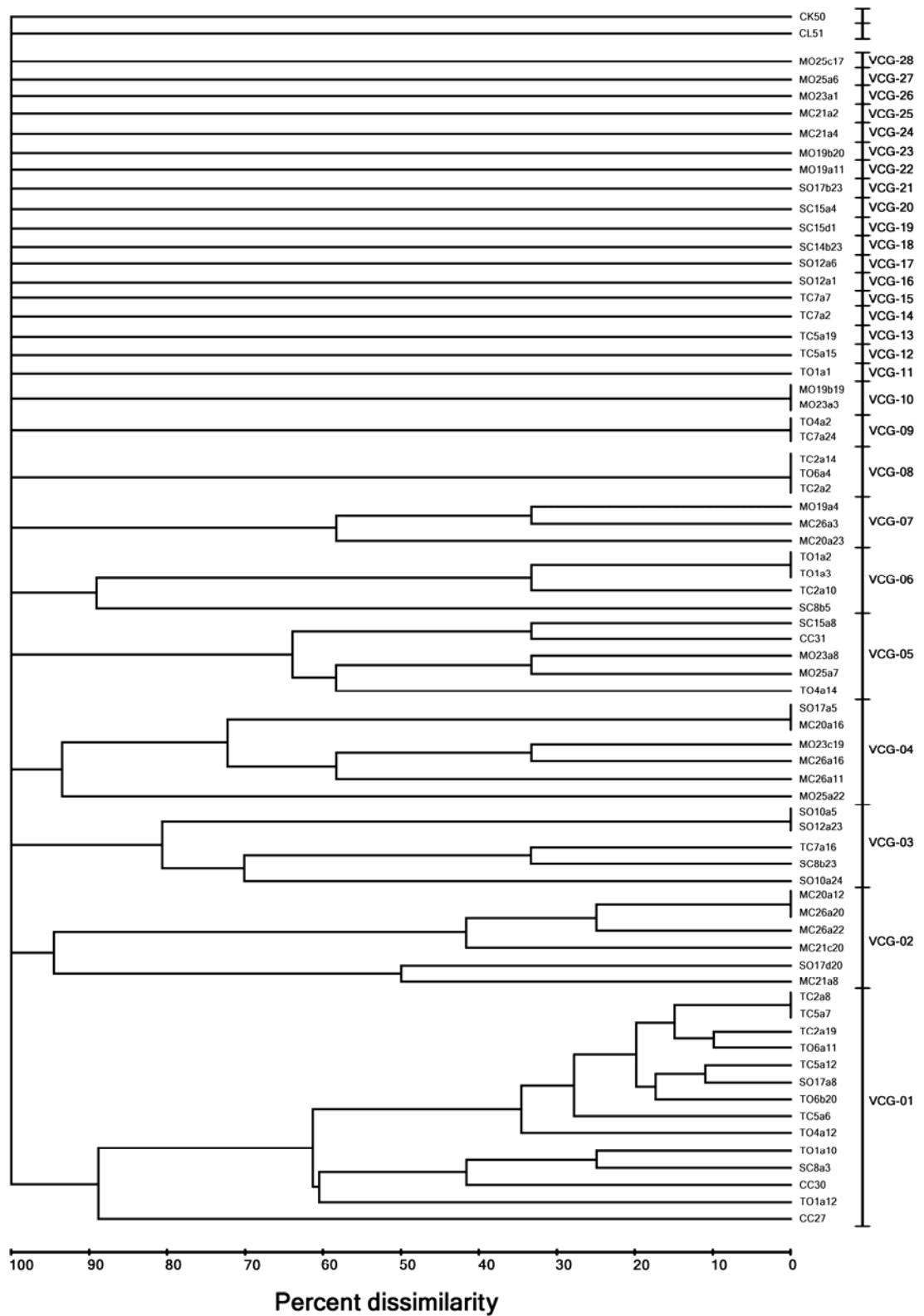
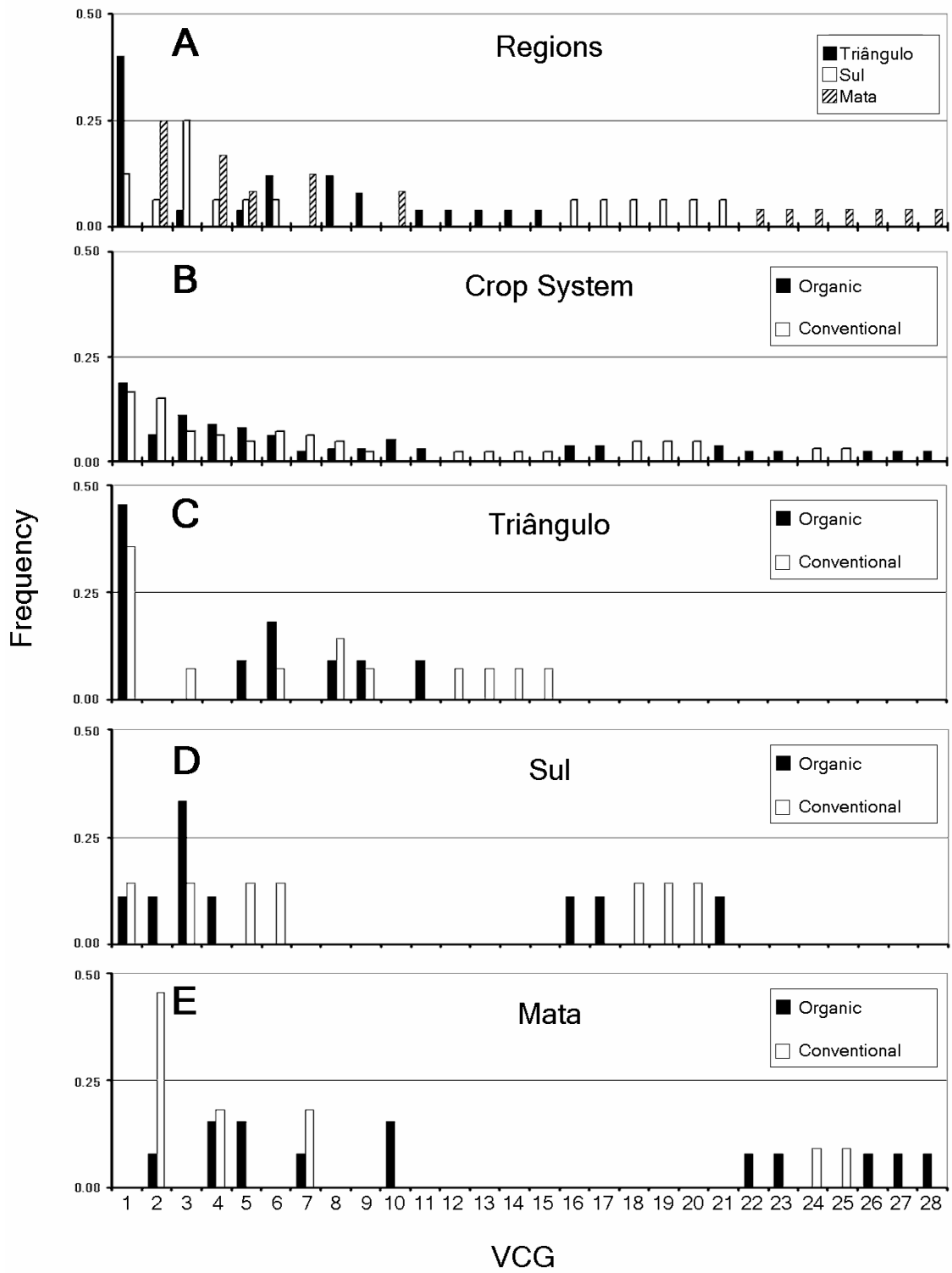


Fig. 5. Martins, R. B., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., and Dias, L. A. S.



