Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Etiologia da cercosporiose do caquizeiro

Renan Fernandes Alves

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2019

Renan Fernandes Alves
Engenheiro Agrônomo

Etiologia da cercosporiose do caquizeiro

Orientador:
Prof. Dr. **MARCEL BELLATO SPÓSITO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Alves, Renan Fernandes

Etiologia da cercosporiose do caquizeiro / Renan Fernandes Alves. - - Piracicaba, 2019.

73 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Pseudocercopora* 2. *Diospyros kaki* 3. Patometria 4. Diversidade genética 5. Histopatologia I. Título

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente meus pais que sempre me incentivaram e me acolheram com compreensão e carinho.

Ao Professor Marcel Spósito pela orientação, paciência, compreensão, confiança e amizade por todos estes anos.

Aos meus amigos Fábio, Thiago, Isabela e Aline por todos esses anos de amizade, convívio e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Epidemiologia, Rafael, Meyri, Ricardo, Juliana, Barbara, Kelly, Josi, Antonio, André, Sílvia, Pamela, Evelyn e Juan pelo convívio e amizade.

À ESALQ pela estrutura que proporcionou adquirir conhecimento e desenvolver este trabalho.

A todos os professores, alunos e demais funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, que contribuiram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e Capes pela concessão da bolsa.

"Um verdadeiro mestre é um eterno aprendiz"

George Leonard

SUMÁRIO

RESUMO.....7
ABSTRACT 8
1. INTRODUÇÃO GERAL 9
Referências.....11
2. ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA CERCOSPORIOSE DO CAQUIZEIRO.....13
Resumo 13
Abstract.....13
2.1. Introdução.....14
2.2. Material e Métodos 15
2.2.1. Elaboração de escala diagramática para avaliação da severidade da cercosporiose.....15
2.2.2. Análises de dados.....16
2.3. Resultados.....17
2.4. Discussão 22
Referências.....24
3. FILOGENIA, MORFOLOGIA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS ASSOCIADOS À CERCOSPORIOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL 27
Resumo 27
Abstract.....27
3.1. Introdução.....28
3.2. Material e métodos 29
3.2.1. Coleta e preservação de isolados 29
3.2.2. Extração e purificação de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento 31
3.2.3. Análise filogenética 32
3.2.4. Diversidade intraespecífica 33
3.2.5. Caracterização morfológica.....33
3.2.6. Teste de patogenicidade 34
3.3. Resultados.....34
3.3.1. Caracterização molecular.....34

3.3.2. Caracterização morfológica 45
3.3.3. Teste de patogenicidade 48
3.4. Discussão 49
Referências 52
Apêndice 57
4. HISTOPATOLOGIA DA CERCOSPORIOSE EM FOLHAS DE CAQUIZEIROS .. 59
Resumo 59
Abstract 59
4.1. Introdução 60
4.2. Material e métodos 61
4.2.1. Avaliação do processo de pré-penetração do agente causal da cercosporiose por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folhas de caquizeiro 61
4.2.2. Histopatologia de infecção e colonização do agente causal da cercosporiose do caquizeiro 61
4.3. Resultados 63
4.3.1. Avaliação do processo de pré-penetração do agente causal da cercosporiose por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folhas de caquizeiro 63
4.3.2. Histopatologia de infecção e colonização do agente causal da cercosporiose do caquizeiro 65
4.4. Discussão 69
Referências 72

RESUMO

Etiologia da cercosporiose do caquizeiro

A cercosporiose é a principal doença foliar do caquizeiro no Brasil. A doença está distribuída entre as principais regiões produtoras do país e é responsável pela queda precoce das folhas e maturação antecipada dos frutos. Informações referentes a este patossistema são escassas na literatura. O objetivo deste trabalho foi (I) desenvolver e validar uma escala diagramática para avaliar a severidade da cercosporiose; (II) caracterizar isolados obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose de diferentes regiões do Brasil através de análises filogenéticas, morfologia e testes de patogenicidade; e (III) estudar os processos infecção e colonização de isolado patogênico causador de cercosporiose em folhas de caquizeiro. A escala diagramática desenvolvida compreende seis diagramas com severidade variando entre 0,5 e 17,3%. O uso da escala diagramática melhorou a acurácia, precisão, concordância e reprodutibilidade das estimativas conduzidas por 10 avaliadores, mostrando-se, portanto, eficiente para avaliação de cercosporiose de caquizeiros. Para a caracterização de 37 isolados obtidos em folhas de caquizeiros com cercosporiose, coletadas nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, foram analisadas as sequências do espaçador interno transcrito (ITS), actina (ACT) e fator de elongação 1-α (TEF). Alta diversidade genética foi observada entre os isolados coletados. A rede de haplótipos gerada a partir da análise dos três genes de forma concatenada resultou na formação de 10 haplótipos. As colônias apresentaram coloração predominantemente esverdeada, topografia levantada com bordos inteiro, ausência de esporos e crescimento lento. Quanto ao processo de infecção, a penetração do patógeno ocorreu através dos estômatos, mas não foi observado tropismo positivo em direção aos estômatos. No processo de colonização dos tecidos foliares, compostos fenólicos foram acumulados no tecido infectado, porém não foram capazes de conter o processo de colonização. Os testes histoquímicos também revelaram o acúmulo de pectina nas células da extensão da bainha foliar e a presença de compostos lipofílicos nas áreas lesionadas. Foram observadas vesículas nos espaços intercelulares em regiões com a presença de hifas do patógeno, que possivelmente estão envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro.

Palavras-chave: *Pseudocercospora*; Doença foliar; Fitopatometria; Filogenia, Histopatologia

ABSTRACT

Aetiology of persimmon angular leaf spot

Angular Leaf spot is the major foliar disease of persimmon in Brazil. The disease is widely spread among major producing areas in the country and is responsible for early defoliation and anticipated fuits ripening. Information about the pathosystem are limited. Therefore, this study aimed to (I) develop and validate a standard area diagram set (SADs) for assessing angular leaf spot severity; (II) characterize isolates obtained from persimmon leaves with angular leaf spot symptoms from different regions by means of phylogenetic analyses, morphological features and pathogenicity tests; and (III) study infecction and colonization process of pathogen isolate that caused angular leaf spot in persimmon leaves. The SADs developed comprises six colour diagrams with severity ranging from 0.5 to 17.3%. The use of the SADs improved the accuracy, precision, agreement and inter-rater reliability of the estimates conducted by 10 raters, showed to be adequate for estimates of angular leaf spot in persimmon. To characterize 37 isolates obtained from persimmon leaves with angular leaf spot, colleted from the states of São Paulo, Paraná and Rio Grade do Sul, were analysed internal transcribed spacer (ITS), actin (ACT) and elongation factor 1-α (TEF) sequences. High genetic variability was observed among collected isolates. The haplotype network generated from combined analyzed of ITS, ACT and TEF, showed 10 distinct haplotypes. Colonies showed predominantly greenish color, raised elevation with circular form, absence of spores and slow growth. In the infecction process, the germ tubes entered the leaf tissue through the stomata, but was not observed positive tropism to stomata. In the colonization process of foliar tissues, phenolic compounds were accumulated in the infected tissue; however, they did not prevent the colonisation progress. Histochemical studies showed accumulation of pectin in the bundle sheath extension cells and the presence of lipophilic compounds in the injured areas. Vesicles were observed in the intercellular spaces in regions with the presence of hyphae of the pathogen, that are possibly involved in the degradation of the host cell wall.

Keywords: *Pseudocercospora*; Foliar disease; Phytopathometry; Phylogeny; Histopathology

1. INTRODUÇÃO GERAL

O caquizeiro (*Diospyros kaki* L.) é originário da Ásia, mais precisamente da China, de onde foi levado para a Índia e Japão, sendo hoje cultivado em todo o mundo (MARTINS; PEREIRA, 1989). A cultura do caquizeiro foi introduzida no Brasil no final do século XIX, demonstrando grande potencial de expansão, dado a excelente adaptação às condições brasileiras (PENTEADO, 1986). Os frutos apresentam ótima aceitação no mercado interno, devido ao excelente sabor, boa aparência e elevada qualidade nutricional (MARTINS; PEREIRA, 1989).

O Brasil é o 4º produtor mundial de caqui, com uma produção de 182 mil toneladas (FAOSTAT, 2016). O estado de São Paulo responde por 58% da produção nacional e 46% da área cultivada, com aproximadamente 106 mil toneladas e 3,8 mil ha cultivados. Entre os principais municípios produtores do estado estão Mogi das Cruzes, Guararema e Jundiaí (IBGE, 2016).

As espécies de caqui mais utilizadas comercialmente são a *Diospyros kaki* como copa, para produção de frutos, e as espécies *D. virginiana* e *D. lotus* como porta-enxertos. As cultivares comerciais de caqui são divididas em três grupos de acordo com as características de seus frutos. O grupo ‘Sibugaki’ ou taninosos, que apresenta frutos de coloração amarelada e sabor adstringente quando maduros, em função do alto teor de tanino, independentemente da presença ou ausência de sementes. Os frutos desse grupo necessitam passar por um processo pós-colheita de destanização para o consumo. As principais cultivares do grupo dos taninosos são ‘Taubaté’, ‘Rubi’ e ‘Pomelo’. O grupo ‘Amagaki’ ou doce, o qual inclui variedades com frutos de polpa amarela e sem a presença de tanino quando maduros, independentemente da presença ou não de sementes. Os caquis doces não necessitam de destanização e apresentam boa conservação pós-colheita, o que favorece a exportação. As principais cultivares deste grupo são ‘Fuyu’, ‘Jiro’ e ‘Fuyuana’. E, por fim, o grupo Variável, o qual os frutos apresentam polpa amarela e taninosa quando sem sementes e polpa escura e não taninosa quando apresentam sementes. Quando as sementes são numerosas a polpa é de coloração escura, o que recebe, popularmente, o nome de “caqui chocolate”. As principais cultivares deste grupo são ‘Rama Forte’, ‘Giombo’ e ‘Kaoru’ (MOURA; TECHHIO; TEIXEIRA, 2014).

A cultura do caquizeiro é uma boa alternativa ao pequeno produtor, por apresentar diversas características que a torna bastante atrativa, podendo destacar a resistência dos frutos ao transporte, o sabor agradável do fruto, a alta produtividade e a rusticidade da planta (DANIELI et al., 2002).

As cultivares mais plantadas no Brasil variam dependendo das regiões do país. No estado de São Paulo prevalece as cultivares Taubaté, Rama Forte e Fuyu, enquanto que no Rio Grande do Sul, as cultivares mais produzidas são a Fuyu e Kioto. A variedade Fuyu é a mais importante no mercado internacional, sendo inclusive exportada pelo Brasil para a Europa (BRACKMANN et al., 2003).

O caquizeiro é uma planta bastante rústica e com poucos problemas fitossanitários. Entretanto, algumas doenças que afetam a cultura merecem maior atenção, dentre elas, podemos destacar a cercosporiose (*Pseudocercospora kaki*), a antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), a galha da coroa (*Agrobacterium tumefaciens*) e a podridão das raízes (*Rosellinia* sp) (PENTEADO, 1986). A cercosporiose tem sido considerada a principal doença foliar do caquizeiro em vários países produtores como Japão, Estados Unidos e Brasil (BASSANEZI et al., 2016)

A cercosporiose se caracteriza por apresentar manchas em ambas as faces das folhas. As manchas são delimitadas pelas nervuras, o que a torna com um aspecto angular, podendo ter de 1 a 8 mm de tamanho e são de coloração escura, pardo-avermelhada, com bordos bem definidos (BASSANEZI et al., 2016). Em áreas com alta severidade da doença, ocorre a queda prematura das folhas e a maturação precoce dos frutos. Devido a redução da área foliar precocemente, há uma redução no acúmulo de carboidratos no sistema radicular, que pode prejudicar a brotação, florescimento e, consequentemente, a produção do ano seguinte (Penteado, 1986). Entre as cultivares de caqui pode-se observar diferentes graus de resistência à cercosporiose. As cultivares Fuyu, Giro, Hatiya são bastante suscetíveis; as cultivares Rama-forte, Giombo e Luiz de Queiroz medianamente suscetíveis; e as cultivares Taubaté e Traço Cagui são tidas como resistentes (NAMEKATA; TOKESHI, 1964).

Apesar de ser considerada a principal doença foliar da cultura, existem poucos trabalhos na literatura, nacional e internacional relacionados a cercosporiose do caquizeiro. Informações relacionadas a etiologia do patógeno e ferramentas práticas que auxiliem na avaliação da severidade da doença ainda são escassas. A quantificação de doenças de plantas é uma das áreas mais importantes da

fitopatologia e fundamental para a realização de diversos trabalhos de pesquisa (JAMES, 1974), assim como o conhecimento das condições que favorecem o desenvolvimento do patógeno e das variáveis climáticas ótimas para infecção e desenvolvimento da doença são fundamentais para o estabelecimento de estratégias de controle.

Diante do exposto os objetivos deste trabalho foram: (I) desenvolver e validar uma escala diagramática para avaliar a severidade da cercosporiose; (II) caracterizar isolados obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose de diferentes regiões do Brasil através de análises filogenéticas, morfologia e testes de patogenicidade; e (III) estudar os processos infecção e colonização de isolado patogênico causador de cercosporiose em folhas de caquizeiro.

Referências

BASSANEZI, R. B. et al. Doenças do caquizeiro. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). . Manual de Fitopatologia. **Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. 5. ed. OURO FINO: CERES LTDA., 2016. p. 243–249.

BRACKMANN, A. et al. Aplicação de 1-MCP em caqui “quioto” armazenado sob refrigeração e atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 42–44, 2003.

DANIELI, R. et al. Efeito da aplicação de ácido giberélico e cloreto de cálcio no retardamento da colheita e na conservabilidade de caqui, Fuyu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 44–48, 2002.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Produção nos principais países produtores de caqui 2016**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 19 ago. 2018.

JAMES, W. C. Assessment of Plant Diseases and Losses. Annual Review of Phytopathology, v. 12, n. 1, p. 27–48, 1974.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal 2016**. Disponível em: < https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457> Acesso em: 19 ago. 2018

MARTINS, F. P.; PEREIRA, F. M. Cultura do caquizeiro. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1989.

MOURA, F. M.; TECHHIO, M. A.; TEIXEIRA, L. A. J. Caqui. In: AGUIAR, A. T. E. et al. (Eds.). . **Boletim 200: Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas.** 7. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2014. p. 116–120.

NAMEKATA, T.; TOKESHI, H. Controle da cercosporiose do caqui. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 21, p. 239–246, 1964.

PENTEADO, S. R. **Fruticultura de clima temperado em São Paulo**. Campinas: Campinas Fundação Cargill, 1986.

2. ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA CERCOSPORIOSE DO CAQUIZEIRO

Resumo

A cercosporiose é a principal doença foliar de caquizeiros, entretanto, não existem escalas diagramáticas para avaliar estudos epidemiológicos com essa doença, com o incremento da severidade ao longo do tempo ou comparar cultivares de caquizeiros quanto a suscetibilidade à doença. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma escala diagramática para a avaliação da cercosporiose do caquizeiro. A escala proposta possui seis níveis de severidade com incrementos logarítimicos variando entre 0,5 e 17,3%. Foram utilizados dez avaliadores para a validação da escala. Na primeira etapa, os avaliadores estimaram a severidade de 50 folhas com diferentes niveis de severidade sem a utilização da escala diagramática. Na segunda etapa, os avalidores estimaram as mesmas folhas porém com a utlização da escala diagramática. Pode-se observar que sem a utilização da escala, a maioria dos avaliadores superestimou os valores de severidade. Pela análise do coeficiente de correlação concordante de Lin foi possível observar que todos os avaliadores melhoraram as estimativas de severidade na segunda etapa de avaliação com a utilização da escala diagramática. O uso da escala diagramática melhorou a acurácia (Cb=0,99), precisão (r= 0,96), concordância (CCCL= 0,96) e reprodutibilidade (ICC= 0,79) em relação a avaliação sem o uso da escala (Cb=0,61; r=0,84; CCCL=0,52 e ICC=0,70). O desvio padrão foi reduzido para todas as variáveis analisadas com a utilização da escala. A escala proposta, portanto, mostrou ser uma ótima ferramenta para estudos envolvendo a necessidade de avaliação da severidade da cercosporiose, garantindo maior confiabilidade aos resultados, melhorando a acurácia, precisão e concordância dos avaliadores.

Palavras-chave: *Pseudocercospora*; Avaliação de doenças; Fitopatometria

Abstract

Angular leaf spot is the major foliar disease in persimmon, however, there are no standard area diagram set (SADs) to evaluate epidemiological studies with this disease, with increasing severity over time or comparing persimmon cultivars for susceptibility to the disease. The aim of this study was to develop a standard area diagram set diagrammatic scale to assess angular leaf spot on persimmon. The proposed SADs includes six level of severity with logarithmic intervals between 0,5 and 17,3%. The SADs were validated by ten raters. In the first assessment, the raters estimated 50 leaves with different levels of severity without using SADs. In the second assessment, the raters estimated the same leaves using the SADs. Without SADs, most raters overestimated the disease severity. Lin's concordance correlation analysis showed that all raters improved estimation of the disease severity in the second assessment using SADs. The SADs improved accuracy (Cb=0,99), precision (r= 0,96), agreement (CCCL= 0,96) and reliability (ICC= 0,79) regarding evaluations without SADs (Cb=0,61; r=0,84; CCCL=0,52 and ICC=0,70). The use of the SADs also reduced the standard deviation for all parameters analysed. The proposed

SADs is an important tool to perform studies with angular leaf spot on persimmons, ensuring better reliability to the results, because improved accuracy, precision and agreement of all raters.

Keywords: *Pseudocercospora*; Disease assessment; Phytopathometry

2.1. Introdução

O caquizeiro (*Diospyrus kaki*) é uma planta bastante rústica, entretanto algumas pragas e doenças são comuns a cultura nas condições climáticas das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Entre as doenças destaca-se a cercosporiose, sendo considerada a principal doença foliar do caquizeiro (BASSANEZI et al., 2016). A cercosporiose, cujo agente causal é o fungo *Pseudocercospora kaki*, é caracterizada pelo aparecimento de lesões angulares, em ambas as faces da folha, bem delimitadas pelas nervuras, de coloração escura a pardo-avermelhada, com tamanhos variados e distribuídas por todo limbo foliar. A cercosporiose é responsável pela desfolha precoce da planta, o que prejudica o acúmulo de carboidratos no sistema radicular e, consequentemente, a produção do ano seguinte (BASSANEZI et al., 2016; PIO; SCARPARE FILHO; MOURÃO FILHO, 2003). Mesmo sendo considerada uma doença importante do caquizeiro, poucos estudos com esse patossistema foram produzidos (NAMEKATA; TOKESHI, 1964).