**Variabilidade de isolados de *Cercospora coffeicola* oriundos de cafezais convencionais e orgânicos de três regiões do Estado de Minas Gerais com base na produção de cercosporina**

**Ricardo B. Martins<sup>1\*</sup>, Luiz A. Maffia<sup>1</sup>, Eduardo S. G. Mizubuti<sup>1</sup> e Luiz A. S. Dias<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia; <sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia - Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa – MG, e-mail: [lamaffia@ufv.br](mailto:lamaffia@ufv.br)

(Aceito para publicação em     /     /     )

Autor para correspondência: L.A. Maffia .

---

MARTINS, R. B., MAFFIA, L. A. MIZUBUTI, E. S. G. & DIAS, L. A. S. Variabilidade de isolados de *Cercospora coffeicola* oriundos de cafezais convencionais e orgânicos de três regiões do Estado de Minas Gerais com base na produção de cercosporina.

**RESUMO**

Para detectar a variação em população de isolados de *Cercospora coffeicola* obtida em Minas Gerais, estabeleceu-se um plano de amostragem hierarquizado nos seguintes níveis: 1. Região (Sul, Triângulo e Mata); 2. sistema de cultivo (orgânico e convencional) e 3. lavouras. Para cada isolado, quantificou-se a produção *in vitro* de cercosporina e avaliou-se a influência de cada nível de amostragem na variabilidade detectada. Para os 90 isolados avaliados, houve produção do pigmento, a qual variou de 1,7 a 35,3 µMol/isolado. A variabilidade em relação à variância total foi de 1,9; 7,8 e

\* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2007.

48,9% para os níveis região, lavoura e isolados, respectivamente. Não se detectou influência do sistema de cultivo sobre a variabilidade ( $P=0,88$ ). Estimaram-se medidas de dissimilaridade entre isolados (distância de Mahalanobis) e efetuou-se análise de agrupamento (UPGMA) para definir grupos de produção similar de cercosporina (GPC). Definiram-se quatro GPCs (A, B, C e D). Os GPC-A e B, com maior produção, englobaram 4,4% dos isolados testados, e seus membros só ocorreram em uma lavoura do Sul e uma lavoura da Mata. Os GPC-C e D incorporaram 37,8 e 57,8% dos isolados, respectivamente, cujos membros estavam mais ampla e uniformemente distribuídos em todos os níveis estudados.

**Palavras-chave adicionais:** biologia de populações, mancha-de-olho-pardo, *Coffea arabica*, epidemiologia.

## **ABSTRACT**

### **Variability of *Cercospora coffeicola* isolates from conventional and organic coffee plantations of three areas of the Minas Gerais State, Brazil, based on cercosporin production**

A hierarchical sampling plan was performed to detect variability in the population of isolates of *Cercospora coffeicola* from Minas Gerais, Brazil, with the following levels: 1. State geographical regions (Sul, Triângulo and Mata); 2. Crop system (organic and conventional); 3. Plantings. For each isolate, we quantified the production *in vitro* of cercosporin, and evaluated the influence of each level of sampling in the variability detected. The 90 isolates evaluated produced cercosporin, and the concentration ranged from 1,7 to 35,3  $\mu\text{Mol/isolate}$ . The variability from the total variance was of 1.9, 7.8, and 48.9% for region, plantings and isolate levels, respectively. No effect of crop system ( $P=0,88$ ) was detected in the variability. A dissimilarity measure was estimated among isolates (Mahalanobis distance) and the Unweighted pair-group method with arithmetical

averages (UPGMA) was performed to determine groups of similar cercosporin production (GCP). Four GCPs (A, B, C and D) were determined. The GCP-A and B, with larger production, included 4.4% of isolates tested that occurred in just one planting of Sul and one of Mata. The GPC-C and D included 37.8 and 57.8% of isolates, respectively, and were more widely and uniformly distributed in all the levels studied.

**Additional Keywords:** population biology, cercospora leaf spot, *Coffea arabica*, epidemiology.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café. Em 2006, o País foi responsável por 34,3 e 29,8% do café produzido e exportado no mundo, respectivamente (ICO, 2007a; ICO, 2007b). O café é uma das principais commodities brasileiras: em 2006, dos US\$ 42,6 bilhões obtidos pelas exportações do agronegócio, 6,84 % provieram das vendas de café (MAPA, 2007). Dentre os estados produtores, o de maior expressão é Minas Gerais, de onde se origina mais de 50% do café nacional (CONAB, 2007).

Dentre os problemas fitossanitários que incidem no cafeeiro e reduzem a produtividade, destaca-se a mancha-de-olho-pardo ou cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cke. Até há pouco tempo a doença era considerada de importância secundária e associada apenas a lavouras sob condição de estresse. Entretanto, nas duas últimas décadas, profissionais ligados ao setor cafeeiro relataram aumento na intensidade da cercosporiose (Boldini *et al.*, 2000; Juliatti *et al.*, 2000). O patógeno infecta folhas, frutos e, com menor frequência, ramos. O principal sintoma da doença são lesões necróticas que resultam em redução da área fotossintética, desfolha e decréscimo quantitativo e/ou qualitativo da produção (Godoy *et al.*, 1997).

Uma característica comum a várias espécies de *Cercospora* é a produção de cercosporina, pigmento de coloração vermelha (Daub *et al.*, 2005). A principal propriedade deste pigmento é absorver energia luminosa e transferi-la a outras moléculas

(Daub & Ehrenshaft, 2000). Normalmente, a transferência de energia tem como alvo o O<sub>2</sub> e resulta em espécies reativas de oxigênio, altamente tóxicas e com potencial de interagir e danificar macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios (Daub & Hangarter, 1983; Hartman *et al.*, 1988). Há evidências de que a produção da toxina relaciona-se à intensidade dos sintomas em plantas parasitadas por *Cercospora* spp. (Calpouzos & Stallknecht, 1967; Choquer *et al.*, 2005; Daub *et al.*, 2005; Upchurch *et al.*, 1991). Por essa razão, a toxina é referenciada como fator de agressividade dessas espécies (Daub & Chung, 2007; Daub & Ehrenshaft, 2000; Daub *et al.*, 2005). Por exemplo, isolados de *C. kikuchii*, com produção de cercosporina inferior a 2% que o normal, infectam plantas de soja, mas a severidade dos sintomas que incitam é menor do que os que ocorrem em plantas inoculadas com isolados com produção normal (Callahan *et al.*, 1999). Fato similar é relatado para outras espécies (Almeida *et al.*, 2005; Choquer *et al.*, 2005).