A quantificação de doenças de plantas, também denominada fitopatometria, é uma das áreas mais importantes da fitopatologia (JAMES, 1974). A quantificação de doenças, geralmente determinada pela porcentagem de área infectada, é utilizada para diversos propósitos, como testar a eficácia de fungicidas, definir os níveis de resistência entre os cultivares, contribuir para a tomada de decisões no campo, associar a severidade da doença com a perda de produtividade, compreender os processos fundamentais da biologia, incluindo coevolução e realizar estudos epidemiológicos (BOCK et al., 2010; BOCK; HOTCHKISS; WOOD, 2016; DUARTE et al., 2013).

Para minimizar os erros decorrentes da quantificação de doenças de plantas, o método de avaliação utilizado deve fornecer resultados acurados e precisos (AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2011). A acurácia descreve o quão próximo ao real estão as estimativas de um dado avaliado. A precisão descreve a repetibilidade ou variações associadas com uma estimativa, desconsiderando a média do valor (GODOY et al., 1997). Devido à estimativa direta da área foliar

lesionada ser subjetiva, ocorrem variações quanto a precisão e acurácia (PARKER; SHAW; ROYLE, 1995). Portanto, a elaboração e utilização de métodos acurados e precisos na quantificação de doenças de plantas, são fundamentais para garantir confiabilidade aos resultados e credibilidades as conclusões.

Apesar da existência de ferramentas e softwares sofisticados que auxiliam na quantificação automática e semi-automática de doenças, as estimativas visuais continuam sendo o método mais comum utilizado na quantificação de doenças em estudos em ambientes controlados e no campo (DEL PONTE et al., 2017). Entre as estratégias de quantificação visual da severidade de doenças, destacam-se a utilização de escalas diagramáticas, que são representações ilustradas de uma série de plantas ou partes de plantas com sintomas em diferentes níveis de severidade (AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2011). As escalas diagramáticas têm-se constituído na principal ferramenta de avaliação de severidade para muitas doenças. As escalas diagramáticas elaboradas devem ser de fácil utilização, aplicáveis a diferentes condições, permitirem avaliação imediata, apresentarem resultados reprodutíveis e possuir intervalos suficientes para representar todos os estádios de desenvolvimento da doença.

Apesar da importância da cercosporiose na cultura do caqui, ainda não há nenhuma escala desenvolvida para esse patossistema. Portanto, o objetivo deste trabalho foi elaborar e validar uma escala diagramática para a cercosporiose do caquizeiro, a qual servirá como uma ferramenta na quantificação da severidade da doença.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Elaboração de escala diagramática para avaliação da severidade da cercosporiose

Para o desenvolvimento da escala diagramática, foram coletadas 50 folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose com diferentes níveis de severidade na cidade de Piracicaba, SP. A face abaxial de cada folha foi fotografada com o auxílio de uma câmera digital C-2020 Zoom Digital Câmera (Olympus). As imagens digitalizadas foram transferidas para um computador e, posteriormente, para cada folha, foi determinada a proporção de área doente utilizando o software IMAGEJ

(SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Os níveis mínimo e máximo de severidade foram determinados de acordo com a maior frequência observada nas folhas coletadas, os quais refletem a intensidade da doença no campo. Os níveis intermediários da escala foram determinados matematicamente, seguindo incrementos logarítmicos (NUTTER JR., F.W., TENG, P.S., SHOKES, 1991).

Na validação da escala, 50 imagens de folhas sintomáticas, com diferentes níveis de severidade, foram analisadas por 10 avaliadores através de imagens individuais de Microsoft Power Point. Os avaliadores estimaram a severidade da doença, em um primeiro momento sem a escala diagramática e, após uma semana, com o auxílio de uma cópia colorida da escala diagramática.

2.2.2. Análises de dados

A partir dos dados obtidos de cada avaliador, a acurácia, precisão e concordância foram determinadas com e sem a utilização da escala. A precisão foi calculada usando o coeficiente de correlação (r) entre a severidade real (x) e a severidade estimada (y), em que 1 representa a correlação perfeita. A acurácia foi determinada usando o coeficiente de bias (Cb), que determina o quão longe a linha de regressão desvia da linha concordante de 45°, em que 1 representa a perfeita correlação entre x e y. O Cb foi calculado baseado na variável u e μ, em que a variável u mede a diferença de inclinação da reta, em que 1 indica a mesma inclinação, e μ mede a diferença entre alturas de linhas, onde 0 corresponde a mesma alturas, entre a linha ajustada de y e a linha de concordante de x (YADAV et al., 2013). O coeficiente de correlação concordante de Lin (CCCL, ρc) foi utilizado para determinar a concordância, sendo a combinação entre precisão e acurácia; $\rho c = r \times Cb$, em que 1 indica a perfeita concordância entre x e y (LIN, 1989).

A confiabilidade entre avaliadores das estimativas foi determinada utilizando o coeficiente de determinação (R^2) obtido a partir da regressão linear entre a severidade estimada de todos os pares de avaliadores (NUTTER; SCHULTZ, 1995). A confiabilidade interavaliadores foi também calculada usando o coeficiente de correlação intraclasse (Intraclass correlation coefficient - ICC), o qual é baseado na variância estimada para todos os avaliadores combinada (sem e com o uso da escala diagramática) usando o modelo de análise de variância de dupla classificação e efeitos aleatórios (ANOVA) (NITA; ELLIS; MADDEN, 2003). O teste de

equivalência foi realizado pelo cálculo da diferença dos valores de cada variável (r, Cb, υ, μ, ρc e R^2) com e sem o uso da escala, para cada avaliador em análise. O teste de equivalência é utilizado para calcular o intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade para cada variável por bootstrapping usando o método do percentil (YADAV et al., 2013). Se o IC para uma determinada variável não incluir o valor zero, a diferença é significativa (P = 0,05), ou seja, prova-se que o uso da escala diagramática melhora significativamente a variável em análise, baseado nas estimativas de todos avaliados. Na análise, 10000 amostras de bootstrap foram utilizadas. A função epi.ccc no pacote epiR (STEVENSON et al., 2017) foi utilizada no cálculo do LCCC. O ICC foi determinado usando a função icc no pacote irr (GAMER et al., 2012). Todas as análises estatísticas foram calculadas utilizando o software 'R' v. 3.4.1 (TEAM, 2015).

2.3. Resultados

A escala diagramática elaborada para a cercosporiose do caquizeiro seguiu incrementos logarítmicos representando os níveis de severidade de 0,5, 1, 2,2, 4,5, 9 e 17,3%, com a escala na versão colorida (Figura 1). Os diferentes níveis representam a área lesionada do tecido foliar, caracterizada por manchas necróticas angulares bem delimitadas. Tais níveis de severidade podem ser normalmente encontrados em plantas naturalmente infectadas no campo.

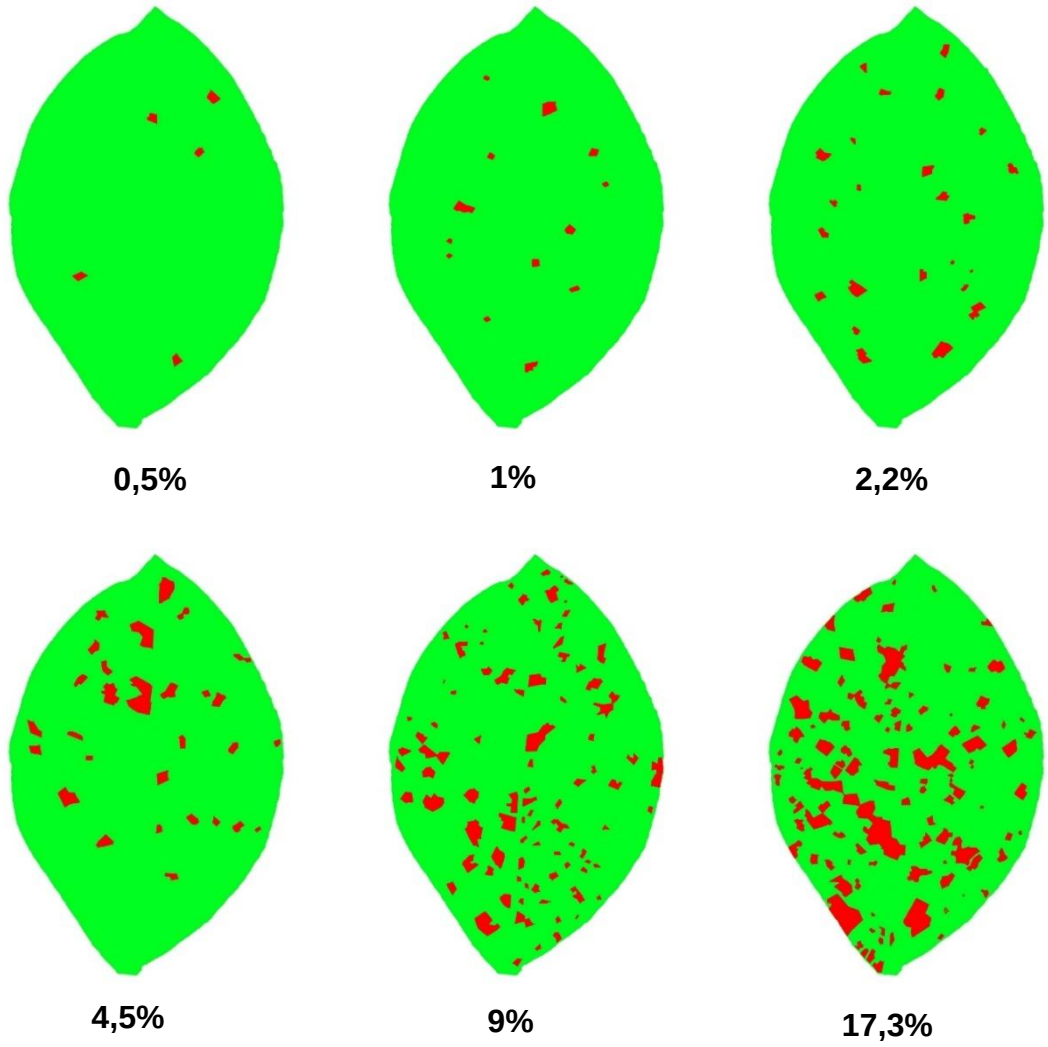

Figura 1. Escala diagramática colorida elaborada para avaliação da severidade da cercosporiose do caquizeiro.

Com a utilização da escala diagramática, a linha de regressão resultante das estimativas da severidade da doença, se aproximou mais da linha concordante 45°, quando comparada com a linha de regressão resultante das estimativas sem escala (Figura 2). Além disto, foi observado melhora na precisão com a redução dos erros absolutos (severidade estimada menos severidade real). Sem a utilização da escala os erros variaram de -9,9 a 67,2, porém, com a utilização da escala, os erros variaram de -10,4 a 6,6. Os erros absolutos foram predominantemente positivos (81,4%) sem a utilização da escala, indicando que os valores da severidade foram superestimados, entretanto, com a utilização da escala, a maior parcela dos erros (58,2%) foi negativa.

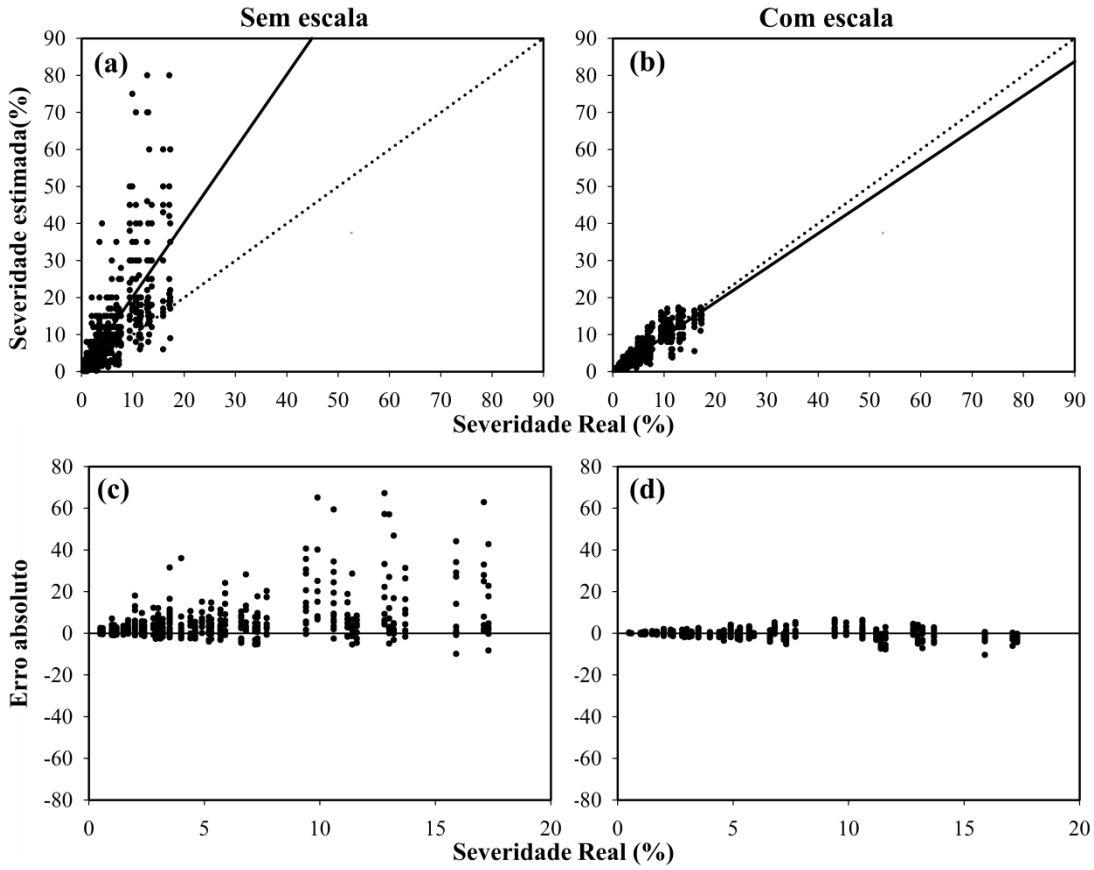

Figura 2. Relação entre a severidade real e estimada da cercosporiose em folhas de caquizeiro avaliada em 50 folhas por 10 avaliadores com (a) e sem (b) a utilização da escala diagramática. A linha sólida representa a linha de melhor ajuste, enquanto que a linha pontilhada é a linha de concordância e representa a perfeita concordância entre a severidade real e estimada (inclinação 1 e intercepto 0). Erro absoluto (severidade estimada menos severidade real) da cercosporiose estimado sem (c) e com (d) o uso da escala diagramática através dos mesmos avaliadores. Baixos valores de erro absoluto indicam que a estimativa da severidade foi mais acurada.

Para todos os avaliadores, a variável u se aproximou mais de 1 e a variável μ de 0 (Figura 3). Analisando os avaliadores individualmente, pela variável μ, percebe-se que somente o avaliador 5 subestimou os valores de severidade sem a escala (μ<0), os demais avaliadores superestimaram os valores de severidade (μ>0). Pode-se observar melhoras significativas na acurácia, Cb=0,99 e 0,61 com e sem escala, respectivamente, na precisão, r= 0,96 e 0,84 com e sem escala, respectivamente, e na concordância, CCCL= 0,96 e 0,52 com e sem escala, respectivamente. O desvio padrão foi reduzido para todas as variáveis analisadas com a utilização da escala.

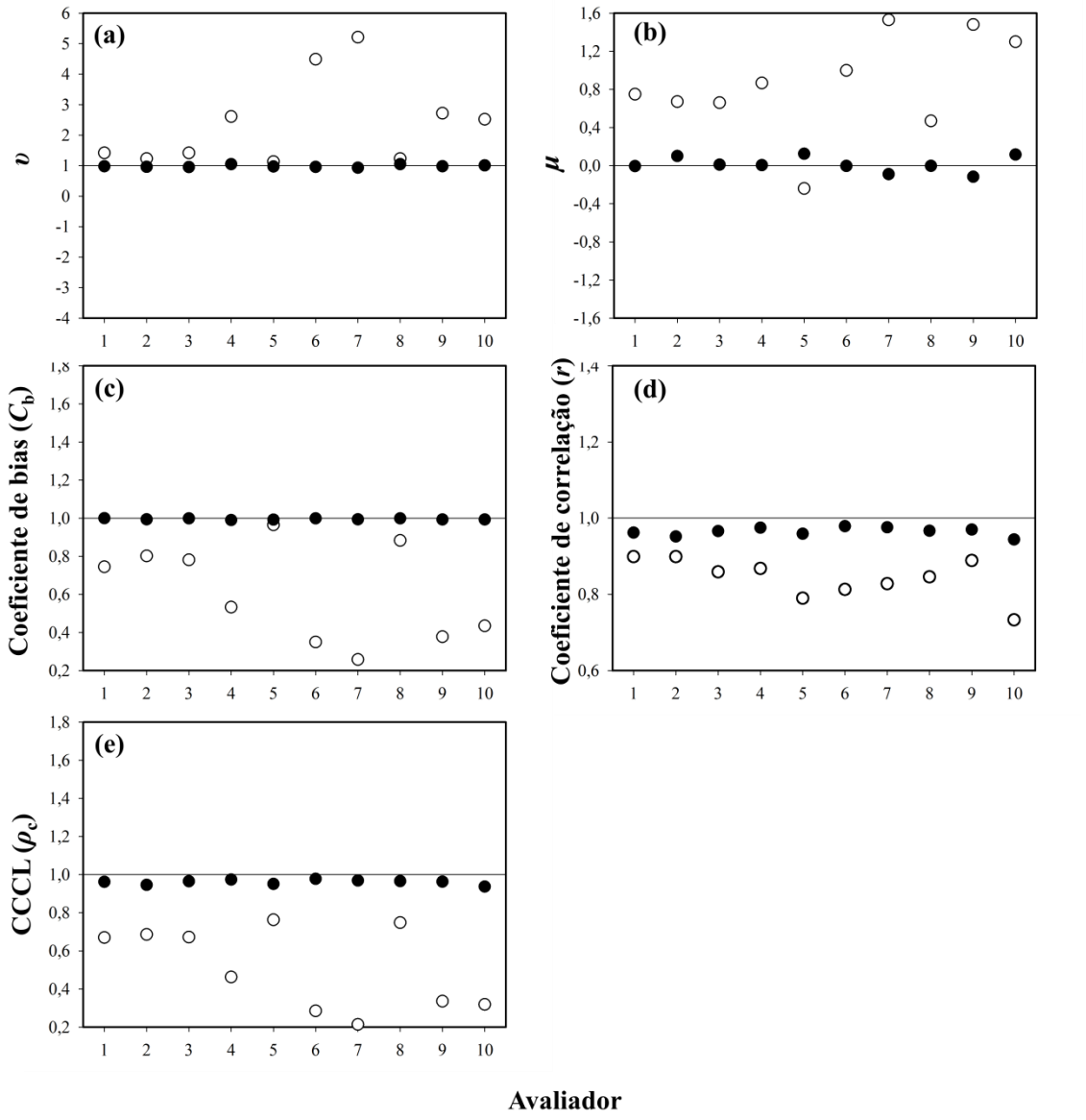

Figura 3. Variável υ (a), Variável μ (b), Coeficiente de bias (Cb) (c), Coeficiente de correlação de Pearson (r) (d) e Coeficiente de concordância de Lin - CCCL (ρc) (e) da estimativa da severidade da cercosporiose por 10 avaliadores sem (círculos brancos) e com (círculos pretos) o uso da escala diagramática. A concordância perfeita entre a severidade real (x) e a severidade estimada (y) ocorre quando υ = 1, μ = 0, Cb = 1, r = 1 e ρc = 1.