A produção de cercosporina varia entre espécies e entre isolados da mesma espécie (Fajola, 1978; Jenns *et al.*, 1989). Para todas as espécies em que se detectou a toxina *in vitro*, houve relação entre a quantidade detectada e a agressividade nas respectivas plantas hospedeiras (Almeida *et al.*, 2005; Callahan *et al.*, 1999; Fajola, 1978). Por exemplo, para isolados de *C. kikuchii*, houve correlação positiva de 83% entre a quantidade de cercosporina detectada *in vitro* e a severidade em plantas de soja inoculadas com os isolados (Almeida *et al.*, 2005). Vários fatores afetam a produção da toxina, sendo a incidência de energia luminosa crucial para sua produção e atividade (Hartman *et al.*, 1988; Jenns *et al.*, 1989). Dentre os meios testados, maior produção ocorre em batata-dextrose-ágar (BDA), o qual tem sido adotado como padrão em estudos relacionados à toxina (Callahan *et al.*, 1999; Choquer *et al.*, 2005; Fajola, 1978; Jenns *et al.*, 1989).

Há quase três décadas, Fajola (1978) levantou a possibilidade de usar a produção de cercosporina como caráter taxonômico. O autor detectou produção da toxina apenas

por espécies “verdadeiras”, assim denominadas porque morfológicamente não havia dúvida quanto à sua classificação. As “não verdadeiras”, que não produziam a toxina, posteriormente foram reclassificadas, segundo caracteres morfológicos, em outros gêneros como *Pseudocercospora* e *Phaeoramularia* (INDEX FUNGORUM - <http://www.indexfungorum.org>). Recentemente, em estudo filogenético baseado na similaridade entre regiões ITS de *Cercospora* spp. e outros fungos afins, verificou-se que as espécies produtoras de cercosporina foram mais similares entre si (Goodwin & Dunkle, 2006; Goodwin *et al.*, 2001). Fundamentando-se nesses resultados, os autores reforçaram as suposições levantadas por Fajola (1978) e postularam que todas as espécies de *Cercospora* produtoras da toxina têm a mesma origem. É provável que a capacidade de produção da toxina surgiu em um ancestral comum e possibilitou aos descendentes ampliar a gama de hospedeiros, em vista da inespecificidade da cercosporina (Goodwin & Dunkle, 2006; Goodwin *et al.*, 2001).

Coincidentemente, em paralelo ao aumento de intensidade da cercosporiose nas lavouras, o sistema de condução do café em Minas Gerais sofreu várias mudanças, como a adoção de sistemas de cultivo orgânico e adensado, uso de novas variedades e expansão das lavouras para novas áreas, antes consideradas impróprias ao cultivo (Fazuoli *et al.*, 2002). Não há estimativas do impacto dessas alterações na população do patógeno associada às lavouras. Uma forma de evidenciar a possível influência destas mudanças é caracterizar, por meio de marcadores, a variabilidade genética da população associada, por exemplo, a diferentes sistemas de cultivo.

Para caracterizar a variabilidade genética da população de *C. coffeicola* em Minas Gerais, conduzem-se estudos, no Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal de Viçosa, que buscam definir variações em características neutras e seletivas entre isolados das três maiores regiões produtoras do estado: Triângulo, Sul e Zona da Mata (referenciada no restante do trabalho como Mata). Um dos marcadores usados é a produção de cercosporina *in vitro*. Como descrito em outras espécies de *Cercospora*, a

produção *in vitro* correlaciona-se a componentes epidemiológicos, como período de incubação e severidade. Ademais, a capacidade de produção também é diferenciada entre isolados de mesma espécie.

O presente estudo relata os resultados obtidos com a avaliação da produção *in vitro* de cercosporina por isolados de *C. coffeicola* provenientes das três regiões cafeeicultoras mineiras. Neste trabalho, testaram-se três hipóteses: i. isolados oriundos de regiões cafeeicultoras de MG variam quanto à produção de cercosporina; ii. na população, há prevalência de isolados que produzem mais cercosporina; e iii. os diferentes níveis estudados (região, sistemas de cultivo e lavoura) influenciam na variabilidade do patógeno.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Plano de amostragem, isolamento e obtenção e seleção de isolados monospóricos.**

Estabeleceu-se um plano de amostragem hierarquizado para representar a variação na população do patógeno no Estado de Minas Gerais nos níveis: 1. região (Triângulo, Sul e Mata); 2. sistema de cultivo (orgânico e convencional); e 3. lavoura. Em cada região, de outubro de 2004 a fevereiro de 2005, obtiveram-se amostras de folhas de seis lavouras comerciais (três orgânicas e três convencionais). Em cada lavoura, efetuou-se caminharmento em “W”, abrangendo aproximadamente 1 ha, e selecionaram-se 24 plantas ao acaso. Dos terços inferior, médio e superior de cada planta coletaram-se em torno de 20 folhas com sintomas de cercosporiose. Georreferenciou-se cada lavoura amostrada com um equipamento GPS (Sistema de posicionamento global). No total, amostraram-se 18 lavouras (nove orgânicas e nove convencionais), igualmente distribuídas nas três regiões.

Isolados de *C. coffeicola* obtidos das folhas por isolamento direto foram denominados “isolados tipo selvagem”. De cada um desses isolados, obteve-se um isolado monospórico, segundo Fernandes (1988), com modificações. De cada isolado,

verteu-se suspensão de 200 conídios mL<sup>-1</sup> sobre fina camada (< 1mm) de ágar-água (16g ágar, 984 mL de H<sub>2</sub>O) em lâmina de microscopia dentro de placa de Petri, incubando-se a 25°C, sob iluminação contínua. Após 4-5 h, examinou-se a lâmina sob microscópio ótico (objetiva de 10x) e, com agulha estéril, recortou-se um bloco de meio contendo um conídio germinado (com pelo menos um tubo germinativo de comprimento maior ou igual ao comprimento do conídio), o qual foi transferido para BDA em placa, incubando-se a 25°C, com fotoperíodo de 12 h.

Incluíram-se cinco isolados monospóricos “testadores” na coleção: CC27, CC30 e CC31 (todos de *C. coffeicola*), o primeiro de folha de cafeeiro de Mucugê, BA, e os demais de Brasília, DF; CK50 (*C. kikuchii*), de folha de plantas de soja; e CL51 (*C. longissima*), de folha de alface. Utilizaram-se características morfológicas das colônias, conídios, conidióforos e plantas hospedeira para identificação das espécies (Chupp, 1953; Crous & Braun, 2003). Preservaram-se os isolados em disco de papel desidratado em sílica gel dentro de frascos de penicilina, em condição de laboratório (Smith & Onions, 1983), e em BDA, em tubos de ensaio, em câmara fria a 5°C, no escuro (Dhingra & Sinclair, 1995).

Para padronizar o número de isolados nos níveis estudados, da coleção de isolados monospóricos, selecionaram-se aleatoriamente cinco isolados por lavoura (Grünwald *et al.*, 2003). No total, utilizaram-se 90 isolados da coleção e os cinco testadores (Tabela 1).

### **Variabilidade de *Cercospora coffeicola* com base na produção de cercosporina**

Cultivaram-se os isolados monospóricos em BDA em placas de Petri, a 22°C e fotoperíodo de 12h (122 µMol de fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Após 10 dias, mediu-se o diâmetro das colônias. A partir da periferia das mesmas, extraíram-se três discos de meio (4 mm de diâmetro) com crescimento micelial (Figura 1A), os quais foram imersos em 8 mL de

KOH 5N por 4 h a 25°C, no escuro, para extração da cercosporina (Jenns *et al.*, 1989). Efetuou-se leitura da absorvância dos extratos em espectrofotômetro Shimadzu UVmini 1240. Quando se obteve extrato de coloração verde com picos de absorção a 480, 595 e 640 nm, o isolado foi considerado como produtor de cercosporina (Balis & Payne, 1971). A concentração da toxina no extrato foi estimada pelo uso do coeficiente de extinção molar de 23300 para leituras de  $A_{480}$  nm (Jenns *et al.*, 1989). Para determinar a produção de cercosporina por disco, dividiu-se o resultado por três. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições no tempo (uma placa = uma unidade experimental). O experimento foi realizado por duas vezes.

### **Análise dos dados**

Na análise de variância, adotou-se um modelo linear em esquema aninhado:  $Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_{k(ij)} + \delta_{l(ijk)} + \varepsilon_{m(ijkl)}$ ; em que  $\mu$ =média geral;  $\alpha$  = efeito de região;  $\beta$  = efeito de sistema de cultivo, aninhado dentro de região;  $\gamma$  =efeito de lavoura, aninhado dentro de sistema de cultivo e região;  $\delta$  = efeito de isolado, aninhado dentro de lavoura, sistema de cultivo e região. Consideraram-se todos os níveis estudados como aleatórios, testou-se o efeito de cada um e estimou-se o percentual de variância atribuída a cada um.

Posteriormente, procedeu-se à discriminação de grupos de isolados com produção diferenciada da toxina. Construiu-se matriz de dissimilaridade com a aplicação da distância de Mahalanobis e efetuou-se análise de agrupamento aos pares utilizando médias aritméticas (UPGMA). Do dendrograma resultante, diferenciaram-se grupos de isolados similares quanto à produção de cercosporina (GPC). Efetuou-se, ainda, análise de correlação de Pearson entre a quantidade de cercosporina produzida e o crescimento micelial, considerando-se todos os isolados em conjunto. Para as análises, utilizaram-se

os programas SAS ver 9.1 (análises de variância e correlação) e Genes (Cruz, 2001) (medidas de dissimilaridade e UPGMA).

## RESULTADOS

De 420 isolados monospóricos obtidos, selecionaram-se aleatoriamente 90 para estudo. Após 10 dias de incubação, caracterizou-se o acúmulo de cercosporina no meio de cultura pela presença de pigmento de coloração vermelha (Figura 1A). A extração da toxina com KOH 5N resultou em solução verde (cor do pigmento quando solubilizado em base alcalina) (Kuyama & Tamura, 1956a; 1956b; Yamazaki & Ogawa, 1972; Yamazaki *et al.*, 1975), cuja intensidade variou de verde translúcido a verde intenso, o que evidencia diferença entre isolados quanto à produção (Figura 1B). Os picos de absorção ocorreram a 480, 595 e 640nm, conforme já observado (Balis & Payne, 1971; Jenns *et al.*, 1989). Todos os isolados produziram cercosporina. As leituras médias de absorbância a 480 nm variaram de 0,120 a 2,469 por isolado, que correspondem ao acúmulo médio de 1,7 a 35,3  $\mu\text{Mol}$  de cercosporina por disco, respectivamente (Tabela 1). O diâmetro médio das colônias variou de 15,9 a 30,7 mm, e houve correlação negativa ( $r = -0,57$ ;  $P = <0,0001$ ) entre a produção de cercosporina e diâmetro de colônias (Figura 4).

Como os dois experimentos foram similares quanto à homogeneidade da variância (teste de Levene,  $P=0,1674$ ), analisaram-se conjuntamente os dados de ambos. Detectou-se efeito significativo de lavoura ( $P=0,0842$ ) e isolado ( $P=<0,0001$ ), mas não de região nem de sistema de cultivo na variação dos isolados (Tabela 2). Estimou-se maior percentual da variação total para região (1,91%), lavoura (7,84%) e isolado (48,94%) (Tabela 2).

A partir do dendrograma resultante da análise de agrupamento distinguiram-se quatro GPCs, denominados de A a D, em ordem decrescente de produção: GPC-A, com

31,3 a 35,3  $\mu\text{Mol disco}^{-1}$  ; GPC-B, com 22,3 a 25,3; GPC-C com 12,4 a 19,4; e GPC-D, com 1,71 a 11,7 (Figura 2). Os testadores de *C. coffeicola*, CC-27, CC-30 e CC-31, produziram 12,83; 6,54 e 4,05  $\mu\text{Mol disco}^{-1}$ , respectivamente; CK-50 (*C. kikuchii*) produziu 1,3 e CL-51 (*C. longissima*) 1,5  $\mu\text{Mol disco}^{-1}$  (Tabela 1). Os GPCs A e B (maior produção de cercosporina) englobaram o mesmo número de isolados, cada um com 2,22% da população total; GPC-C (produção intermediária), englobou 37,78% dos isolados e GPC D (menor produção) 57,77% dos isolados (Tabela 1 e Figura 2).

A frequência de distribuição dos diferentes grupos variou com o nível hierárquico estudado. Membros do GPC-A e GPC-B só ocorreram em uma lavoura do Sul e uma da Mata, respectivamente (Figura 3A, C). Membros do GPC-C ocorreram em todas as regiões, em 15 das 18 lavouras amostradas, com maior frequência em lavouras sob cultivo convencional (Figura 3A, B). Membros do GPC-D também ocorreram em todas as regiões, e foram detectados em 17 das 18 lavouras amostradas (Figura 4A).

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato do uso da produção de cercosporina como marcador fenotípico para estimar a variabilidade da população de *C. coffeicola* associada ao cafeeiro. Todos os isolados testados produziram a toxina, em concentração que variou de 1,7 a 35,3  $\mu\text{Mol disco}^{-1}$ . Ocorreu variabilidade alta entre isolados do patógeno de regiões cafeeiras de MG quanto à produção da toxina.

Atribuiu-se maior parte da variação estimada na produção (48,9%) à diferença entre isolados. A influência de lavoura foi menor (7,8%), o que evidenciou inexistir subdivisão da população quanto à produção de cercosporina. O baixo efeito de lavoura e a não detecção de diferença nos demais níveis estudados podem ter ocorrido por três razões. A primeira está relacionada ao modo de dispersão do patógeno e à proximidade de lavouras sob diferentes sistemas. O patógeno é disperso pela água, insetos e,

principalmente, pelo vento (Godoy *et al.*, 1997). Assim, é intuitivo esperar que o fluxo de indivíduos do patógeno seja comum entre lavouras. A segunda relaciona-se ao fato de que a adoção da cafeicultura orgânica é recente. A conversão de cultivos convencionais para orgânicos ganhou impulso na última década, com o crescimento da demanda pelo café orgânico (Ferraz *et al.*, 2006). Assim, o tempo para as populações associadas aos diferentes sistemas de cultivo diferirem geneticamente é relativamente curto. A terceira, e mais provável, está associada ao caráter seletivo do marcador. A produção de cercosporina *in vitro* relaciona-se estreitamente à patogenicidade de *Cercospora* spp. (Almeida *et al.*, 2005; Callahan *et al.*, 1999; Choquer *et al.*, 2005). Portanto, assumiu-se que a tendência quanto ao nível de produção *in vitro* corresponda ao da produção *in vivo*, e, conseqüentemente, à severidade de doença causada pelos isolados estudados (Almeida *et al.*, 2005; Fajola, 1978). Como a produção da cercosporina é caráter seletivo, esperava-se haver produção de níveis altos pela maioria dos isolados ou pouca variação entre eles. Entretanto, 95,55% dos isolados, incluídos nos GPC-C e D, produziram menos da metade que aqueles no GPC-A (Tabela 1). Membros dos GPDC-C e D ocorreram em 15 e 17 lavouras, respectivamente (Figura 3A). Ademais, a freqüência de isolados por região variou de 36,7 a 40,0% para o GPC-D, e de 53,3 a 63,33% para o GPC-D (Figura 3C), o que evidencia que os isolados com menor produção estejam distribuídos mais ampla e uniformemente entre os níveis estudados. Os isolados com maior produção de cercosporina ocorreram em lavouras específicas, ambas orgânicas: GPC-A no Sul e o GPC-B na Mata.