Tabela 1. Acurácia, precisão e concordância relacionada a estimativa da severidade da cercosporiose em folhas de caquizeiro por 10 avaliadores com e sem o uso da escala diagramática.

Variável	Médias[a]		Diferença entre médias	95% IC de diferença[b]
	Sem escala	Com escala		
υ[c]	2,398 (1,441)	0,985 (0,040)	-1,413	-2,309 a -0,616
μ[d]	0,849 (0,526)	0,014 (0,081)	-0,835	-1,2280 a -0,5929
*C*b[e]	0,613 (0,251)	0,995 (0,004)	0,382	0,2265 a 0,5228
r[f]	0,842 (0,053)	0,965 (0,011)	0,123	0,0391 a 0,1072
CCCL[g]	0,516 (0,214)	0,961 (0,013)	0,446	0,2580 a 0,5124

[a]Desvio padrão em parênteses
[b]Intervalo de confiança (IC) foi baseado em 10000 amostras de bootstrap. Se IC incluir zero, não há diferença significativa entre as médias (P< 0,05).
[c]Variável υ [1= perfeita relação entre a severidade real (x) e a severidade estima (y)]
[d]Variável μ (0=relação perfeita entre x e y)
[e]Coeficiente de bias (*C*b) medida do quão distante a linha de melhor ajuste desvia da linha de concordância (1=perfeita relação entre x e y). *C*b é uma medida de acurácia que foi calculada baseado em υ e μ
[f]Coeficiente de correlação de Pearson mede a precisão (1=perfeita correlação entre x e y).
[g]Coeficiente de correlação concordante de Lin (CCCL) combina as medidas de precisão (r) e acurácia (C_b) para medir a concordância (1=perfeita concordância entre x e y)

A utilização da escala diagramática melhorou a confiabilidade entre avaliadores e o coeficiente de correlação intraclasse (CCI). Com a utilização da escala 2,22, 46,67 e 51,1%, dos pares de comparação, tiveram R^2 entre 0,6-0,69, 0,7-0,79 e 0,8-0,89, respectivamente. Porém, sem a utilização da escala a frequência do coeficiente de determinação concentrou-se em intervalos menores, com 17,78, 22,22, 46,67 e 13,33% nos intervalos de 0,5-0,59, 0,6-0,69, 0,7-0,79 e 0,8-0,89, respectivamente (Figura 4).

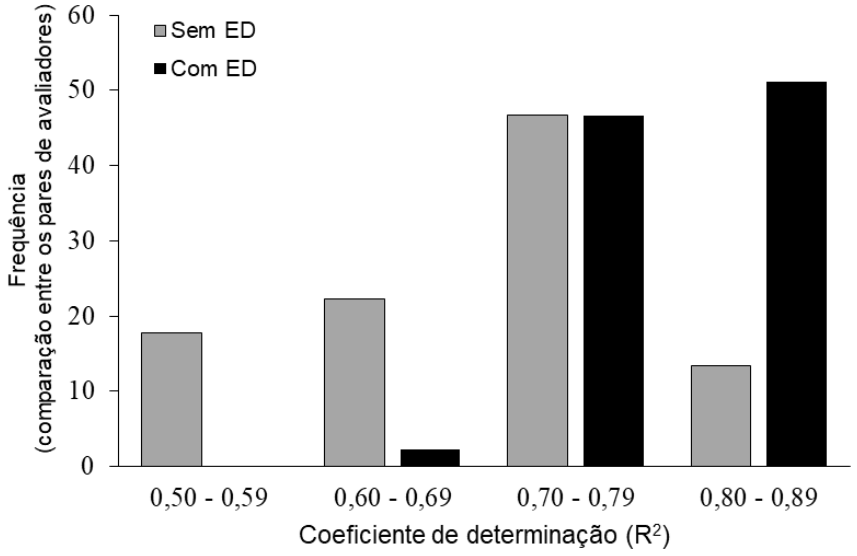

Figura 4. Confiabilidade entre avaliadores de dez avaliadores realizada através do coeficiente de determinação (R^2), com e sem a utilização da escala diagramática

A média do coeficiente de determinação entre avaliadores foi significativamente superior com a utilização da escala, passando de 0,7 para 0,79 (Tabela 2). O coeficiente de correlação intraclasse foi de 0,53 e 0,87 com e sem a escala, respectivamente.

Tabela 2. Média do coeficiente de determinação entre avaliadores

Estatística	Sem escala	Com escala	95% IC[a]
Média do coeficiente de determinação entre avaliadores	0,70 (0,09)	0,79 (0,05)	0,06 , 0,12

[a]Intervalo de confiança (IC) foi baseado em 10.000 amostras de bootstrap. Se IC não incluir zero, a diferença das médias é significativa (P<0,05).

2.4. Discussão

A escala diagramática para a severidade da cercosporiose do caquizeiro, desenvolvida nesse trabalho, foi a primeira escala elaborada e validade para avaliação de doenças do caquizeiro no Brasil.

A escala proposta seguiu incrementos logarítmicos com seis níveis de severidade na versão colorida. A utilização de seis níveis de severidade foi o suficiente para melhorar a acurácia e precisão de todos os avaliadores. O número de níveis de severidade utilizados neste estudo foi semelhante ao de outros patossistemas com doenças que apresentam como sintomas lesões foliares angulares com regiões bem delimitadas (ZABALA et al., 2017). Não existe um consenso do número de níveis ideal para a utilização na escala diagramática, por diversos motivos, entre eles, características dos avaliadores, severidade máxima observada e padrão dos sintomas. Del Ponte et al. (2017), recomenda a utilização de seis a dez níveis de severidades espaçados no máximo a 15%, não ultrapassando este limite e, ainda, segundo o autor, devem ser incluídos dois níveis de severidade entre 0 e 10%, considerando a tendência dos avaliadores em superestimar valores presentes nesta faixa de severidade, principalmente se as lesões forem numerosas e pequenas. Poucos níveis de severidade podem resultar no desenvolvimento de uma escala inacurada. Em contrapartida, a utilização de diversos níveis de severidade reduz a velocidade de determinação das estimativas, o que dificulta a avaliação de quantidades elevadas de plantas em campo (BOCK; HOTCHKISS; WOOD, 2016).

A quantificação da cercosporiose apresentou valores bem reduzidos de acurácia e precisão na avaliação sem escalas, inferiores ao observado em outros estudos (DOLINSKI et al., 2017; NICOLI et al., 2015; NUÑEZ et al., 2017). Basicamente, estes valores reduzidos podem ser justificados pela baixa severidade da doença e pelo reduzido tamanho e elevada quantidade de lesões. Na quantificação de doenças, podem ocorrer dois tipos de erros dos avaliadores. O primeiro está relacionado a área ocupada pelas lesões, sendo normalmente quantificadas com valores superiores ao valor real, o que induz a superestimação dos valores. Quanto menor a severidade da doença maior tende a ser o valor estimado em relação ao valor real. O segundo tipo de erro se refere a percepção de tamanho e quantidade de lesões. Ao se avaliar duas folhas com níveis de severidade semelhantes, a folha que possuir o maior número de lesões tende a apresentar a maior estimativa de severidade (SHERWOOD et al., 1983).

Para a escala diagramática proposta para a cercosporiose, o seu uso reduziu o erro absoluto de todos os avaliadores. De acordo com o critério para avaliar escalas, baseado no erro absoluto, valores inferiores a ± 5% são considerados excelentes, enquanto que valores inferiores a ±10% são considerados bons (NUTTER; SCHULTZ, 1995). Sem a utilização da escala, 63% dos valores se situaram na faixa de ± 5%, porém, com a utilização da escala, este valor aumentou para 96%.

A maior parte dos avaliadores (90%) superestimaram os valores de severidade da doença sem a utilização da escala, entretanto, com a utilização da escala, 50% dos avaliadores subestimaram os valores de severidade. Este comportamento tem sido observado em vários outros estudos envolvendo validação de escalas diagramáticas (DEBONA et al., 2015; DOLINSKI et al., 2017; DUARTE et al., 2013).

Confiabilidade entre avaliadores é a capacidade de um avaliador individual obter o resultado próximo ou igual a outro avaliador na estimativa da severidade de uma mesma folha (BOCK; HOTCHKISS; WOOD, 2016). A utilização da escala aumentou a precisão na estimativa da severidade da doença entre os avaliadores, pois os coeficientes de determinação entre avaliadores foram significativamente diferentes entre si. Do ponto de vista prático, a utilização da escala diagramática aumentou a reprodutibilidade das estimativas obtidas por diferentes avaliadores e,

assim, a estimativa da severidade da doença pode ser executada por qualquer avaliador.

A escala logarítmica proposta melhorou a acurácia, precisão e confiabilidade de todos os avaliadores, possibilitando a sua utilização em estudos de resistência de cultivares, estudos epidemiológicos e de métodos de controle, nos quais a estimativa da severidade da doença se torna necessária.

Referências

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Fenologia, Patometria e Quantificação de danos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). . Manual de Fitopatologia. **Volume 1: Princípios e Conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 517–542.

BASSANEZI, R. B. et al. Doenças do caquizeiro. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). . Manual de Fitopatologia. **Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. 5. ed. OURO FINO: CERES LTDA., 2016. p. 243–249.

BOCK, C. H. et al. Plant Disease Severity Estimated Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 2, p. 59–107, 10 mar. 2010.

BOCK, C. H.; HOTCHKISS, M. W.; WOOD, B. W. Assessing disease severity: accuracy and reliability of rater estimates in relation to number of diagrams in a standard area diagram set. **Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 261–272, 2016.

BRACKMANN, A. et al. Aplicação de 1-MCP em caqui “quioto” armazenado sob refrigeração e atmosfera controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 42–44, 2003.

DANIELI, R. et al. Efeito da aplicação de ácido giberélico e cloreto de cálcio no retardamento da colheita e na conservabilidade de caqui Fuyu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 44–48, 2002.

DEBONA, D. et al. A set of standard area diagrams to assess severity of frogeye leaf spot on soybean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, n. 3, p. 603–614, 2015.

DEL PONTE, E. M. et al. Standard Area Diagrams for Aiding Severity Estimation: Scientometrics, Pathosystems, and Methodological Trends in the Last 25 Years. **Phytopathology**, v. 107, n. 10, p. 1161–1174, 2017.

DOLINSKI, M. A. et al. Development and validation of a standard area diagram set for assessment of peach rust. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 4, p. 817–824, 2017.

DUARTE, H. S. S. et al. Development and validation of a set of standard area diagrams to estimate severity of potato early blight. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 2, p. 249–257, 2013.

GAMER, M. et al. irr: Various coefficients of interrater reliability and agreement. R package version 0.84., 2012. Disponível em: <http://www.r-project.org>. Acesso em: 2 ago. 2018

GODOY, C. V et al. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation Diagrammatische Bonitурskalen fúr Bohnenkrankheiten: Entwicklung und Validation. Zeitschrift für Pflanzenkrankheken und Pílanzenschutz **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 104, n. 4, p. 336–345, 1997.

JAMES, W. C. Assessment of Plant Diseases and Losses. Annual Review of **Phytopathology**, v. 12, n. 1, p. 27–48, 1974.

LIN, L. I.-K. A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility. **Biometrics**, v. 45, n. 1, p. 255, 1989.

MARTINS, F. P.; PEREIRA, F. M. **Cultura do caquizeiro**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1989.

MOURA, F. M.; TECHHIO, M. A.; TEIXEIRA, L. A. J. Caqui. In: AGUIAR, A. T. E. et al. (Eds.). . **Boletim 200: Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 7. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2014. p. 116–120.

NAMEKATA, T.; TOKESHI, H. Controle da cercosporiose do caqui. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 21, p. 239–246, 1964.

NICOLI, A. et al. Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose do colmo do milho. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1720–1726, 2015.

NITA, M.; ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V. Reliability and Accuracy of Visual Estimation of Phomopsis Leaf Blight of Strawberry. **Phytopathology**, v. 93, n. 8, p. 995–1005, 2003.

NUÑEZ, A. M. P. et al. Development and Validation of a Diagrammatic Scale to Assess the Severity of Black Rot of Crucifers in Kale. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 3, p. 195–203, 2017.

NUTTER, F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, n. 2, p. 174–184, 1995.

NUTTER JR., F.W., TENG, P.S., SHOKES, F. M. Disease assessment terms and concepts. **Plant disease**, v. 75, p. 1187–1188, 1991.

PARKER, S. R.; SHAW, M. W.; ROYLE, D. J. The reliability of visual estimates of disease severity on cereal leaves. **Plant Pathology**, v. 44, n. 5, p. 856–864, 1 out. 1995.

PENTEADO, S. R. **Fruticultura de clima temperado em São Paulo**. Campinas: Campinas Fundação Cargill, 1986.

PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A. **A cultura do caquizeiro**. 1. ed. Piracicaba: Piracicaba ESALQ-Divisão de Biblioteca e Documentação, 2003.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SHERWOOD, R. T. et al. Illusions in Visual Assessment of Stagonospora Leaf Spot of Orchardgrass. **Phytopatology**, v. 73, n. 2, p. 173–177, 1983.

STEVENSON, M. et al. **epiR: Tools for the analysis of epidemiological data. R package version 0.9-87**. Disponível em: <http://www.r-project.org>. Acesso em: 1 set. 2018.

TEAM, R. C. **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/Http://www.R-Project.Org/, 2015.

YADAV, N. V. S. et al. Development and validation of standard area diagrams to aid assessment of pecan scab symptoms on fruit. **Plant Pathology**, v. 62, n. 2, p. 325–335, 2013.

ZABALA, N. R. et al. *Xanthomonas fragariae* Genetic variability and its severity on strawberry genotypes (*Fragaria ananassa* Duch). **AGROCIENCIA**, v. 55, n. 3, p. 329–341, 2017.

3. FILOGENIA, MORFOLOGIA E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS ASSOCIADOS À CERCOSPORIOSE DO CAQUIZEIRO NO BRASIL

Resumo

A cercosporiose é a principal doença foliar do caquizeiro no Brasil. A doença está distribuída entre as principais regiões produtoras do país e é responsável pela queda precoce das folhas e maturação antecipada dos frutos. Na literatura, a doença é atribuída ao fungo *Pseudocercospora kaki*, entretanto nenhum estudo de caracterização de isolados brasileiros, relacionados a cercosporiose do caquizeiro, foi desenvolvido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados monospóricos obtidos de diversas regiões brasileiras por meio de análise filogenética, caracterização morfológica e testes de patogenicidades. A relação filogenética entre os 37 isolados coletados foi determinada baseada no conjunto de dados obtidos a partir do sequenciamento das regiões ITS, TEF e ACT. A diversidade genética intraespecífica foi analisada por meio da construção de uma rede de haplótipos para cada gene e de forma concatenada. A concatenação dos três genes permitiu uma melhor separação das espécies agrupando todos os isolados em um único clado. Nenhum isolado obtido foi geneticamente semelhante, quando analisado os genes de forma concatenada, ao isolado de referência de *Pseudocercospora kaki* depositado no banco de dados do GenBank. A análise da rede de haplótipos resultou na formação de 10 haplótipos distintos, evidenciando a variabilidade genética entre os isolados e sugerindo a presença de mais de uma espécie associada a cercosporiose do caquizeiro. Foram observados três grupos principais de haplótipos englobando um total de 23 isolados. As colônias apresentaram crescimento lento, ausência de esporulação e, predominantemente, coloração esverdeada e topografia levantada com bordos inteiro. Os conídios apresentaram-se septados, oliváceos, obcláveo, frequentemente curvados e raramente cilíndricos, com tamanho médio de 71,5 ± 21,68 x 3,71 ± 0,68 µm. Todos os isolados brasileiros inoculados foram patogênicos em folhas de caquizeiros ‘Fuyu’.

Palavras-chave: *Pseudocercospora*; Variabilidade genética; Patogenicidade

Abstract

Angular Leaf spot is the major foliar disease of persimmon in Brazil. The disease is widely distributed among major producing areas in the country and is responsible for early defoliation and anticipated fruits ripening. Originally, the disease was associated with the fungi *Pseudocercospora kaki*, however no study was development about characterization of brazilians isolates related of angular leaf spot in persimmon. Therefore, the aim of this study was to characterize monosporic isolates obtained from different regions in Brazil by means of phylogenetic analysis, morphological features and pathogenicity tests. Phylogenetic relationships among 37 isolates were determined based on a dataset of ITS, TEF, ACT sequences. The intraspecific genetic diversity of the isolates was analyzed by building a network of haplotypes. The concatenated of the three genes allowed better separation of the species by grouping all the isolates into a single clade. When concatenated genes were analyzed, no isolate was genetically identical to the reference isolate of *Pseudocercospora kaki* deposited in the GenBank database. The haplotype network,

generated from concatenated genes, showed 10 distinct haplotypes, evidencing the genetic variability among the isolates and suggesting the presence of more than one species associated with persimmon angular leaf spot. Three main groups of haplotypes were observed, including 23 isolates. Colonies showed slow growth, absence of spores and, predominantly, greenish color and raised elevation with circular form. The conidia were septate, olivaceous, obclavate, often curved and rarely cylindrical, measured 71.5 ± 21.68 x 3.71 ± 0.68 µm. All brazilian isolates inoculated were pathogenic on 'Fuyu' leaves.

Keywords: *Pseudocercospora*; Genetic variability; Pathogenicity

3.1. Introdução

O caquizeiro (*Diospyros kaki*), apesar de ter como centro de origem regiões de clima temperado da Ásia, vem sendo cultivado com sucesso em vários países de clima tropical e subtropical (MOWAT; COLLINS; GEORGE, 1995). No Brasil o caquizeiro foi introduzido em 1890 e, a exploração dessa cultura foi impulsionada a partir de 1920, após a chegada dos imigrantes japoneses. O cultivo do caquizeiro é considerado uma importante atividade para a agricultura familiar, principalmente nas regiões sul e sudeste do país (SATO; ASSUMPÇÃO, 2002).