Pode-se questionar por que os isolados com maior produção (GPC-A e B) não predominaram na população. Na presença de luz, a cercosporina é virtualmente tóxica a quaisquer organismos, como plantas, bactérias, fungos e ratos (Fajola, 1978; Yamazaki *et al.*, 1975). Apenas espécies de *Cercospora* e de outros fungos produtores de toxinas de atividade semelhante à cercosporina resistem à ação oxidante da mesma (Daub, 1987; Daub & Chung, 2007; Daub & Ehrenshaft, 2000; Daub *et al.*, 2005). Poucas exceções são

conhecidas, como *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, que detoxifica a cercosporina (Taylor *et al.*, 2006). Ainda falta elucidar completamente o que torna *Cercospora* spp. resistentes à cercosporina (Daub & Chung, 2007; Daub & Ehrenshaft, 2000). Há evidências da ação conjunta de vários mecanismos, os quais, basicamente, consistem na síntese de compostos que neutralizam a molécula da toxina (Daub & Chung, 2007). Por exemplo, já se detectou que a vitamina B<sub>6</sub>, produzida por *Cercospora* spp. e com ação antioxidante, reage diretamente com as espécies de oxigênio ativo gerados pela cercosporina, sendo consumida durante este processo (Bilski *et al.*, 2000). Deduz-se que, quanto maior a produção da toxina, maior quantidade de energia é direcionada para ativar mecanismos de autoproteção. Conseqüentemente, há redução de energia para outras atividades relacionadas ao desenvolvimento do patógeno, o que pode levar à redução na adaptabilidade. Entretanto, desconhecem-se estudos quanto ao efeito da produção de cercosporina na adaptabilidade de *Cercospora* spp. Há relatos de que a taxa de crescimento de *Cercospora* spp. sofre redução quando cultivadas em meio de cultura contendo alta concentração de cercosporina (Chung *et al.*, 2003; Upchurch *et al.*, 1991). Para *C. coffeicola*, o diâmetro médio das colônias de isolados do GPC-A e B foi menor que o dos demais grupos. Considerando-se todos os isolados, houve correlação negativa entre produção de cercosporina e diâmetro de colônia. Assim, possivelmente a produção de cercosporina torna-se desvantajosa após certo limite, em vista do alto custo energético requerido para ativar mecanismos de autoproteção. Obteve-se outra evidência que apóia essa dedução em experimento em mudas de cafeeiro, com isolados usados neste estudo. As médias dos períodos de incubação e latente decresceram dos isolados do GPC-D para os do GPC-C e se estabilizaram até os do GPC-A. Obteve-se também tendência similar quanto à severidade (dados não publicados).

Com base nos resultados obtidos, comprovou-se haver variabilidade em isolados de *C. coffeicola* das três regiões estudadas quanto à produção de cercosporina, bem como a aplicabilidade deste marcador para avaliar a variabilidade em populações do patógeno.

Os isolados de maior produção, pouco prevalentes, estavam restritos ao Sul e Mata, enquanto os de produção intermediária e, principalmente, mais baixa, prevaleceram na população das três regiões. Dos níveis estudados, estimou-se maior percentagem da variação para isolado, o que indica não haver subdivisões da população do patógeno em MG quanto à produção de cercosporina. Conduzir-se-ão estudos para correlacionar a produção da toxina *in vitro* e *in vivo* a componentes de adaptabilidade como período de incubação e período latente. Espera-se que, com a análise de produção de cercosporina, estabeleça-se relação mais direta entre a variabilidade e suas implicações na intensidade da cercosporiose. Apesar da importância crescente de *C. coffeicola*, pouco se conhece sobre sua ecologia e biologia. Antecipa-se que, caracterizando-se a estrutura genética da população do patógeno em MG, gerem-se informações úteis no manejo da cercosporiose. Assim, poder-se-á racionalizar o uso de fungicidas (caso existam isolados resistentes na população) e orientar melhoristas quanto ao uso de isolados representativos da população na avaliação de resistência de cultivares ao patógeno.

#### **AGRADECIMENTOS**

O estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Ao Dr. A. Reis (CNPq- EMBRAPA), por disponibilizar os isolados testadores, e ao Dr. H. Teixeira (EPAMIG) e C. C. Nunes (North Carolina State University, Department of Plant Pathology), por intermediar o contato com os cafeicultores. Martins, R. B. agradece ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo para realização do Doutorado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. R., PIUGA, F. F., MARIN, S. R. R., BINNECK, E., SARTORI, F., COSTAMILAN, L. M., TEIXEIRA, M. R. O. & LOPES, M. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia Brasileira* 30:594-602. 2005.

BALIS, C. & PAYNE, M. G. Triblycirides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production. *Phytopathology* 61:1477-1484. 1971.

BILSKI, P., LI, M. Y., EHRENSHAFT, M., DAUB, M. E. & CHIGNELL, C. F. Vitamin B6 (Pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochemistry and Photobiology* 71:129-134. 2000.

BOLDINI, J. M., SOUZA, P. E., POZZA, E. A., CHALFOUN, S. M. & FARIA, M. A. Incidência e severidade da cercosporiose em café fertirrigado na região de Lavras-MG. *Anais, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG*. 2000. pp.273-275.

CALLAHAN, T. M., ROSE, M. S., MEADE, M. J., EHRENSHAFT, M. & UPCHURCH, R. G. *CFP*, the putative cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:901-910. 1999.

CALPOUZOS, L. & STALLKNECHT, G. F. Symptoms of cercospora leaf spot of sugar beets influenced by light intensity. *Phytopathology* 57:799-780. 1967.

CHOQUER, M., DEKKERS, K. L., CHEN, H.-Q., CAO, L. & UENG, P. P. The *CTB1* gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin biosynthesis and fungal virulence of *Cercospora nicotianae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:468-476. 2005.

CHUNG, K. R., DAUB, M. E., KUCHLER, K. & SHULLER, C. The *CRG1* gene required for resistance to singlet oxygen-generating cercosporin toxin in *Cercospora nicotianae* encodes a putative fungal transcription factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302:302-310. 2003.

CHUPP, C. A. *Monograph of the Fungus Genus Cercospora*. Ithaca, NY.: Published by autor. 1953.

CONAB. 2<sup>o</sup> Levantamento de café 2007/2008. Acessado em:23/03/2007. Online: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3BoletimCafe.pdf>. 2007

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

CRUZ, C. D. Programa Genes - Aplicativo computacional em estatística aplicada à genética. Viçosa, MG. Brasil: Universidade Federal de Viçosa 2001.

DAUB, M. E. Resistance of fungi to the photosensitizing toxin, cercosporin. *Phytopathology* 77:1515-1520. 1987.

DAUB, M. E. & CHUNG, K. R. Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. Acessado em:12/03/2007. Online: <http://www.apsnet.org/online/feature/Cercosporin/>. 2007

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

DAUB, M. E. & HANGARTER, R. P. Light induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiology* 73:855-857. 1983.

DAUB, M. E., HERRERO, S. & CHUNG, K. R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiology Letter* 252:197-206. 2005.

DHINGRA, O. D. & SINCLAIR, J. B. *Basic Plant Pathology Methods*: CRC Press. 1995.

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

FAZUOLI, L. C., MEDINA FILHO, H. P., GONÇALVES, W., GUERREIRO FILHO, O. & SILVAROLLA, M. B. Melhoramento do Cafeeiro: Variedades Tipo Arábica Obtidas no Instituto Agronômico de Campinas. In: Zambolim, L. (Ed.). *Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*. Viçosa. 2002. pp.163-212

FERNANDES, C. D. Efeito de fatores do ambiente e da concentração de inóculo sobre a cercosporiose do cafeeiro. Dissertação de Mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa. 1988.

FERRAZ, L. C. L., SOUZA, N. L., AMBROSANO, E. J. & ROSSI, F. Patógenos de plantas dentro de um sistema orgânico de cultivo tropical. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 14:181-218. 2006.

GODOY, C. V., BERGAMIN FILHO, A. & SALGADO, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. (Eds.). Manual de Fitopatologia. Vol.2. Doenças das Plantas Cultivadas. São Paulo-SP. Ceres. 1997. pp.184-200

GOODWIN, S. B. & DUNKLE, L. D. Cercosporin production in *Cercospora* and related anamorphs of *Mycosphaerella*. *Phytopathology* 96:139. 2006. (Abstract)

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* 91:648-658. 2001.

GRÜNWARD, N. J., GOODWIN, S. B., MILGROOM, M. G. & FRY, W. E. Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology* 93:738-746. 2003.

HARTMAN, P. E., DIXON, W. J., DAHL, T. A. & DAUB, M. E. Multiple modes of photodynamic action by cercosporin. *Photochemistry and Photobiology* 47:699-703. 1988.

ICO. Exports by exporting countries to all destinations. Acessado em:25/03/2007. Online: <http://www.ico.org/prices/m1.htm>. 2007a

ICO. Total production of exporting countries. Acessado em:23/05/2007. Online: <http://www.ico.org/prices/po.htm>. 2007b

JENNS, A. E., DAUB, M. E. & UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79:213-219. 1989.

JULIATTI, F. C., PEIXOTO, A. S., SANTOS, C. M. & TEODORO, R. E. F. Incidência e severidade de *Cercospora* sp. em café irrigado de Araguari-MG. Anais, I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG. 2000. pp.223-225.

KUYAMA, S. & TAMURA, T. Cercosporin. A pigment of *Cercospora Kikuchii*. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. *Journal of the American Chemical Society* 79:5725-5726. 1956a.

KUYAMA, S. & TAMURA, T. Cercosporin. A pigment of *Cercospora kikuchii*. II. Physical and chemical properties of cercosporin and its derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 79:5726-5729. 1956b.

MAPA. Balança do Agronegócio: Exportações Brasileiras. Acessado em:23/03/2007. Online: <http://www.agricultura.gov.br/>. 2007

SMITH, D. & ONIONS, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. Kew: Commonwealth Mycological Institute. 1983.

TAYLOR, T. V., MITCHELL, T. K. & DAUB, M. E. An oxidoreductase is involved in cercosporin degradation by the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*. Applied and Environmental Microbiology 72:6070-6078. 2006.

UPCHURCH, R. G., WALKER, D. C., ROLLINS, J. A., EHRENSHAFT, M. & DAUB, M. E. Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. Applied and Environmental Microbiology 57:2940-2945. 1991.

YAMAZAKI, S. & OGAWA, T. The chemistry and stereochemistry of cercosporin. Agricultural and Biology Chemistry 36:1707-1718. 1972.

YAMAZAKI, S., OKUBO, A., AKIYAMA, Y. & FUWA, K. Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from *Cercospora kikuchii*. Agricultural and Biology Chemistry 39:287-288. 1975.



**Tabela 2.** Estimativa de efeito e dos componentes de variância para região, sistema de cultivo dentro de região, lavoura dentro de sistema de cultivo, e isolado dentro de lavoura, para a produção de cercosporina *in vitro*.

<b>Fonte de variação</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>	<b>Componente de variância</b>	<b>Percentual da variância total (%)</b>
Região	3,78	0,1516	0,97042	1,91
Sistema de cultivo	0,22	0,8823	-2,5141	0
Lavoura	1,70	0,0842	3,9756	7,84
Isolado	8,11	<0,0001	24,827	48,94
Resíduo	-		20,955	41,31

**Figura 1** – **A**, isolado de *Cercospora coffeicola* mantido por 10 dias a 22°C e fotoperíodo de 12 h. Pigmentação vermelha na periferia da colônia evidencia acúmulo de cercosporina. Setas indicam discos de 4 mm de diâmetro retirados para estimar a concentração de cercosporina. **B**, extratos de cercosporina, em cada erlenmeyer há extrato obtido de três discos de crescimento micelial.

**Figura 2.** Grupos com Produção Similar de Cercosporina (GPC) caracterizados pela dissimilaridade entre isolados de *C. coffeicola* com base no índice de Mahalanobis. Dendrograma obtido pelo método UPGMA. Abaixo de cada GPC está o número de isolados/grupo e a produção média de cercosporina do grupo. Ao lado de cada GPC está uma foto de dois isolados representativos do grupo.

**Figura 3.** Distribuição e frequência (%) de grupos de isolados com produção de cercosporina similar (GPC) nos três níveis de amostragem: A, lavouras; B, sistemas de produção; e C, regiões do Estado de Minas Gerais, Brasil.

**Figura 4.** Médias de diâmetro de colônias de isolados de *Cercospora coffeicola* em relação às médias de produção de cercosporina ( $r = -0,57$ ,  $P = <0,0001$ ).

Figura 1.