O caquizeiro é uma planta rústica que apresenta poucos problemas fitossanitários. Entretanto, algumas doenças podem causar sérios prejuízos se não forem controladas adequadamente. Entre elas, a cercosporiose, que é considerada a principal doença foliar do caquizeiro (BASSANEZI et al., 2016).

A cercosporiose, causada pelo fungo *Pseudocercospora kaki*, é uma doença caracterizada pelo aparecimento de lesões angulares de tamanhos variados distribuídas por todo limbo foliar, delimitadas pelas nervuras, apresentando coloração escura pardo-avermelhada. A doença é responsável pelo amadurecimento antecipado dos frutos e queda precoce das folhas, consequentemente, reduz o acúmulo de carboidratos no sistema radicular durante o período de dormência da planta, o que prejudica a safra seguinte (BASSANEZI et al., 2016; PIO; SCARPARE FILHO, MOURÃO FILHO, 2003). Mesmo a cercosporiose sendo considerada a principal doença foliar do caquizeiro no Brasil, não existem estudos a respeito da etiologia do agente causal da doença no país, sendo considerado apenas estudos realizados em outros países (CROUS et al., 2015).

A identificação precisa de fitopatógenos é essencial para compreender a sua origem, biologia, patogenicidade, distribuição, gama de hospedeiros e para o

estabelecimento de estratégias eficazes de controle (CROUS et al., 2015). Fungos com alta variabilidade genética podem ser de difícil controle, devido a sua rápida adaptação às diferentes medidas de controle, como a introdução de um cultivar resistente (SILVA et al., 2013). Com os constantes avanços na área de sequenciamento e das análises multilocus vem ocorrendo mudanças significativas na taxonomia de fungos, o que possibilita a delimitação de espécies com base na implementação do conceito de espécie filogenético em combinação com características morfológicas e ecológicas (QUAEDVLIEG et al., 2014).

Pseudocercospora (Mycosphaerellaceae, Capnodiales) é o segundo maior gênero de fungos cercosporoides (BAKHSHI et al., 2014). Esse gênero engloba fungos patogênicos a diversas espécies de plantas, incluindo plantas com importância econômica como cereais e plantas frutíferas (CROUS et al., 2013). A separação de espécies de *Pseudocercospora* por características morfológicas são muitas vezes ineficazes (BAKHSHI et al., 2014), tornando-se necessária análise multigênica para melhor discriminação entre espécies (SILVA et al., 2016b). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade de isolados associados a cercosporiose do caquizeiro no Brasil através da filogenia multilocus, caracterização morfológica e testes de patogenicidade.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Coleta e preservação de isolados

Foram coletadas folhas com sintomas de cercosporiose em pomares de caquizeiros nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (Figura 1). As folhas sintomáticas foram encaminhadas ao laboratório de Epidemiologia, do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, da ESALQ,/USP, Piracicaba, SP, para o isolamento do patógeno. Fragmentos de tecidos foliares sintomáticos, com 0,5 cm^2 foram desinfestados em álcool 70% (1 min) e hipoclorito de sódio 2,5% (2,5 min), seguido de lavagem em água destilada e esterilizada (1 min). Após desinfestados, os fragmentos foram secos em papel filtro esterilizados e depositados no centro de placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). As placas de Petri foram incubadas em BOD por 14 dias a 25ºC e fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, a colônia do fungo foi repicada para o meio BDA

acrescido de 0,5 g de sulfato de estreptomicina por litro de meio de cultura e os isolados foram incubados sob as mesmas condições por 14 dias.

Para a indução de esporulação dos isolados, foi utilizada a metodologia proposta por SILVA et al. (2016) com modificações. Para cada isolado, três discos de micélio de 8 mm foram retirados da borda da colônia e transferidos para tubos Falcon de 50 mL contendo 10 mL de V8 diluído (4 mL de V8 + 6 mL de água). Os tubos foram mantidos sob agitação constante a 120 rpm, em condições de ambiente. Após quatro dias, sob agitação, o conteúdo de cada tubo foi depositado em placas de Petri contendo meio Ágar-Água (AA), as quais permaneceram abertas em câmara de fluxo para a secagem. Após três dias, quando ocorreu a desidratação do meio, 10 mL de água destilada foram adicionados a cada placa de Petri, a qual foi levemente raspada com o auxílio de uma alça de Drigalski. A suspensão resultante foi filtrada em dupla camada de gaze e então calibrada para 10^4 conídios mL^{-1} de água destilada, com o auxílio da câmara de Neubauer. Foram vertidos 100 µL da suspensão resultante sobre a superfície do meio AA contido em placas de Petri, espalhando-se uniformemente. As placas com os conídios foram mantidas em BOD a 25ºC e fotoperíodo de 12 horas por 24 horas. Posteriormente, ao microscópio, conídios que germinaram foram repicados isoladamente para placas de Petri contendo BDA, para obtenção de isolados monospóricos.

Os isolados monospóricos obtidos foram repicados no centro de placas de Petri contendo meio BDA, onde foram colocados ao redor do disco de micélio discos de papel filtro esterilizados de 5 mm de diâmetro . Após o desenvolvimento de estruturas vegetativas do patógeno sobre os discos de papel filtro, esses foram retirados das placas de Petri e armazenados em microtubos do tipo Eppendorf®, contendo sílica-gel esterilizada, com capacidade para 1,5 mL. Os tubos contendo cada isolado foram mantidos a -20 °C na coleção micológica do Laboratório de Epidemiologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP.

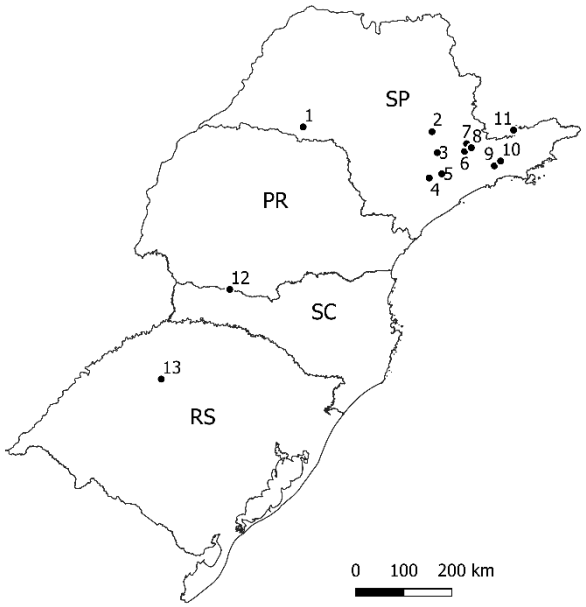

Figura 1. Local de coleta dos isolados associados a cercosporiose do caquizeiro. 1- Maracaí; 2- Piracicaba; 3- Porto Feliz; 4- Pilar do Sul; 5- Piedade; 6- Jundiaí; 7- Itatiba; 8- Jarinu; 9- Mogi das Cruzes; 10- Guararema; 11- São Bento do Sapucaí; 12- Clevelândia; 13- Augusto Pestana. RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina, PR: Paraná, SP: São Paulo.

3.2.2. Extração e purificação de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

Para cada isolado obtido, uma pequena quantidade de micélio foi removida de colônias monospóricas cultivadas em BDA por 14 dias a 25ºC e fotoperíodo de 12 horas. A extração e purificação de DNA foi realizada com a utilização do kit de purificação Wizard Genomic DNA (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Três regiões de DNA foram amplificadas, sendo elas o espaçador interno transcrito (ITS), o fator de elongação 1-α (TEF) e a actina (ACT), utilizando os pares de primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990); EF-F (DE SOUZA et al., 2012) e tef997R (SHOUKOUHI; BISSETT, 2009) e; ACT-512F e ACT-783R (CARBONE; KOHN, 1999), respectivamente.

Cada reação de PCR conteve 2 µL DNA (25 ng μL^{-1}), 8.5 µL Nuclease Free Water, 1 µL de cada primer (10 µM) e 12.5 µL GoTaq Colorless Master Mix 2x (Promega). As reações da PCR foram realizadas em termociclador (SuperCycler Trinity, Kyratec or TC-512, Techne). O ciclo para a amplificação da região ITS consistiu em uma desnaturação inicial a 94ºC (por 2 min; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94ºC por 1 min, anelamento a 55ºC por 1 min e extensão a 72ºC por

1 min; e uma extensão final a 72ºC por 5 min). A amplificação da região ACT consistiu na desnaturação inicial a 94ºC por 5 min; seguido por 40 ciclos de amplificação (94ºC por 30s, 52ºC por 30s e 72ºC por 30s) e uma extensão final a 72ºC por 7 min. Para a amplificação da região TEF foi realizada uma desnaturação inicial a 94ºC por 2 min seguida de 40 ciclos de amplificação (94ºC por 10s, 53ºC por 30s e 72ºC por 1 min) e uma extensão final a 72ºC por 1 min.

Os produtos resultantes da amplificação por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com SYBR Safe (Invitrogen), em tampão 0,5× Tris Borato EDTA (TBE) e visualizados sob luz UV. Os fragmentos foram purificados usando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). O sequenciamento foi realizado em um sequenciador 3130xl Genetic Analyzer no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC, Piracicaba, Brasil). O produto da PCR foi sequenciado em ambas as direções e as sequências consenso foram obtidas utilizando o software Sequencher v.5.4.1 (GENE CODES CORPORATION, 2016). Todas as sequências geradas neste estudo foram depositadas no GenBank.

3.2.3. Análise filogenética

As sequências consensus obtidas foram alinhadas e comparadas com outras sequências do gênero *Pseudocercospora* depositadas no GenBank utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999). O programa Mesquite (MADDISON; MADDISON, 2011) foi utilizado para concatenar os múltiplos alinhamentos. O modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado pelo programa MrModeltest v.3.7 (POSADA; CRANDALL, 1998), usando AIC (critério de informação Akaike) para cada locus. Para a reconstrução filogenética, baseado no alinhamento multilocus, foi utilizado o método de inferência Bayesiana. A análise particionada foi executada duas vezes no programa MrBayers v 3.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), usando o algoritmo MCMC (Markov Chain Monte Carlo), para gerar árvores filogenéticas com probabilidade *a posteriori*. Quatro cadeias MCMC foram executadas simultaneamente com 10^7 gerações. As árvores foram amostradas ao acaso a cada 1000 gerações e 25% das árvores iniciais foram descartadas. As árvores foram visualizadas e editadas pelo programa TreeView (PAGE, 1996).

3.2.4. Diversidade intraespecífica

Para a caracterização da diversidade genética intraespecífica dos isolados, foram utilizadas as sequências de todos os isolados coletados. As análises foram realizadas para cada locus e para a combinação do conjunto de dados multilocus (ITS, TEF ACT), utilizando o programa DnaSP v. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Para inferências sobre as relações filogenéticas dos isolados, uma rede de haplótipos foi construída usando o método de parcimônia estatística com 95% de confiança (TEMPLETON; CRANDALL; SING, 1992). As análises foram baseadas na matrix da distância genética entre todos os haplótipos conectando individualmente pares a pares até todos serem ligados à rede. Para esta análise foi utilizado o programa PopArt v.1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015) usando a inferência de rede de haplótipos TCS (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000), onde “gaps” ou “indels” foram codificados como dados perdidos e, portanto, não foram considerados na diferenciação dos haplótipos.

3.2.5. Caracterização morfológica

Discos de micélio de 8 mm de diâmetro foram retirados da margem das colônias monospóricas cultivadas por 14 dias em meio BDA e depositadas sobre o centro de placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em BOD com temperatura de 25 ºC e fotoperíodo de 12 horas durante quatro semanas. Foram realizadas leituras semanais dos dois diâmetros perpendiculares das colônias, com auxílio de paquímetro digital. As médias obtidas dos diâmetros foram utilizadas no cálculo da taxa de crescimento micelial (mm/dia). No 28º dia após a repicagem, observou-se a morfologia e cor das colônias, comparando suas topografias e formatos de bordos com a descrição de Gams, Verkley e Crous (2007). A coloração da colônia foi baseada na carta micológica de cores de Rayner (1970).

Para caracterização dos conídios, cada isolado monospórico foi induzido a esporular pela metodologia proposta por Silva et al. (2016) com modificações, conforme descrito anteriormente. As dimensões dos conídios, comprimento e largura, foram determinadas por meio da avaliação de 50 conídios escolhidos aleatoriamente de cada isolado. As medidas foram realizadas com o auxílio de uma

câmara fotográfica Axiocam 503 color (Carl Zeiss) acoplada em um microscópio Axio Lab.A1 (Carl Zeiss) em aumento 100x.

3.2.6. Teste de patogenicidade

Para testar a patogenicidade dos isolados, plantas do cultivar Fuyu foram aspergidas com uma suspensão de conídios na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} até o ponto de escorrimento. Em cada planta, cinco folhas com mais de 30 dias de idade foram inoculadas em ambas as faces. Após a inoculação, as plantas foram envolvidas com saco plástico transparente e mantidas em câmara úmida por 48 horas a 25 ºC e escuro. Após a retirada da câmara úmida, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até a avaliação. Plantas aspergidas com água destilada serviram como controle. Foram utilizadas quatro repetições (plantas) para cada isolado inoculado. A avaliação da severidade da doença foi realizada com o uso de escala diagramática para a cercosporiose do caquizeiro (Capítulo 1) 60 dias após a inoculação. O patógeno foi reisolado das folhas sintomáticas e suas características morfológicas de colônias e conídios foram comparadas com os isolados inoculados. Para a análise estatística, devido à ausência de normalidade, os dados foram transformados em raiz quadrada e submetidos ao teste de comparação de médias, de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas através do programa ‘R’ v. 3.4.1 (R Core Team, 2019).

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterização molecular

As amplificações obtidas pela PCR das regiões ITS, ACT e TEF geraram *amplicons* de 491, 194 e 317 pb, respectivamente. A análise filogenética foi realizada com sequências dos 37 isolados de *Pseudocercospora* spp. obtidos neste estudo além de 16 sequências tipo das principais espécies do gênero *Pseudocercospora* e um representante de *Pseudocercospora kaki*, as quais foram obtidas no GenBank, totalizando 53 sequências (Tabela 1). Para a inferência Bayesiana, os modelos de evolução baseados no critério AIC foram (K80+I) para ITS, (K80+G) para ACTIN e (SYM+G) para TEF, os quais foram incluídos na análise

particionada. A região ITS não permitiu a separação adequada entre as espécies de referência e os isolados de *Pseudocercospora* spp. (Figura 2). A região ACT separou a maioria dos isolados em dois clados distintos; entretanto, os isolados CC41, CC24 e CC15 agruparam-se com *Pseudocercospora kaki*, e o isolado CC1 com *Pseudocercospora* sp. (Figura 3). As sequências de TEF dos 37 isolados foram monomórficas e não se agruparam com nenhuma outra espécie de referência (Figura 4). O melhor resultado foi obtido através da concatenação dos três genes, agrupando os isolados obtidos em um único clado e evidenciando a variabilidade genética entre os isolados devido a formação de subclados (Figura 5).

Tabela1. Isolados de *Pseudocercospora* spp. utilizados neste estudo com detalhes, haplótipos e código de acesso do GenBank (continua)

Espécie	Código do isolado	Hospedeiro	Local de coleta	Haplótipo	Número de acesso no GenBank		
					ITS	TEF	ACT
Pseudocercospora spp.	CC1	*Diospyros kaki*	Itatiba, SP, Brasil	H1	MK867646	MK874020	MK873983
	CC3	*Diospyros kaki*	Maracaí, SP, Brasil	H6	MK867647	MK874021	MK873984
	CC4	*Diospyros kaki*	Maracaí, SP, Brasil	H8	MK867648	MK874022	MK873985
	CC5	*Diospyros kaki*	Maracaí, SP, Brasil	H10	MK867649	MK874023	MK873986
	CC6	*Diospyros kaki*	São Bento do Sapucaí, SP, Brasil	H8	MK867650	MK874024	MK873987
	CC7	*Diospyros kaki*	São Bento do Sapucaí, SP, Brasil	H4	MK867651	MK874025	MK873988
	CC8	*Diospyros kaki*	São Bento do Sapucaí, SP, Brasil	H4	MK867652	MK874026	MK873989
	CC9	*Diospyros kaki*	Augusto Pestana, RS, Brasil	H7	MK867653	MK874027	MK873990
	CC10	*Diospyros kaki*	Augusto Pestana, RS, Brasil	H9	MK867654	MK874028	MK873991
	CC12	*Diospyros kaki*	Jarinu, SP, Brasil	H7	MK867655	MK874029	MK873992
	CC13	*Diospyros kaki*	Jarinu, SP, Brasil	H8	MK867656	MK874030	MK873993
	CC14	*Diospyros kaki*	Pilar do Sul, SP, Brasil	H8	MK867657	MK874031	MK873994
	CC15	*Diospyros kaki*	Pilar do Sul, SP, Brasil	H3	MK867658	MK874032	MK873995
	CC17	*Diospyros kaki*	Clevelândia, PR, Brasil	H4	MK867659	MK874033	MK873996
	CC18	*Diospyros kaki*	Porto Feliz, SP, Brasil	H8	MK867660	MK874034	MK873997
	CC19	*Diospyros kaki*	Piedade, SP, Brasil	H10	MK867661	MK874035	MK873998
	CC21	*Diospyros kaki*	Piedade, SP, Brasil	H6	MK867662	MK874036	MK873999
	CC22	*Diospyros kaki*	Piedade, SP, Brasil	H8	MK867663	MK874037	MK874000
	CC23	*Diospyros kaki*	Jundiaí, SP, Brasil	H10	MK867664	MK874038	MK874001
	CC24	*Diospyros kaki*	Jundiaí, SP, Brasil	H2	MK867665	MK874039	MK874002
	CC25	*Diospyros kaki*	Piracicaba, SP, Brasil	H10	MK867666	MK874040	MK874003
	CC26	*Diospyros kaki*	Piracicaba, SP, Brasil	H8	MK867667	MK874041	MK874004
	CC27	*Diospyros kaki*	Piracicaba, SP, Brasil	H10	MK867668	MK874042	MK874005
	CC28	*Diospyros kaki*	Piracicaba, SP, Brasil	H8	MK867669	MK874043	MK874006
	CC30	*Diospyros kaki*	Porto Feliz, SP, Brasil	H4	MK867670	MK874044	MK874007

Tabela 1. Isolados de *Pseudocercospora* spp. utilizados neste estudo com detalhes, haplótipos e código de acesso do GenBank (conclusão)

Espécie	Código do isolado	Hospedeiro	Local de coleta	Haplótipo	Número de acesso no GenBank		
					ITS	TEF	ACT
Pseudocercospora spp.	CC31	*Diospyros kaki*	Piedade, SP, Brasil	H7	MK867671	MK874045	MK874008
	CC32	*Diospyros kaki*	São Bento do sapucaí, SP, Brasil	H8	MK867672	MK874046	MK874009
	CC33	*Diospyros kaki*	Piracicaba, SP, Brasil	H4	MK867673	MK874047	MK874010
	CC34	*Diospyros kaki*	São Bento do sapucaí, SP, Brasil	H7	MK867674	MK874048	MK874011
	CC36	*Diospyros kaki*	Augusto Pestana, RS, Brasil	H6	MK867675	MK874049	MK874012
	CC37	*Diospyros kaki*	Piracicaba, SP, Brasil	H4	MK867676	MK874050	MK874013
	CC38	*Diospyros kaki*	Mogi das Cruzes, SP, Brasil	H9	MK867677	MK874051	MK874014
	CC39	*Diospyros kaki*	Mogi das Cruzes, SP, Brasil	H5	MK867678	MK874052	MK874015
	CC40	*Diospyros kaki*	Mogi das Cruzes, SP, Brasil	H10	MK867679	MK874053	MK874016
	CC41	*Diospyros kaki*	Guararema, SP, Brasil	H3	MK867680	MK874054	MK874017
	CC42	*Diospyros kaki*	Guararema, SP, Brasil	H8	MK867681	MK874055	MK874018
	CC43	*Diospyros kaki*	Guararema, SP, Brasil	H8	MK867682	MK874056	MK874019
Pseudocercospora ampelopsis	CPC 11680	*Ampelopsis brevipenduncula var. heterophylla*	Coréia do Sul	-	GU269830	GU384542	GU320534
Pseudocercospora dodonaeae	CBS 114647	*Dodonaea viscosa*	Nova Zelândia	-	GU269697	GU384413	JQ325013
Pseudocercospora exosporioides	MUCC 893	*Sequoia sempervirens*	Japão	-	GU269707	GU384423	GU320411
Pseudocercospora flavomarginata	CMW 13586	*Eucalyptus camaldulensis*	Tailândia	-	DQ155657	DQ156548	DQ166513
Pseudocercospora flavomarginata	CPC 14142	*Eucalyptus sp.*	China	-	GU269804	GU384515	GU320507
Pseudocercospora kaki	MUCC 900	*Diospyros kaki*	Japão	-	GU269729	GU384442	GU320431

Tabela 1. Isolados de *Pseudocercospora* spp. utilizados neste estudo com detalhes, haplótipos e código de acesso do GenBank (conclusão)

Espécie	Código do isolado	Hospedeiro	Local de coleta	Haplótipo	Número de acesso no GenBank		
					ITS	TEF	ACT
Pseudocercospora lonicericola	MUCC 889	*Lonicera gracilipes var. glabra*	Japão	-	GU269736	JQ324999	GU320438
Pseudocercospora lythracearum	CPC 10707	*Lagerstroemia indica*	Coréia do Sul	-	GU269740	GU384452	GU320442
Pseudocercospora lythracearum	MUCC 890	*Lagerstroemia indica*	Japão	-	GU269741	GU384453	GU320443
Pseudocercospora pancratii	CBS 137.94	-	Cuba	-	GU269759	GU384470	GU320460
Pseudocercospora ranjita	CPC 11141	*Gmelina sp.*		-	GU269790	GU384500	GU320491
Pseudocercospora sp.	CPC 14711	*Pyracantha angustifolia*	Coréia do Sul	-	JQ324980	JQ325002	JQ325023

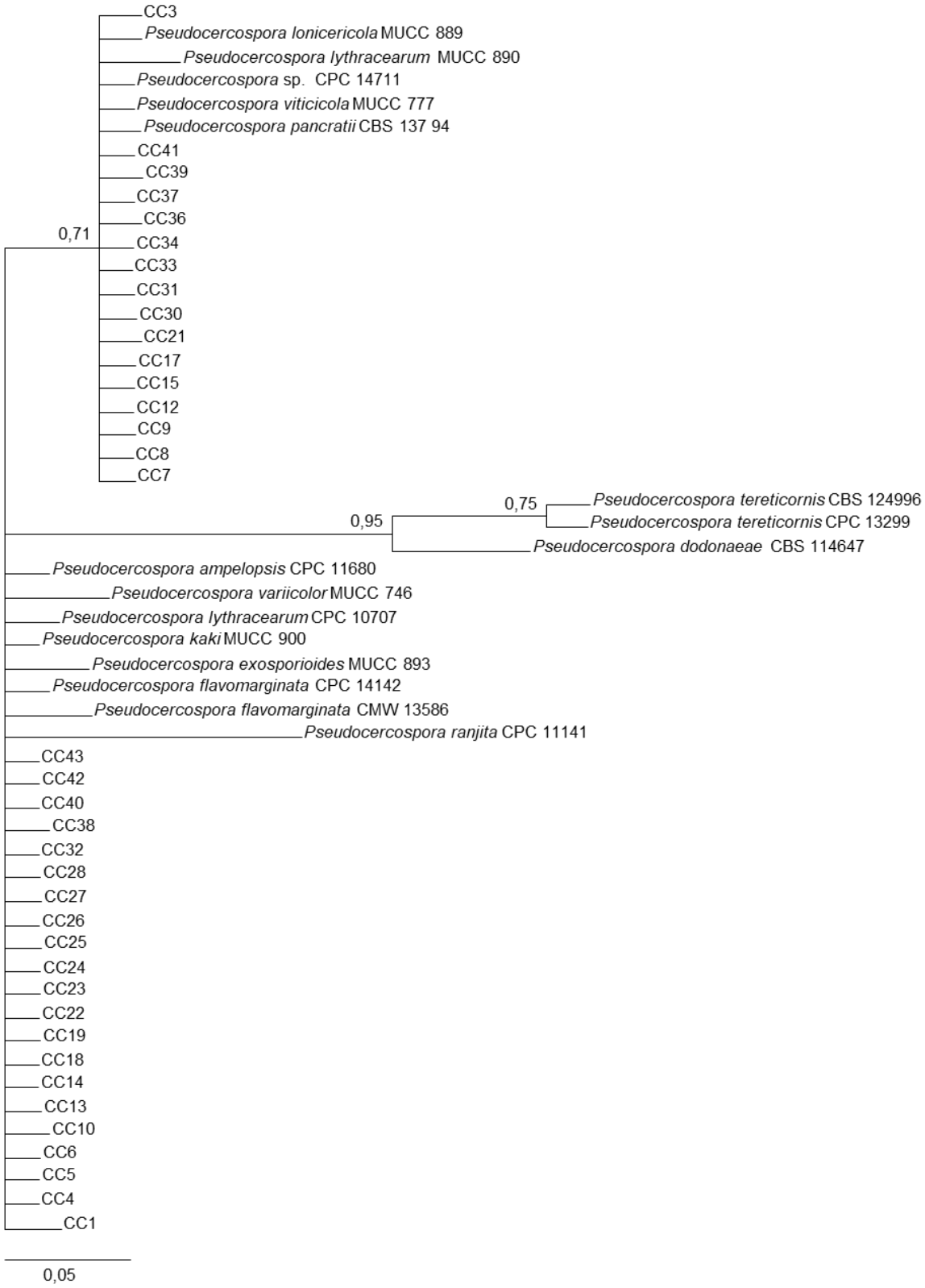

Figura 2. Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana das sequências de ITS alinhadas com sequências dos 37 isolados de *Pseudocercospora* spp. obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose, utilizando os modelos de substituição de nucleotídeos K80+I. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura.

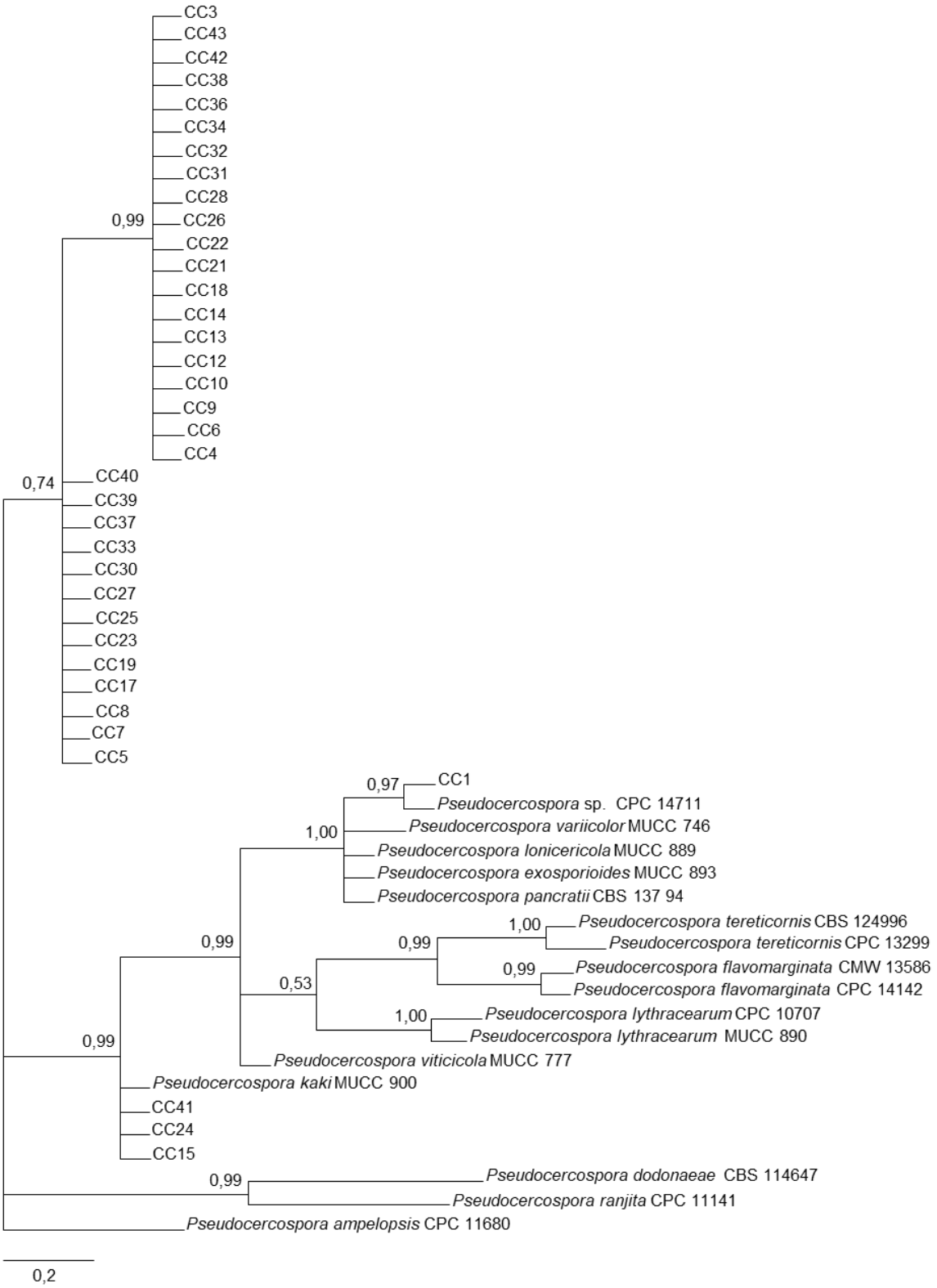

Figura 3. Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana das sequências de ACT alinhadas com sequências dos 37 isolados de *Pseudocercospora* spp. obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos K80+G. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura.

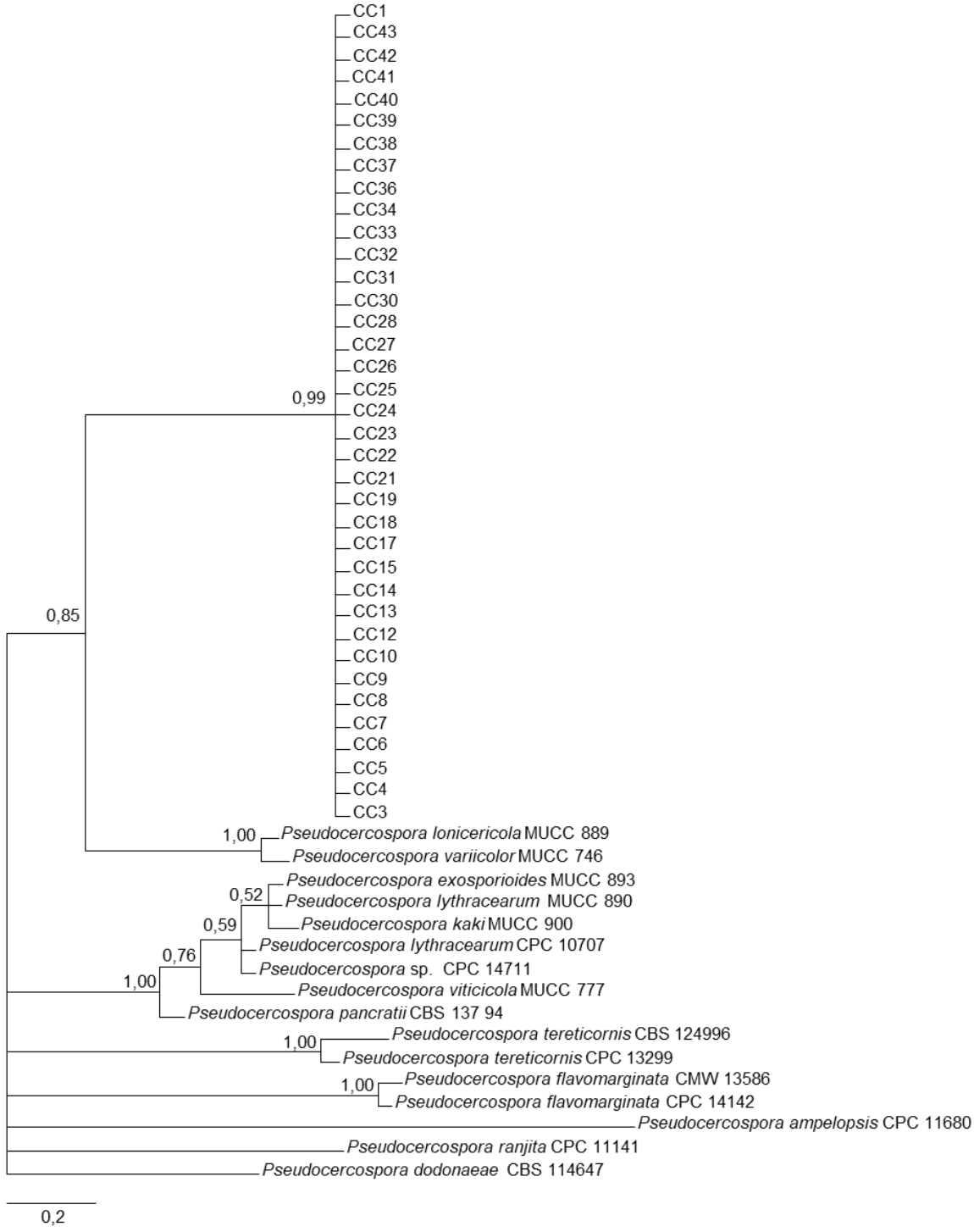

Figura 4.Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana das sequências de TEF alinhadas com sequências dos 37 isolados de *Pseudocercospora* spp. obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos SYM+G. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura.

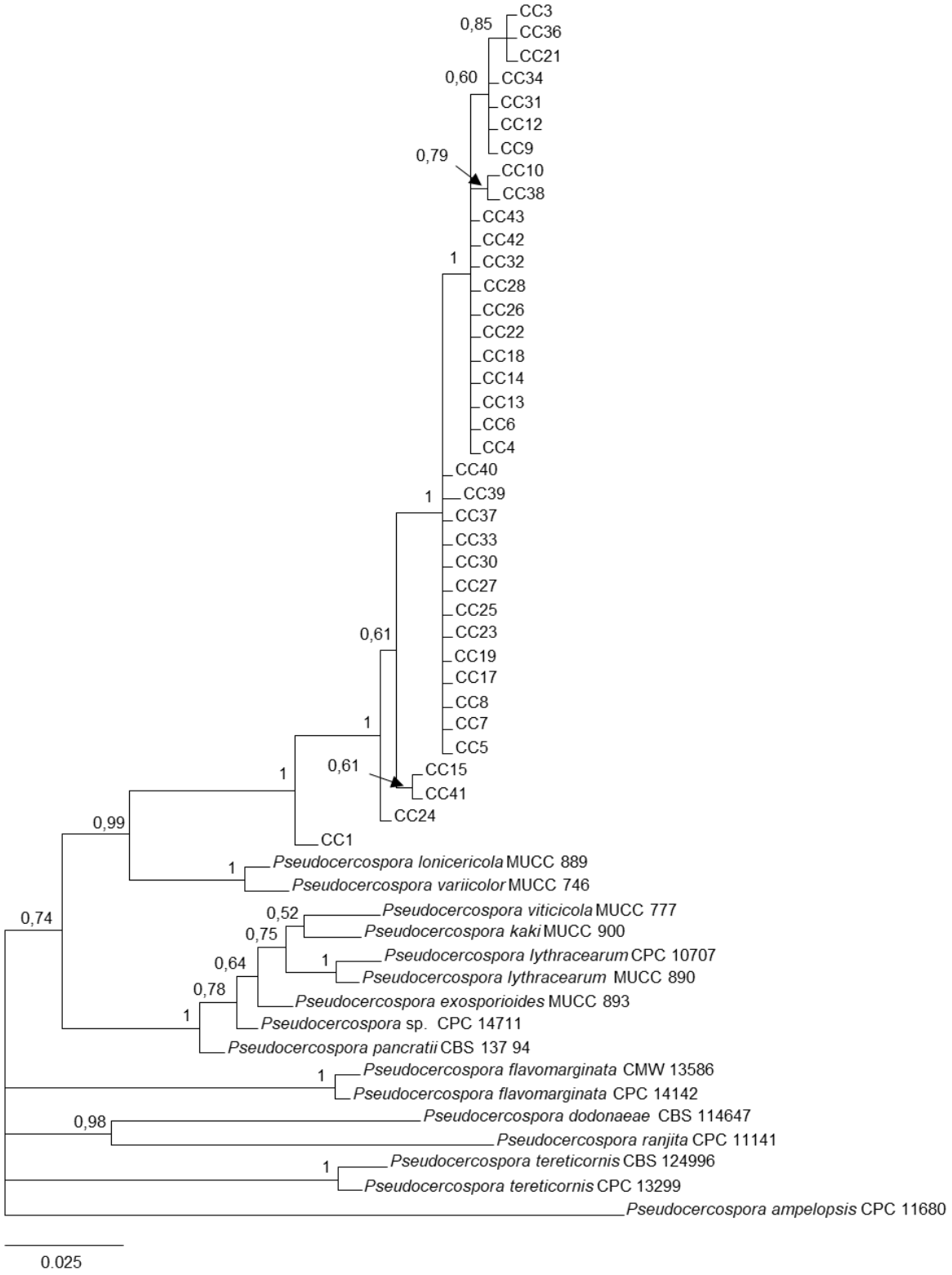

Figura 5.Árvore filogenética derivada da análise Bayesiana da combinação das sequências de ITS, ACTIN e TEF alinhadas com sequências dos 37 isolados de *Pseudocercospora* spp. obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose utilizando os modelos de substituição de nucleotídeos K80+I, K80+G e SYM+G para ITS, ACTIN e TEF, respectivamente. Os valores de probabilidade *a posteriori* estão representados nos entroncamentos da figura.