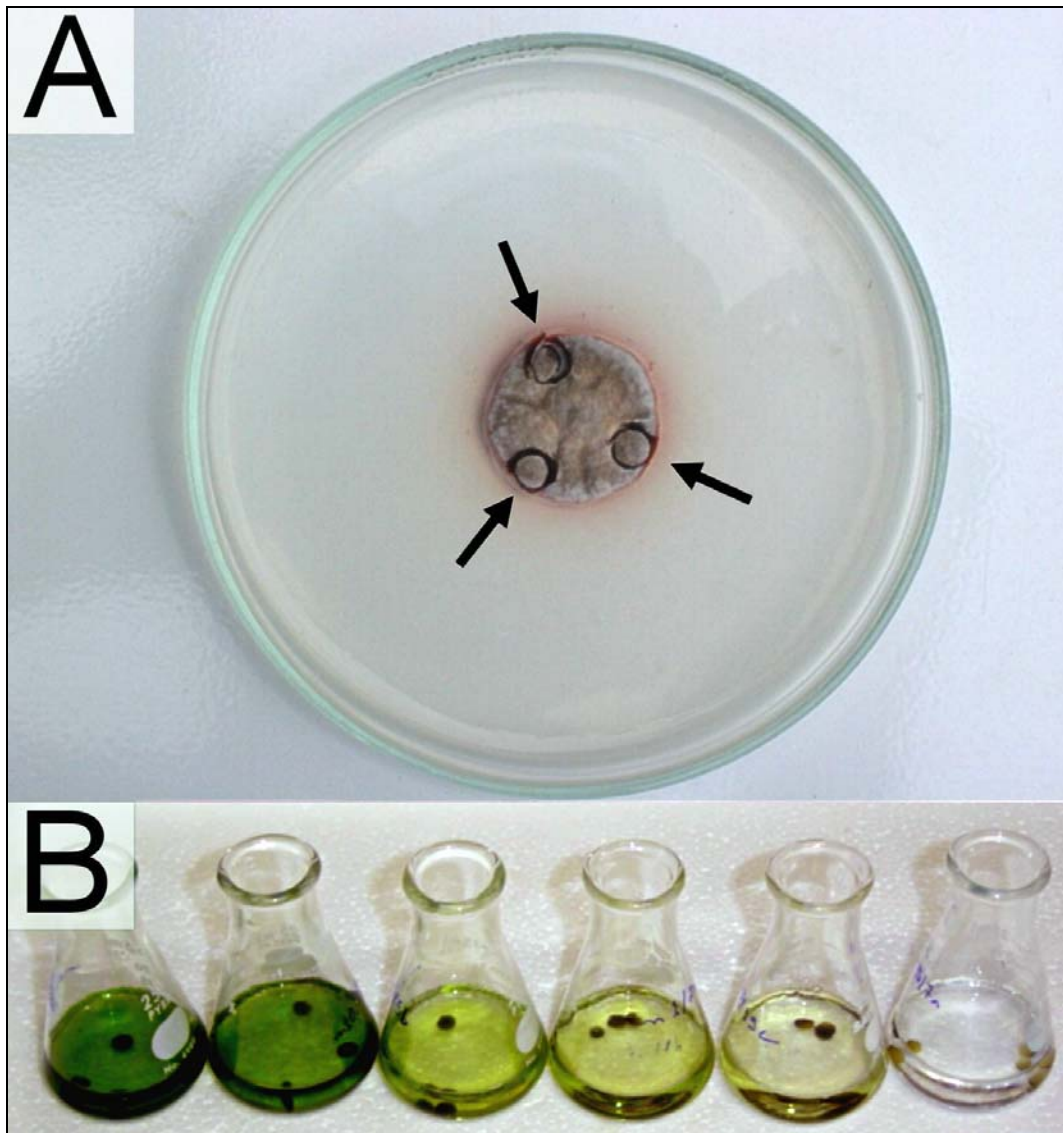


Figura2.

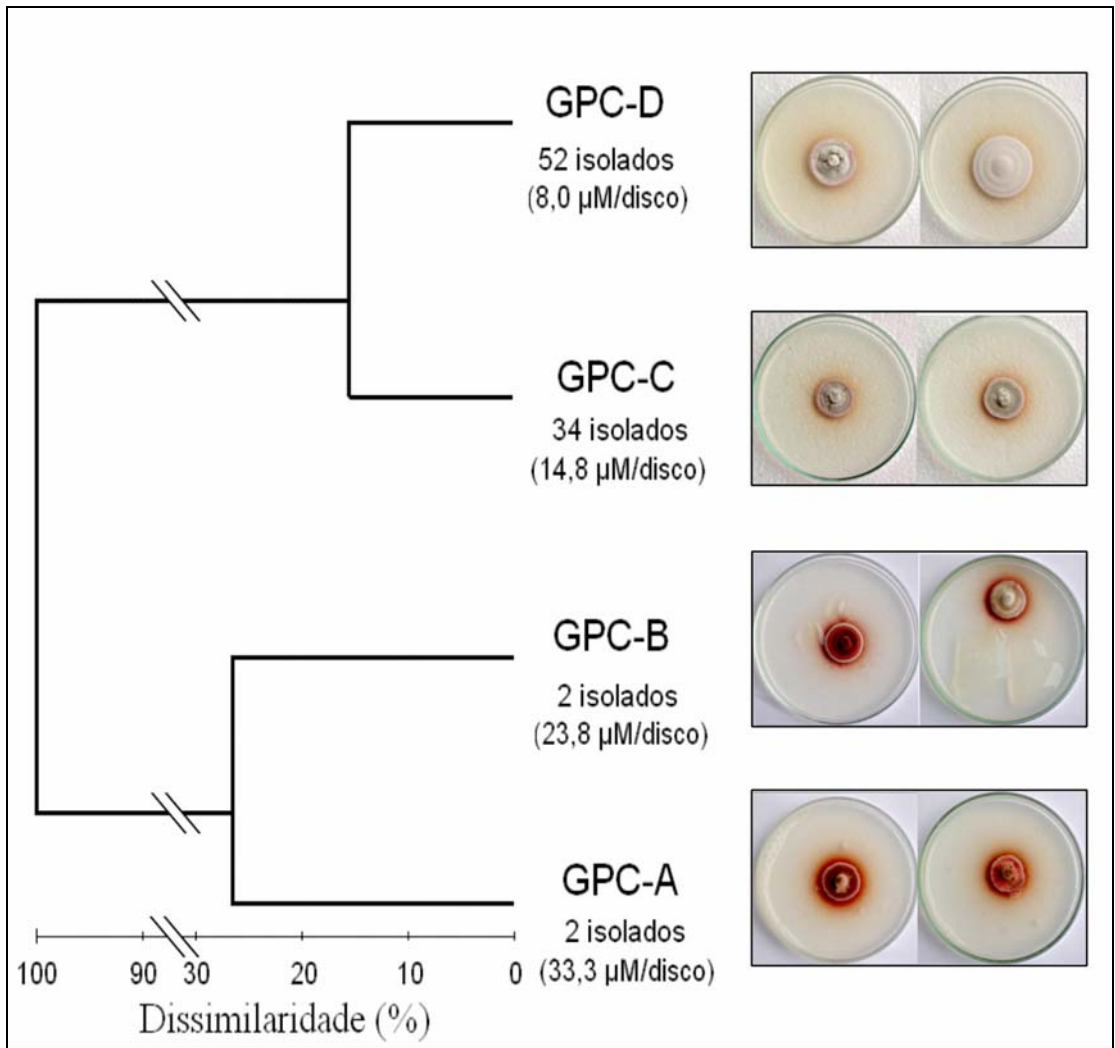


Figura 3.