Para avaliar a diversidade intraespecífica foi realizada análise individual para cada gene e de forma concatenada. Para os genes ITS e ACT foram obtidos 5 e 4 haplótipos, respectivamente, entretanto, apesar do número de haplótipos serem semelhantes entre os genes, o número de bases distintas entre haplótipos foi superior para a região da ACT em relação as demais. (Figura 6).

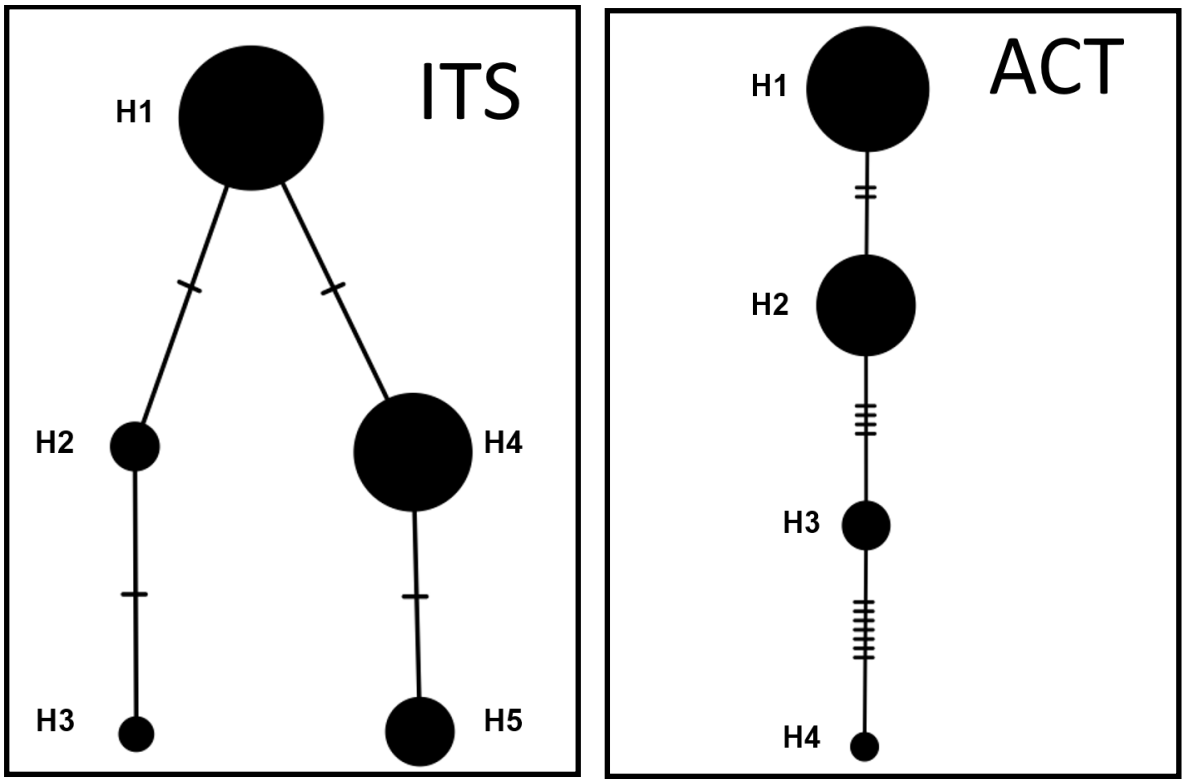

Figura 6. Rede de haplótipos para os genes ITS e ACT de isolados de *Pseudocercospora* spp. obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clementet al., 2000). Círculos grandes indicam grupos de haplótipos cujo tamanho é proporcional à frequência do haplótipo na amostra e os círculos menores e as marcas nas linhas, entre haplótipos, correspondem a uma substituição de nucleotídeo.

Para a análise dos haplótipos de forma concatenada, foram utilizadas 37 sequências pertencem aos três genes de *Pseudocercospora* spp. coletados. Os resultados obtidos a partir da criação da rede de haplótipos, para analisar a variabilidade intraespecífica de *Pseudocercospora* spp., indicaram elevado nível de variabilidade genética entre os isolados. Foram identificados 10 haplótipos nas 37 sequências analisadas. Construiu-se uma rede de haplótipos para melhor visualização da distribuição da variação genética intraespecífica (Figura 7). Foram

observados três grupos principais de haplótipos (H4, H8 e H10), englobando um total de 23 isolados.

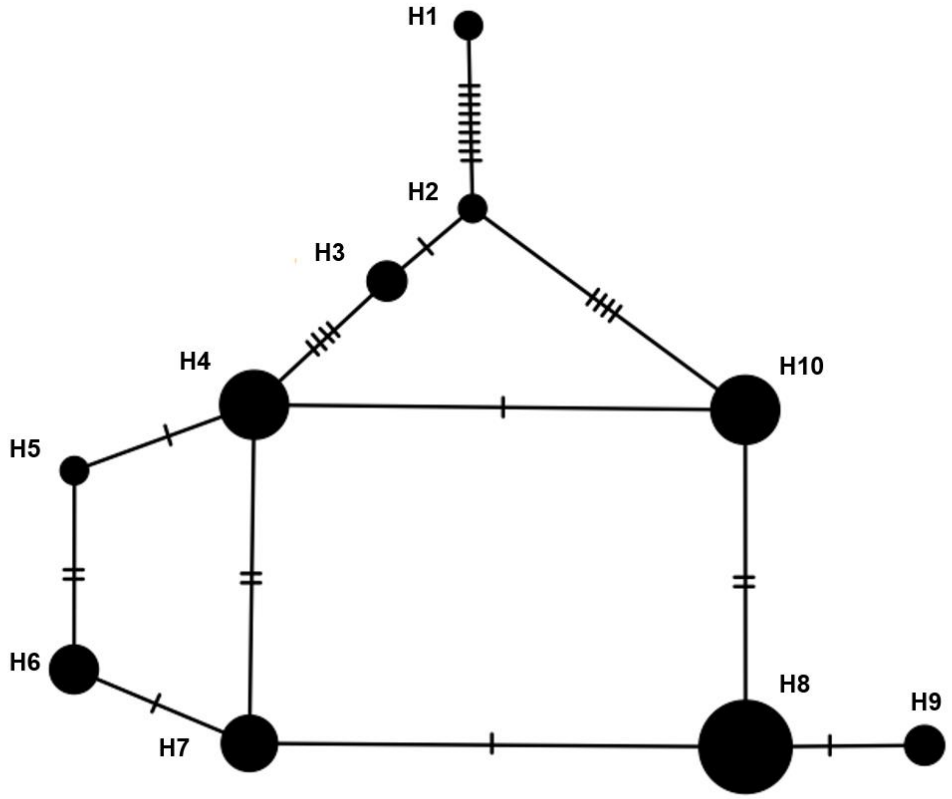

Figura 7. Rede de haplótipos baseada nos genes ITS, ACT E TEF de isolados de *Pseudocercospora* spp. obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose e analisados de forma concatenada. A rede foi construída usando o algoritmo de parcimônia estatística implementado no programa TCS (Clement et al., 2000). Círculos grandes indicam grupos de haplótipos cujo tamanho é proporcional à frequência do haplótipo na amostra e os círculos menores e as marcas na linhas, entre haplótipos, correspondem a uma substituição de nucleotídeo.

Não foi observada correlação entre área geográfica e haplótipos englobados neste estudo, uma vez que os haplótipos não foram agrupados em função da área em que os isolados foram coletados (Tabela 1). Os três principais grupos de haplótipos (H4, H8 e H10) apresentaram sequências de diversas regiões do estado de São Paulo e, no caso de H4, de São Paulo e Paraná.

3.3.2. Caracterização morfológica

As colônias, após 28 dias de cultivo a 25ºC sob fotoperíodo de 12 horas em placas de Petri com meio BDA, apresentaram crescimento denso de coloração esverdeada a esbranquiçada (Figura 8). A coloração predominante foi verde acinzentado. Apenas uma pequena porcentagem de isolados apresentou colônias com coloração palha (11%). A topografia das colônias foi predominante levantada com bordos inteiros. Entretanto, dois isolados apresentaram topografia plana e um isolado apresentou bordos ondulados.

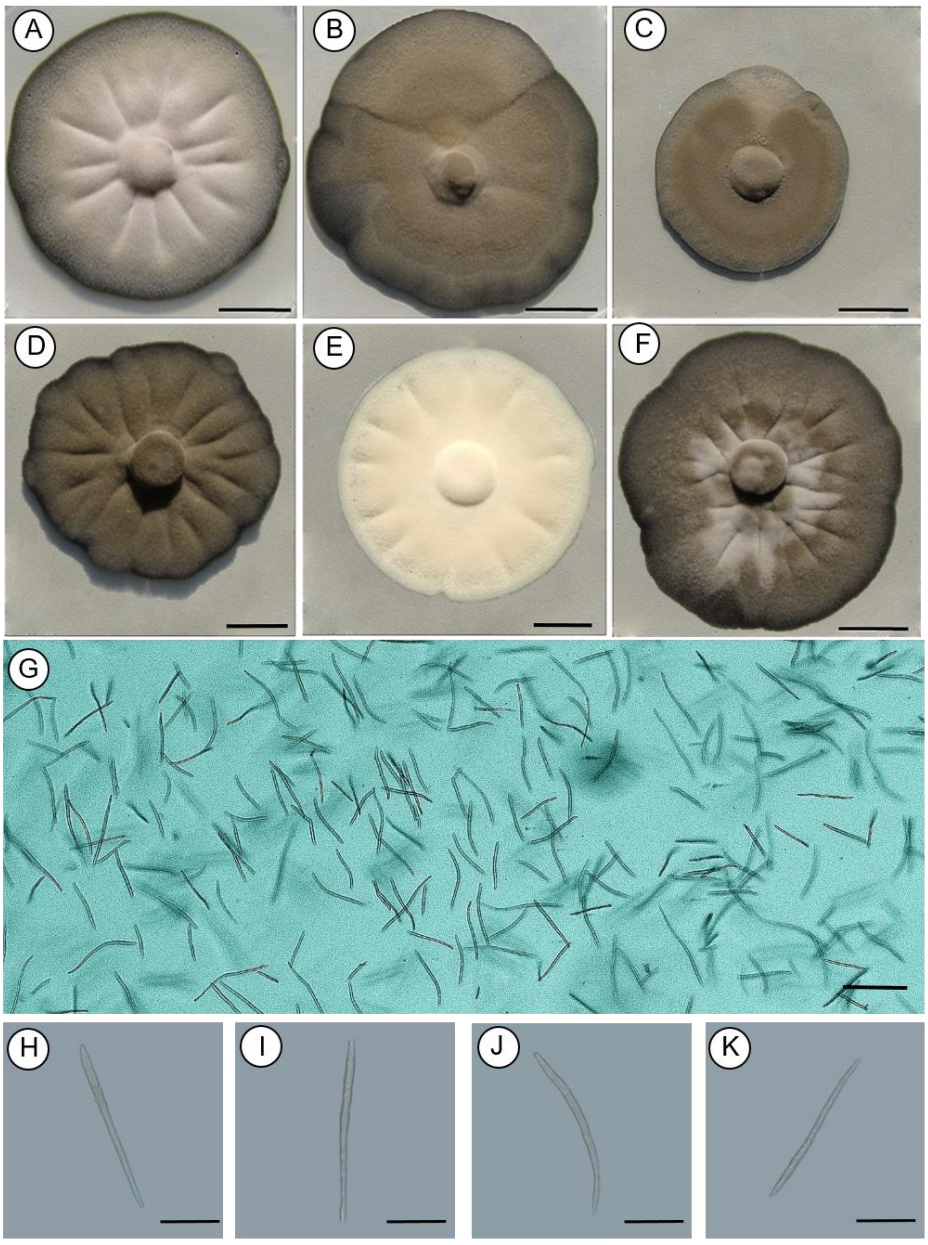

Figura 8. A-F. Aspectos das colônias de *Pseudocercospora* spp. após 28 dias de cultivo em meio BDA, sob temperatura de 25 ºC e fotoperíodo de 12 horas. G-K. Conídios. Escala: A-F: 1 cm; G: 100 µm; H-K 30 µm.

Em relação a taxa de crescimento micelial, os isolados apresentaram crescimento lento em meio de cultura, em média 1,05 mm/dia. A maior taxa de crescimento foi obtida pelo isolado CC1 (1,49 mm/dia) e a menor taxa de crescimento foi do isolado CC9 (0,78 mm/dia) (Tabela 2).

Tabela 2. Crescimento micelial e tamanho de conídios de *Pseudocercospora* spp.de isolados obtidos de folhas de caquizeiros com sintomas de cercosporiose.

Isolado	Crescimento micelial (mm dia^{-1})	Tamanho dos conídios		Razão
		Comprimento (µm)	Largura (µm)	Comprimento/Largura
CC1	1,49	54,81 ± 24,29	4,83 ± 1,77	11,35
CC3	0,8	78,82 ± 16,3	3,66 ± 0,6	21,54
CC4	0,84	73,02 ± 13,97	3,24 ± 0,36	22,54
CC5	0,89	74,36 ± 15,26	3,17 ± 0,38	23,46
CC6	1,24	81,07 ± 27,8	3,08 ± 0,9	26,32
CC7	1,1	55,29 ± 18,48	2,44 ± 0,45	22,66
CC8	1,13	83,41 ± 24,74	3,86 ± 0,81	21,61
CC9	0,78	76,34 ± 12,68	3,17 ± 0,84	24,08
CC10	1,15	65,68 ± 14,77	3,51 ± 0,46	18,71
CC12	0,88	84,19 ± 13,84	3,99 ± 0,52	21,1
CC13	1,04	59,5 ± 13,19	3,34 ± 0,44	17,81
CC14	1,2	77,95 ± 14,65	3,99 ± 0,54	19,54
CC15	1,03	73,92 ± 21,29	6,51 ± 1,04	11,35
CC17	1,09	81,39 ± 20,23	3,62 ± 0,57	22,48
CC18	1,09	91,54 ± 16,2	4,13 ± 0,62	22,16
CC19	1,26	58,82 ± 16,88	2,71 ± 0,62	21,7
CC21	1,01	89,46 ± 13,52	3,95 ± 0,57	22,65
CC22	0,88	56,45 ± 20,23	2,72 ± 0,82	20,75
CC23	1,34	75,16 ± 24,31	3,71±1,25	20,26
CC24	1,39	71,72 ± 19,42	3,57 ± 0,68	20,09
CC25	1,02	64,23 ± 17,92	4,37 ± 0,56	14,7
CC26	1,26	84,98 ± 21,51	5,64 ± 1,19	15,07
CC27	1,09	58,29 ± 15,02	3,18 ± 0,59	18,33
CC28	1,02	84,91 ± 16,95	4,3 ± 0,64	19,75
CC30	1,16	59,02 ± 18,98	2,98 ± 0,38	19,81
CC31	1,01	79,21 ± 19,25	4,22 ± 1,11	18,77
CC32	0,95	80,22 ± 14,88	3,33 ± 0,49	24,09
CC33	1,17	79,27 ± 26,38	4,63 ± 0,87	17,12
CC34	1,24	99,52 ± 24,14	3,72 ± 0,68	26,76
CC36	0,86	47,02 ± 14,88	2,48 ± 0,6	18,96
CC37	1,01	64,93 ± 9,79	3,96 ± 0,49	16,4
CC38	0,88	60,93 ± 14,18	3,34 ± 0,6	18,24
CC39	0,91	63,36 ± 13,64	3,25 ± 0,55	19,5
CC40	0,97	65,85 ± 12,07	3,49 ± 0,48	18,87
CC41	0,79	69,73 ± 17,57	3,53 ± 0,51	19,75
CC42	0,81	63,15 ± 12,33	3,58 ± 0,5	17,64
CC43	0,98	63,27 ± 20,69	4,01 ± 0,6	15,78
Média	1,05	71,64 ± 17,63	3,71 ± 0,68	19,78

Os conídios apresentaram-se septados, oliváceos, obcláveo, frequentemente curvados e raramente cilíndricos (Figura 8). O tamanho médio de conídios foi de 71,64 ± 17,63 x 3,71 ± 0,68 µm com uma relação média de comprimento/largura de 19,78. Não foi observado o aparecimento de estruturas teleomórficas neste estudo.

3.3.3. Teste de patogenicidade

Para cada haplótipo foi selecionado um isolado para a realização dos testes de patogenicidade. Todos os isolados inoculados apresentaram sintomas característicos de cercosporiose em folhas de 'Fuyu' com mais de 30 dias de idade. Os sintomas iniciais apareceram de 35-40 dias após a inoculação e caracterizaram por lesões necróticas escuras sem bordos delimitados. Posteriormente os sintomas evoluíram para lesões angulares com bordos bem delimitados e coloração escura, pardo-avermelhada com tamanhos variados, distribuídas por toda a folha. Não foram observados sintomas de cercosporiose nas plantas controle. As características morfológicas de colônia e conídios do reisolamento do patógeno foram as mesmas observadas nos isolados inoculados.

Os isolados inoculados causaram diferentes níveis de severidade. A severidade média variou de 2,25 a 4,25% para os isolados CC40 e CC28, respectivamente (Figura 9). Foi observada diferenças entre os isolados que apresentaram maior (CC8 E CC28) e menor nível de severidade (CC34 e CC40), os demais isolados não diferiram significativamente.

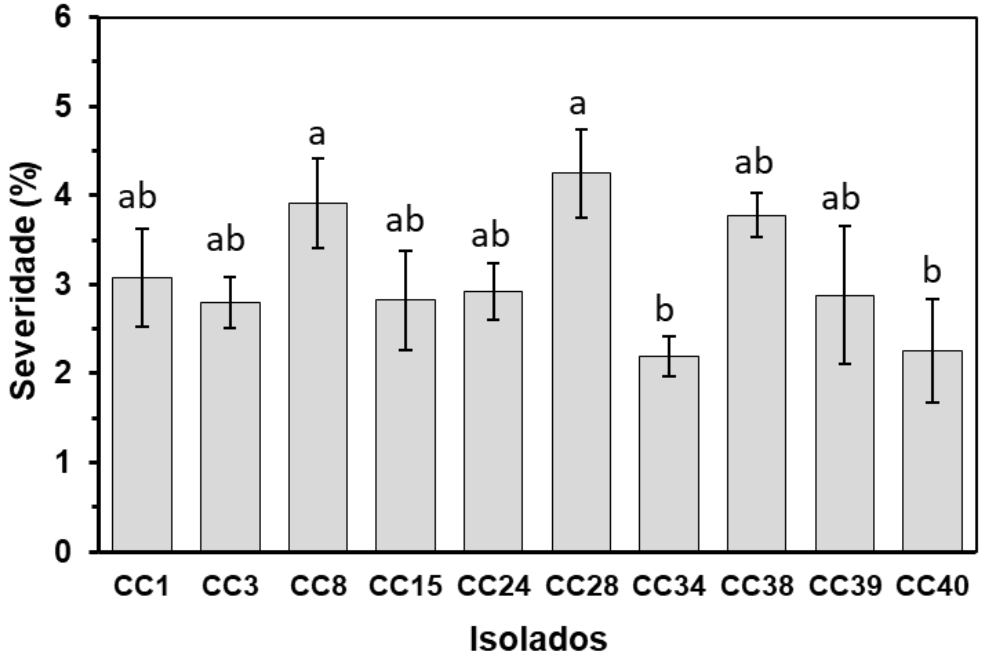

Figura 9. Patogenicidade de isolados de *Pseudocercospora spp.* avaliados em folhas de caquizeiro cv. Fuyu após 60 dias de inoculação. Médias originais de severidade. Para análise estatística os dados foram transformados em raiz quadrada. Colunas com a mesma letra não diferem significativamente baseado no teste de Tukey ($P < 0.05$). Barras correspondem ao erro padrão da média.

3.4. Discussão

O gênero *Pseudocercospora* foi inicialmente descrito por Spegazzini (1910) baseado no agente causal da mancha das folhas da videira, *Pseudocercospora vitis*. *Pseudocercospora* foi considerado por muito tempo como o gênero anamórfico relacionado a *Mycosphaerella*, junto com aproximadamente outros 30 gêneros de fungos anamórficos (CROUS, 2009). Segundo Crous (2009), apesar de *Mycospharella* ser considerado um dos maiores gêneros de ascomicetos, esse gênero deveria ser restrito ao táxon relacionado com anamorfos de *Ramularia,* devido a diversidade filogenética com os demais gêneros (CROUS, 2009; CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007). Portanto, a separação do complexo *Mycosphaerella* em famílias (CROUS, 2009; CROUS; BRAUN; GROENEWALD, 2007) e gênero (CROUS, 2009), pelos dados de sequenciamento de DNA e características morfológica, tiveram grandes implicações no gênero *Pseudocercospora*. Com a emenda realizada no Artigo 59 do Código Internacional para algas, fungos e plantas, um único nome é agora utilizado para *Pseudocercospora* spp. (CROUS; HAWKSWORTH; WINGFIELD, 2015).

Neste estudo foi realizada pela primeira vez a caracterização de isolados de *Pseudocercospora* spp. associados a folhas sintomáticas com cercosporiose do caquizeiro, coletadas em diferentes regiões do Brasil. Os resultados obtidos sugerem que a doença seja causada por um complexo de espécies de *Pseudocercospora*, devido a diversidade genética dos isolados analisados. A utilização da região ITS se mostrou limitante em separar as espécies de referências e os isolados obtidos neste trabalho, ocorrendo agrupamento de diversas espécies distintas no mesmo clado. As limitações referentes a utilização do sequenciamento da região ITS, para identificação de espécies em diversos grupos de fungos, já é bem conhecida (NILSSON et al., 2008; VOIGT; KIRK, 2011). Para o gênero *Pseudocercospora*, existem diversos relatos da ineficiência da utilização da região ITS para diferenciação de muitas espécies. Por exemplo, a região ITS de forma isolada foi capaz de diferenciar somente 25 de 146 espécies de *Pseudocercospora* analisadas (CROUS et al., 2013). Silva et al. (2016b), avaliando a diversidade filogenética de espécies de *Pseudocercospora* spp. coletadas de diversos hospedeiros no Brasil, observou, baseando-se na região ITS, que foram diferenciadas somente 12 de 82 espécies incluídas na análise Bayesiana. Em

contrapartida, a utilização das regiões ACT e TEF foram mais eficientes na separação das espécies. As sequências gênicas parciais das regiões codificadoras de proteínas actA e tef1 foram individualmente melhores, separando aproximadamente metade das espécies analisadas, na identificação de *Pseudocercospora* spp. no Brasil (SILVA et al., 2016b). Dados semelhantes também foram observados para outros fungos cercosporoides, tais como *Cercospora* (BAKHSHI et al., 2015) e *Ramularia* (VIDEIRA et al., 2015).

A análise Bayesiana multilocus, formada pela concatenação dos três genes, permitiu uma melhor discriminação entre espécies em comparação com a filogenia gerada para cada locus individualmente. Os isolados foram agrupados em um único clado, que foi subdividido em subclados. A análise da rede de haplótipos resultou na formação de 10 haplótipos distintos, evidenciando a variabilidade genética entre os isolados e sugerindo a presença de mais de uma espécie associada a cercosporiose do caquizeiro. Não foram encontrados correlações entre as regiões de coletas de isolados e os haplótipos obtidos. O haplótipo predominante foi o H8 que englobou isolados coletados em diferentes regiões do estado de São Paulo. Os haplótipos coletados do Rio Grande do Sul e Paraná também foram encontrados no estado de São Paulo. Almeida et al. (2005), avaliando a variabilidade genética de 72 isolados de *Cercospora kikuchii*, obtidos principalmente de sementes de soja com mancha púrpura, oriundas de diferentes regiões do Brasil, verificou a formação de sete haplótipos distintos que não correlacionaram com as regiões de coleta dos isolados, obtendo os mesmos haplótipos para diferentes regiões. Os autores atribuíram os resultados à facilidade de transmissão da doença por materiais de propagação da cultura, no caso, sementes. Nenhum dos isolados coletados agrupou com o isolado de referência de *Pseudocercospora kaki*, que acabou agrupando-se com *Pseudocercospora viticicola.* As sequências de referência de *Pseudocercospora kaki* depositadas no Genbank foram obtidas pelo sequenciamento de um isolado proveniente do Japão; entretanto, os próprios autores afirmam que o isolado de referência é diferente do isolado Sul Coreano baseado nos dados de sequenciamento (CROUS et al., 2013). Além disto, não há relatos que revelem que foram realizados testes de patogenicidade dos isolados. Muitas espécies de *Pseudocercospora* são reconhecidas como patógenos de plantas, porém algumas espécies vivem de forma saprofítica e endofítica (DEN BREEŸEN et al., 2006). Yan et al. (2018), obteve 39 isolados de *Pseudocercospora* spp. provenientes de três

plantações de álamo e, a partir dos dados de sequenciamento, foi possível diferenciar os isolados em 11 espécies distintas, indicando a alta variabilidade de endofíticos pertencentes ao gênero *Pseudocercospora*. Isolados de *Pseudocercospora kaki* já foram obtidos de folhas de *Camellia sinensi* e utilizados em experimentos *in vitro* para o biocontrole de *Magnaporthe grisea* (ZHU et al., 2014). Portanto, há a possibilidade do isolado de referência de *Pseudocercospora kaki*, utilizado neste trabalho, ser proveniente do isolamento de um fungo endofítico não patogênico ao caquizeiro.

Em relação à caracterização morfológica, foi verificado variabilidade entre os isolados, porém a variabilidade morfológica não se correlacionou com a diversidade filogenética obtida, tornando-se insuficiente para distinguir os isolados. A falta de características morfológicas que permitam diferenciar o gênero *Pseudocercospora* e muitos outros gêneros de fungos cercosporoides aliados ao considerável nível de variabilidade dentro das espécies, dificultam a identificação deste grupo de fungos com base exclusivamente em características morfológicas (BAKHSHI et al., 2014). O gênero *Phaeocercospora* é morfologicamente similar e indistinguível de espécies de *Pseudocercospora*, apesar de ser filogeneticamente distinto (CROUS et al., 2012). Vale (2016), caracterizando 19 isolados de *Cercospora coffeicola*, observou alta plasticidade morfológica, embora os isolados agruparam-se em um único clado monofilético após a análise multilocus. No presente trabalho, os isolados brasileiros apresentaram conídios com comprimentos e larguras superiores aos isolados taiwaneses descritos na literatura. As dimensões dos conídios analisados foram variáveis, 54,01-89,27 x 3,03-4,39 µm, enquanto que os conídios de Taiwan apresentaram dimensões de 20-60 × 2-4 µm (HSIEH; GOH, 1990).

O crescimento lento e a escassez de esporulação em meios artificiais de *Pseudocercospora* spp*.*, observado neste trabalho, são características típicas de fungos cercosporoides. De maneira geral, fungos cercosporoides apresentam alto potencial de esporulação nas folhagens do hospedeiro, mas em condições *in vitro* apresentam crescimento lento e esporulação reduzida (NAGEL, 1934)

Na literatura são encontrados vários relatos sobre a determinação de condições de cultivo para o crescimento e esporulação de fungos cercoporioides onde são avaliadas variáveis como composição do meio de cultura, fotoperíodo, temperatura, período de incubação, pH e outros, obtendo-se resultados variados, pois as interações são múltiplas e pouco conhecidas (SILVA et al., 1988). Porém,

para *Pseudocercospora* spp. não foi encontrado nenhum meio específico que promova a esporulação e acelere o crescimento do patógeno.

Foram obtidos sintomas típicos de cercosporiose nas folhas inoculadas com os isolados de diferentes haplótipos nos testes de patogenicidade, não sendo observadas diferenças sintomatológicas ente os isolados. Entretanto, o nível de severidade observado entre alguns haplótipos foram significativamente diferentes. Resultados semelhantes foram obtidos por Vaghefi et al. (2018), que observou que a severidade de haplótipos distintos de *Cercospora beticola* foi diferente quando inoculados em folhas de beterraba.

Conhecer a variabilidade de fitopatógenos é importante no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças de plantas (MCDONALD; LINDE, 2002). Em programas de melhoramento genético, voltados para o manejo de doenças, busca-se constantemente obter plantas com resistência ampla e duradoura aos fitopatógenos, compreender a variabilidade dentro de uma espécie permite gerar resultados consistentes. Apesar da cercosporiose ser um problema recorrente a muito tempo na cultura do caquizeiro no Brasil, pouco se conhecia a respeito do agente causal da doença. Neste estudo, foi possível verificar a variabilidade genética e morfológica do complexo *Pseudocercospora* spp., associado à cercosporiose do caquizeiro, fornecendo suporte para futuros estudos envolvendo o patógeno.

Referências

ALMEIDA, Á. M. R. et al. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, n. 6, p. 594–602, dez. 2005.

BAKHSHI, M. et al. Multi-gene analysis of *Pseudocercospora* spp. from Iran. **Phytotaxa**, v. 184, n. 5, p. 245–264, 2014.

BAKHSHI, M. et al. Is morphology in *Cercospora* a reliable reflection of generic affinity? **Phytotaxa**, v. 213, n. 1, p. 22, 11 jun. 2015.

BASSANEZI, R. B. et al. Doenças do caquizeiro. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). . Manual de Fitopatologia. **Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. 5. ed. OURO FINO: CERES LTDA., 2016. p. 243–249.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553, 1999.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecolog**y, v. 9, n. 10, p. 1657–1659, 2000.

CORPORATION, G. C. Sequencher® version 5.4.1 sequence analysis software, 2016.

CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. Fungal Diversity, v. 38, p. 1–24, 2009.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 107–127. **Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 28, p. 138, jun. 2012.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. Studies in Mycology, v. 75, n. 1, p. 37–114, 2013.

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

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, n. 1, p. 247–267, 4 ago. 2015.

DE SOUZA, J. I. et al. Isomucor (Mucoromycotina): a new genus from a Cerrado reserve in state of São Paulo, Brazil. **Mycologia**, v. 104, n. 1, p. 232–241, 2012.

DEN BREEŸEN, A. et al. Morphological and molecular characterisation of Mycosphaerellaceae associated with the invasive weed, *Chromolaena odorata*. **Fungal Diversity**, v. 23, p. 89–110, 2006.

GAMS, W.; VERKLEY, G. J. M.; CROUS, P. W. **CBS course of mycology**. 5. ed. Utrecht: Centraal bureauvoor Schimmel cultures, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HSIEH, W. H.; GOH, T. K. ***Cercospora* and similar fungi from Taiwan**. 1. ed. Taipei: Maw Chang Book Company, 1990.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. Popart : full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 1 jun. 2009.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**, 2011. Disponível em: <http://www.mesquiteproject.org/>

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, v. 124, n. 2, p. 163–180, 2002.

MOWAT, A. D.; COLLINS, R. J.; GEORGE, A. P. Cultivation of persimmon (*Diospyros kaki* L.) under tropical conditions. **Acta Horticulturae**, v. 409, p. 141–149, 1995.

NAGEL, C. M. Conidial production in species of Cercospora in pure culture. Phytopathology, v. 24, p. 1101–1110, 1934.

NILSSON, R. H. et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 4, p. 193–201, 26 maio 2008.

PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer applications in the biosciences : CABIOS**, v. 12, n. 4, p. 357–358, 1996.

PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A. **A cultura do caquizeiro**. 1. ed. Piracicaba: Piracicaba ESALQ-Divisão de Biblioteca e Documentação, 2003.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817–818, 1998.

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

RAYNER, R. **A Mycological Colour Chart**. 1. ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1970.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 2003.

SATO, G. S.; ASSUMPÇÃO, R. Mapeamento e análise da produção do caqui no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v. 32, n. 6, p. 47–54, 2002.

SHOUKOUHI, P.; BISSETT, J. **Preferred primers for sequencing the 5’ end of the translation elongation factor 1- α gene (eEF1a1)**. Disponível em: <http://www.isth.info/methods/method.php?method_id=9>. Acesso em: 21 nov. 2016.

SILVA, A. DOS S. et al. Molecular fingerprinting of Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae isolates using AFLP markers. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 2, p. 108–115, 2013.

SILVA, M. G. DA et al. Temperature and light intensity interaction on Cercospora coffeicola sporulation and conidia germination. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 2, p. 198–204, 2016a.

SILVA, M. et al. Exploring fungal mega-diversity: *Pseudocercospora* from Brazil. **Persoonia**, v. 37, p. 142–172, 2016b.

SILVA, M. F. et al. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribaea* e *C. henningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 54–58, 1988.

SPEGAZZINI, C. Mycetes Argentinenses (Series V). **Anales del Museo Nacional de Historia Natural**, p. 329–467, 1910.

TEMPLETON, A. R.; CRANDALL, K. A.; SING, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, n. 2, p. 619–33, out. 1992.

VAGHEFI, N. et al. Cryptic diversity, pathogenicity, and evolutionary species boundaries in **Cercospora** populations associated with Cercospora leaf spot of Beta vulgaris. Fungal Biology, v. 122, n. 4, p. 264–282, 2018.

VALE, P. A. S. **Caracterização de *Cercospora coffeicola* por filogenia molecular multigênica**. 2016. 64p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

VIDEIRA, S. I. R. et al. Elucidating the *Ramularia eucalypti* species complex. **Persoonia**, v. 34, p. 50–64, jun. 2015.

VOIGT, K.; KIRK, P. M. Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 41–57, 20 abr. 2011.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Eds**.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. 1. ed. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

YAN, D.-H. et al. ITS2 sequence–structure phylogeny reveals diverse endophytic *Pseudocercospora* fungi on poplars. **Genetica**, v. 146, n. 2, p. 187–198, 2018.

ZHU, X. J. et al. Endophytic fungi from *Camellia sinensis* show an antimicrobial activity against the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **International Journal of Experimental Botany**, v. 83, p. 57–63, 2014.

Apêndice

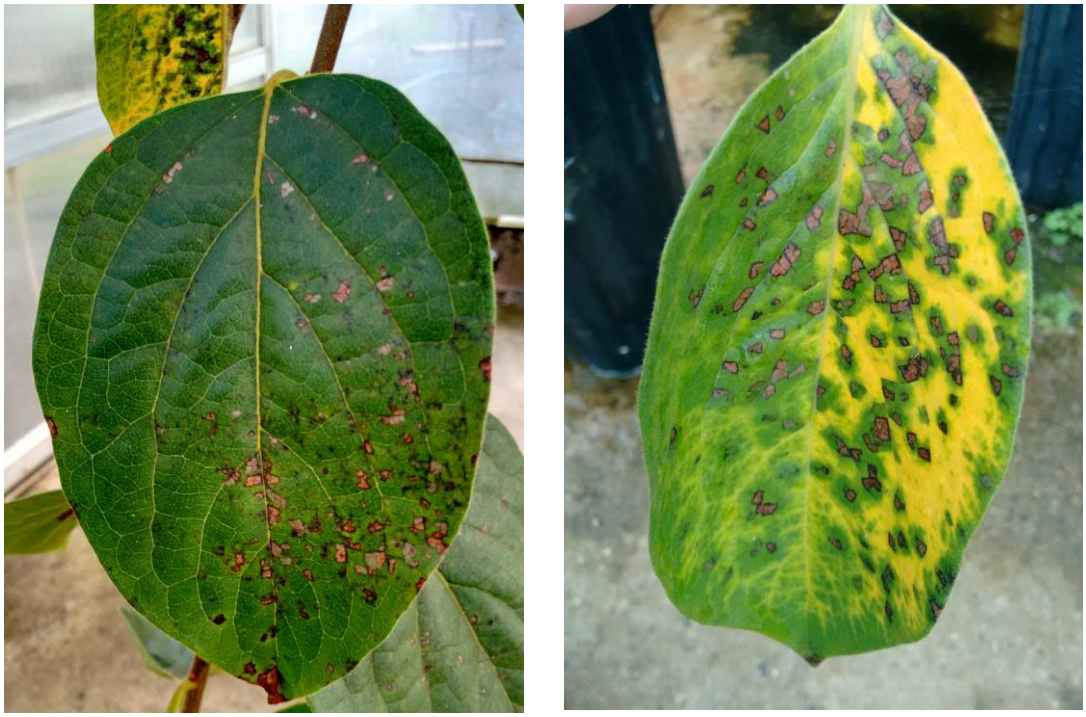

Figura 1A. Folhas de caquizeiro ‘Fuyu’ após 60 dias da inoculação com *Pseudocercospora* sp. CC28.