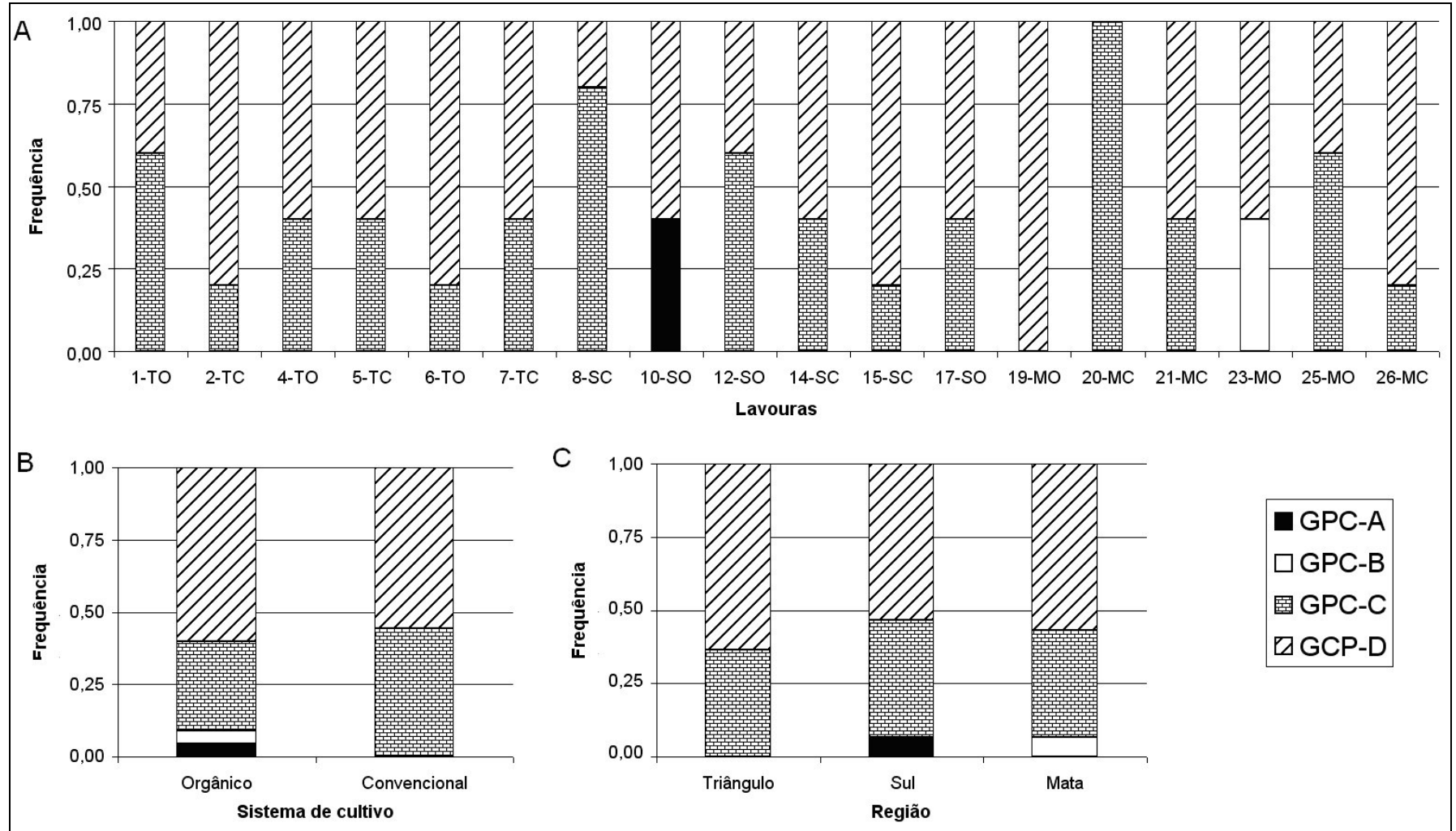
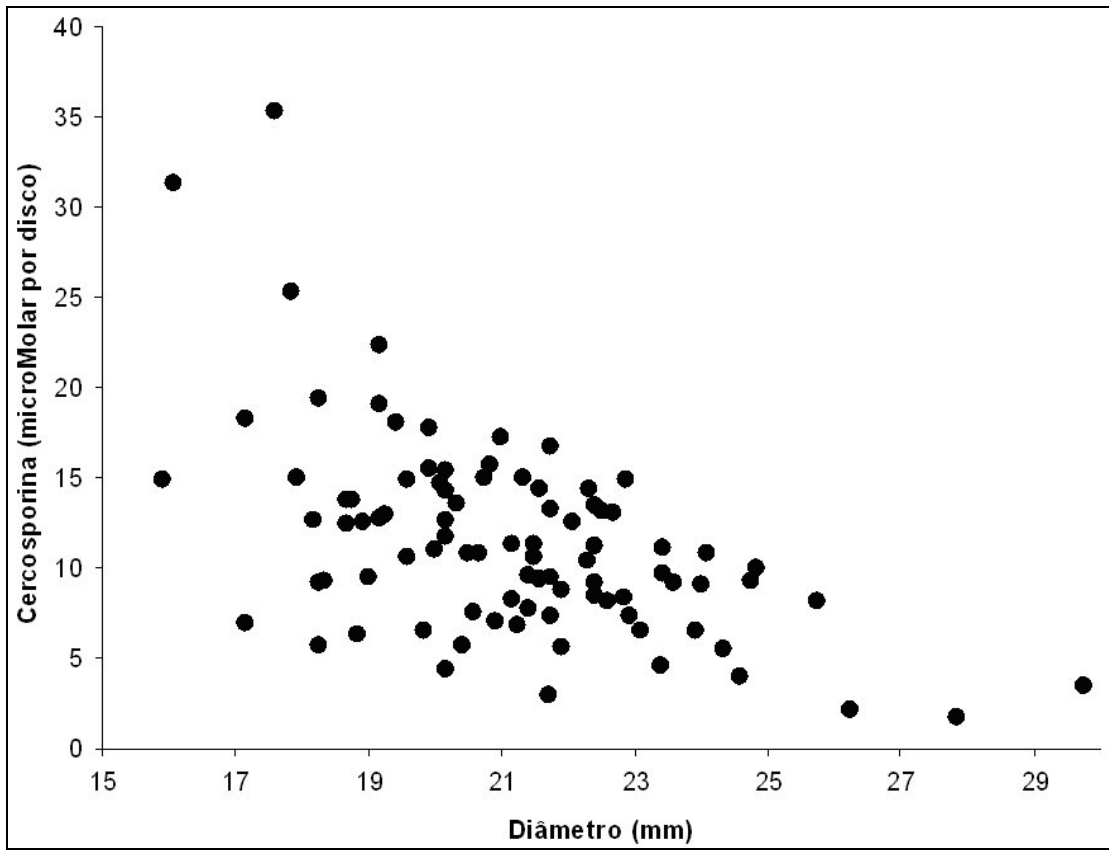


Figura 4.



## CONCLUSÕES GERAIS

É viável o uso de mutantes que não utilizam nitrato como fonte de nitrogênio (mutantes *nit*) em estudos de compatibilidade vegetativa de *C. coffeicola*.

A população de *C. coffeicola* em Minas Gerais tem alta variabilidade genética, em vista do elevado número de grupos de compatibilidade vegetativa e da variação entre isolados quanto à produção de cercosporina.

Região, sistema de cultivo e lavoura não afetam a variabilidade do patógeno, considerando os marcadores estudados. Para ambos, atribuiu-se maior percentagem da variação a diferença entre isolados.