4. HISTOPATOLOGIA DA CERCOSPORIOSE EM FOLHAS DE CAQUIZEIROS

Resumo

Entre as doenças foliares da cultura do caquizeiro, a cercosporiose se destaca como sendo a doença mais importante da cultura. Apesar da importância dessa doença, não há estudos da interação patógeno-hospedeiro, principalmente relacionados a infecção e colonização do fungo nos tecidos foliares do caquizeiro. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar os processos de infecção e colonização do agente causal da cercosporiose em folhas de caquizeiro 'Fuyu' através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e observação de cortes histopatológicos. Cada conídio formou de 2 a 3 tubos germinativos, principalmente, de forma bipolar 24 horas após a inoculação. A penetração do patógeno ocorreu através dos estômatos, mas não foi observado tropismo positivo em direção aos estômatos. A medida que a lesão foi se desenvolvendo, houve colapso e rompimento das células do parênquima paliçádico, lacunoso e da epiderme. A esporulação do patógeno ocorreu somente na face adaxial das folhas, com o rompimento da epiderme e, consequentemente, exposição do esporodóquio ao exterior do tecido foliar. No processo de colonização foram observadas hifas crescendo nos espaços intercelulares do parênquima paliçádico. Compostos fenólicos foram acumulados no tecido infectados, porém não foram capazes de conter o processo de colonização. Os testes histoquímicos também revelaram o acúmulo de pectina nas células da extensão da bainha foliar e a presença de compostos lipofílicos nas áreas lesionadas. Nos espaços intercelulares foram observadas vesículas, somente nas regiões com a presença de hifas do patógeno. Essas vesículas podem estar envolvidas na degradação da parede celular do hospedeiro.

Palavras-chave: MEV; Histopatologia; Histoquímica

Abstract

Among foliar disease on persimmon crop, angular leaf spot, is the major foliar disease in the crop. Despite the importance of the disease, there are no histopathological reports on this pathogen interaction with persimmon tissues. Therefore, the aim of this study was to elucidate the infection and colonization process of the causal agent of angular leaf spot in 'Fuyu' persimmon leaves by scanning electron microscopy (SEM) and observation of histologic cuts. From two to three germ tubes were produced in most of the conidia, mainly, bipolar form 24 hours after inoculation. The germ tubes entered the leaf tissue through the stomata, but was not observed positive tropism to stomata. Collapse and rupture of palisade parenchyma, spongy parenchyma and epidermal cells, totally changing the leaf blade, were observed with lesion development. The sporulation of the pathogen occurred on the adaxial side of the leaves with the sporodochium broke through epidermis and consequent exposure of the to the outside of the leaf. In the colonization process, hyphae were observed growing in the intercellular spaces of the palisade parenchyma. Phenolic compounds were accumulated in the infected tissue; however, they did not prevent the

colonisation progress. Histochemical studies showed accumulation of pectin in the bundle sheath extension cells and the presence of lipophilic compounds in the injured areas. Vesicles were observed in the intercellular spaces, only in regions with the presence of hyphae. These vesicles possibly are involved in the degradation of the host cell wall.

Keywords: MEV; Histopathology; Histochemistry

4.1. Introdução

A cercosporiose é a principal doença foliar do caquizeiro (*Diospyrus kaki*) e se manifesta pelo aparecimento de manchas em ambas as faces do limbo foilar. As manchas são delimitadas pelas nervuras, tomando um aspecto angular, com tamanho entre 1 e 8 mm, coloração escura a pardo-avermelhada e bordos bem definidos (BASSANEZI et al., 2016). A cercosporiose causa queda precoce de folhas, o que prejudica o acúmulo de reservas no sistema radicular e, consequentemente, reduz a produção do ano seguinte (PENTEADO, 1986). As cultivares de caqui apresentam diferentes níveis de resistência a cercosporiose. As cultivares Fuyu, Giro, Hatiya, são caracterizadas como suscetíveis; Rama-forte, Giombo e Luiz de Queiroz, como medianamente suscetíveis; e Taubaté e Traço Cagui como resistentes (NAMEKATA; TOKESHI, 1964).

O processo de penetração de fitopatógenos em tecidos dos hospedeiros pode ocorrer de três maneiras distintas: diretamente pela superfície do tecido, por aberturas naturais ou por de ferimentos. Entre os fitopatógenos, os fungos, são os mais versáteis, pois podem penetrar por qualquer uma das três vias (AGRIOS, 2005). Apesar da importância da cercosporiose na cultura do caquizeiro, ainda não foram realizados trabalhos que abordem o ciclo da relação patógeno-hospedeiro, como as características do processo de infecção e colonização pelo fungo agente causal da doença. O conhecimento sobre o ciclo é de grande importância para estudos de resistência e viabilidade do patógeno (SOUZA et al., 2011). Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar os processos de infecção e colonização do agente causal da cercosporiose em folhas de caquizeiros .

4.2. Material e métodos

4.2.1. Avaliação do processo de pré-penetração do agente causal da cercosporiose por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folhas de caquizeiro

Para a inoculação do patógeno em folhas de caquizeiro, utilizou-se o isolado monospórico, agente causal da cercosporiose, obtido e caracterizado nessa tese, o qual pertence ao gênero *Pseudocercospora*. Folhas da cultivar Fuyu, com mais de 30 dias de idade, obtidas de plantas cultivadas em casa de vegetação, foram inoculadas com o agente causal da cercosporiose, na face abaxial e adaxial da superfície foliar com gotas 70 µl de suspensões na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} de água destilada em uma área delimitada de 1 cm^2. As folhas inoculadas foram mantidas em câmara úmida a 25ºC no escuro por dois períodos para avaliação, 24 e 48 horas. Após cada período de inoculação, 8 fragmentos foliares de 8mm de diâmetro de folhas sadias e folhas inoculadas, foram imersos e fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Após a fixação, foi realizada a desidratação em acetona (10, 30, 50, 70, 90, 100 e 100 %) e as amostras foram secas pelo método do ponto crítico de CO_2 (HORRIDGE; TAMM, 1969). Todas as amostras foram montadas sobre suportes de alumínio, cobertos com uma película de papel alumínio, sobre fitas de carbono dupla face. Após o processo de desidratação, as amostras dos dois processos foram cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Prof. Elliot Watanabe Kitajima, ESALQ-USP.

As análises e a digitalização das imagens foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo LEO 435VP, operado a 20kv com as escalas impressas diretamente nas eletromicrografias.

4.2.2. Histopatologia de infecção e colonização do agente causal da cercosporiose do caquizeiro

Para inoculação do isolado monospórico pertencente ao gênero *Pseudocercospora*, agente causal da cercosporiose do caquizeiro, foram utilizadas

três mudas da cultivar Fuyu, com folhas totalmente expandidas com mais de 30 dias de idade. Para cada muda, uma folha foi inoculada na sua face abaxial com a deposição de uma gota de 70ul de suspensão de conídios na concentração de 10^5 conídios mL^{-1} de água destilada em uma área delimitada de 1 cm^2. Após a inoculação, as plantas foram colocadas em câmara úmida por 48 horas no escuro. Posteriormente, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento e mantidas a 25ºC com fotoperíodo de 12 horas por 45 dias. Três mudas da cultivar Fuyu foram utilizadas como controle, onde depositou-se 70 ul de água destilada.

Amostras do material sadio e inoculado foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Durante a fixação as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos e então desidratadas em série etanólica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) e infiltradas em hidroxi-etilmetacrilato (Leica Historesin®), conforme recomendação do fabricante. Os blocos foram seccionados a 5 – 10 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045 com o auxílio de uma navalha de aço do tipo C. Em seguida, as lâminas foram depositadas sobre uma placa aquecedora a 40ºC para a secagem e fixação das secções na lâmina. As secções foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato-citrato a pH 4-6 (SAKAI, 1973), montados entre lâmina e lamínula com resina sintética “Entellan” para as análises anatômicas usuais. Para os testes histoquímicos as amostras infiltradas em historesina foram submetidas a corantes e reagentes específicos. Para a localização de paredes suberificadas e cutinizadas e também para detecção de substâncias lipofílicas foi utilizado Sudan Black B (JENSEN, 1962); para evidenciar compostos fenólicos foi utilizado o cloreto férrico (JOHANSEN, 1940); para mucilagem e substâncias pécticas foi utilizado o vermelho de rutênio (JOHANSEN, 1940); e para verificar a presença de compostos proteicos foi utilizado xylidine Ponceau (CORTELAZZO; VIDAL, 1991). Para a verificação do aspecto natural do tecido foliar, foram montadas secções do material somente em água, isto é, sem tratamento e observadas ao microscópio de luz. As lâminas obtidas foram analisadas com o auxílio do microscópio de luz e as imagens foram capturadas com o auxílio do microscópio trinocular Leica DM 5500.

4.3. Resultados

4.3.1. Avaliação do processo de pré-penetração do agente causal da cercosporiose por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em folhas de caquizeiro

A germinação conidial seguiu um padrão aleatório, sendo emitidos de dois a três tubos germinativos por conídio depositado, em ambas as faces da superfície foliar, 24 horas após a inoculação (hai).

Em ambas as faces foliares foram observadas um alongamento do tubo germinativo 48 hai (Figura 1A e 1B). Não foi observado crescimento direcionado do tubo germinativo, nem a formação de apressório ou penetração direta em até 48 hai em ambas as faces da folha. Na maioria das vezes, o tubo germinativo passou sobre os estômatos ou desviou das células guarda (Figura 1C e 1D). Entretanto, foi possível observar penetração do tubo germinativo via estômato (Figura 1E e 1E).

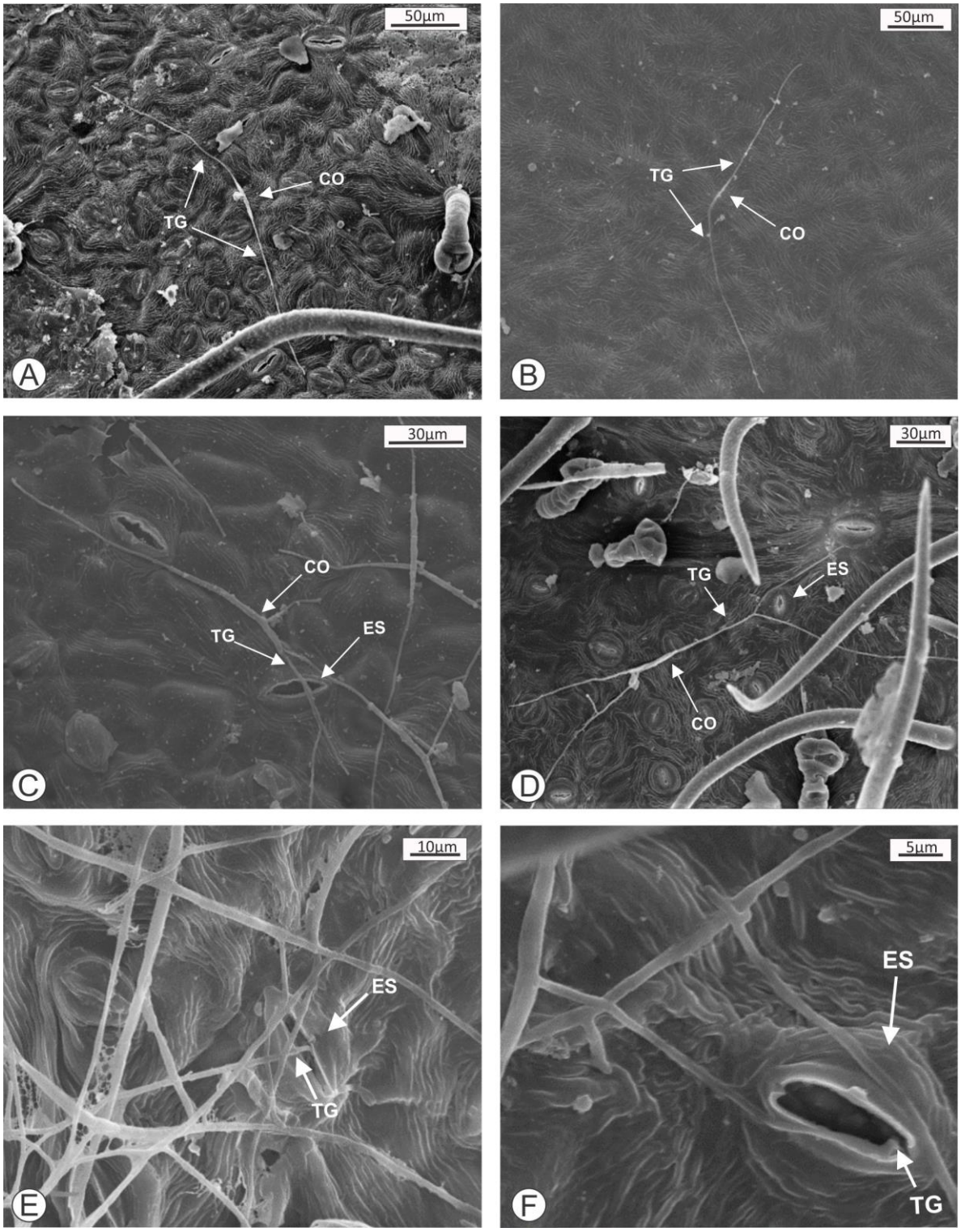

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de folhas de caquizeiro cultivar Fuyu inoculadas com o agente causal da cercosporiose. A-B. Crescimento de dois tubos germinativos através de uma germinação bipolar de conídios. A. Germinação na parte abaxial da folha 48 hai. B. Germinação na parte adaxial da folha 48 hai. C. Tubo germinativo atravessando o estômato sem penetração 48 hai. D. Tubo germinativo desviando das células guardas 48 hai. E-F. Penetração do tubo germinativo através do estômato 24 hai. ES- Estômato; CO- Conídio; TG- Tubo Germinativo.

4.3.2. Histopatologia de infecção e colonização do agente causal da cercosporiose do caquizeiro

As folhas sadias do caquizeiro apresentaram mesofilo heterogênio com simetria dorsiventral (Figura 2A e 2B). As células do parênquima paliçado são formadas por somente uma camada de células alongadas dispostas lado a lado e separadas por pequenos espaços intercelulares, em contrapartida, o parênquima lacunoso é composto por mais de uma camada de células com formatos variáveis e amplo espaço intercelular (Figura 2A e 2B). Não foi verificado acúmulo de pectina na bainha do feixe (Figura 2C). A quantidade de celulose entre as células do mesofilo foi ligeiramente superior nas células do feixe vascular e mais semelhante entre as demais células (Figura 2D).

As lesões formadas apresentaram coloração pardo-avermelhada com bordos escuros e delimitadas pelas nervuras (Figura 3A, 3B). As nervuras foram as principais barreiras que evitaram o crescimento das lesões nas folhas inoculadas (Figura 3C). A esporulação do patógeno ocorreu na face adaxial das folhas com o rompimento da epiderme e consequente exposição do esporodóquio (Figura 3D). Pode-se observar redução na espessura foliar entre as áreas lesionadas em relação ao tecido adjacente das lesões (Figura 3E). A medida que a lesão se desenvolveu ocorreu o colapso das células do parênquima paliçádico e lacunoso tornando impossível delimitar os parênquimas, devido a desorganização e rompimento celular (Figura 3F). Os testes histoquímicos revelaram maior acúmulo de compostos fenólicos nas áreas lesionadas, acúmulo de pectina na bainha do feixe vascular e acúmulo de compostos lipofílicos nas lesões (Figura 3G, 3H e 3I).

Nos cortes realizados nas nervuras, para observação do feixe vascular, pode-se verificar o acúmulo de substâncias desconhecidas nos vasos do xilema (Figura 4A e 4B). O crescimento de hifas do patógeno foi observado no amplo espaço intercelular do parênquima paliçádico (Figura 4C). Verificou-se o aparecimento de vesículas nos espaços intercelulares em regiões com a presença de hifas do patógeno (Figura 4D). Verificou-se, também, a adesão de vesículas a parede celular em áreas lesionadas e alterações na parede em algumas regiões das células (Figura 4G E 4H). Os testes histoquímicos com vermelho de rutênio, para detecção de proteínas, e Sudan Black B, para detecção de lipídios, utilizados para determinar a composição das vesículas, indicaram que as vesículas observadas

possuem composição lipofílica devido a reação mais intensa ao Sudan Black B (Figura 4E e 4F).

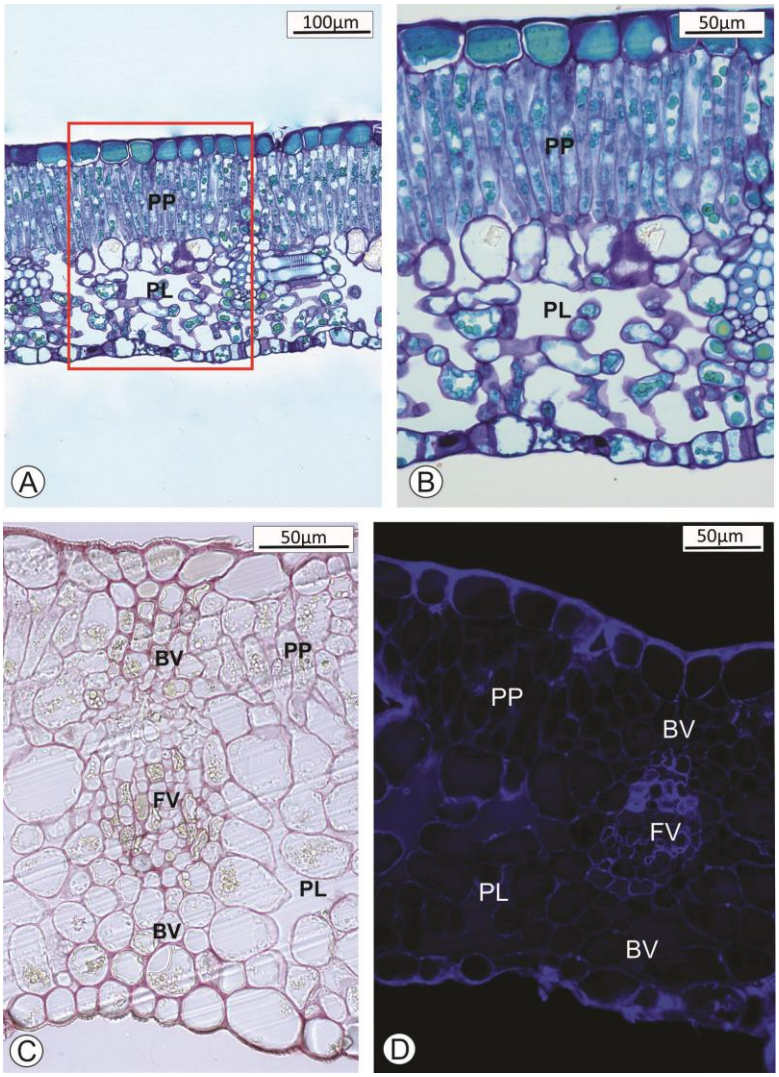

Figura 2. Secções transversais de folhas de caquizeiro 'Fuyu' sadio. A. Anatomia foliar de cortes corados com azul de toluidina. B. Detalhe do corte em A. C. Teste com vermelho de rutênio para detecção de pectina. D. Corante de fluorescência calcofluor, fluorescência azul indica o acúmulo de celulose. BV- Bainha Vascular; FV- Feixe Vascular; PL-Parênquima Lacunoso; PP- Parênquima Paliçádico.

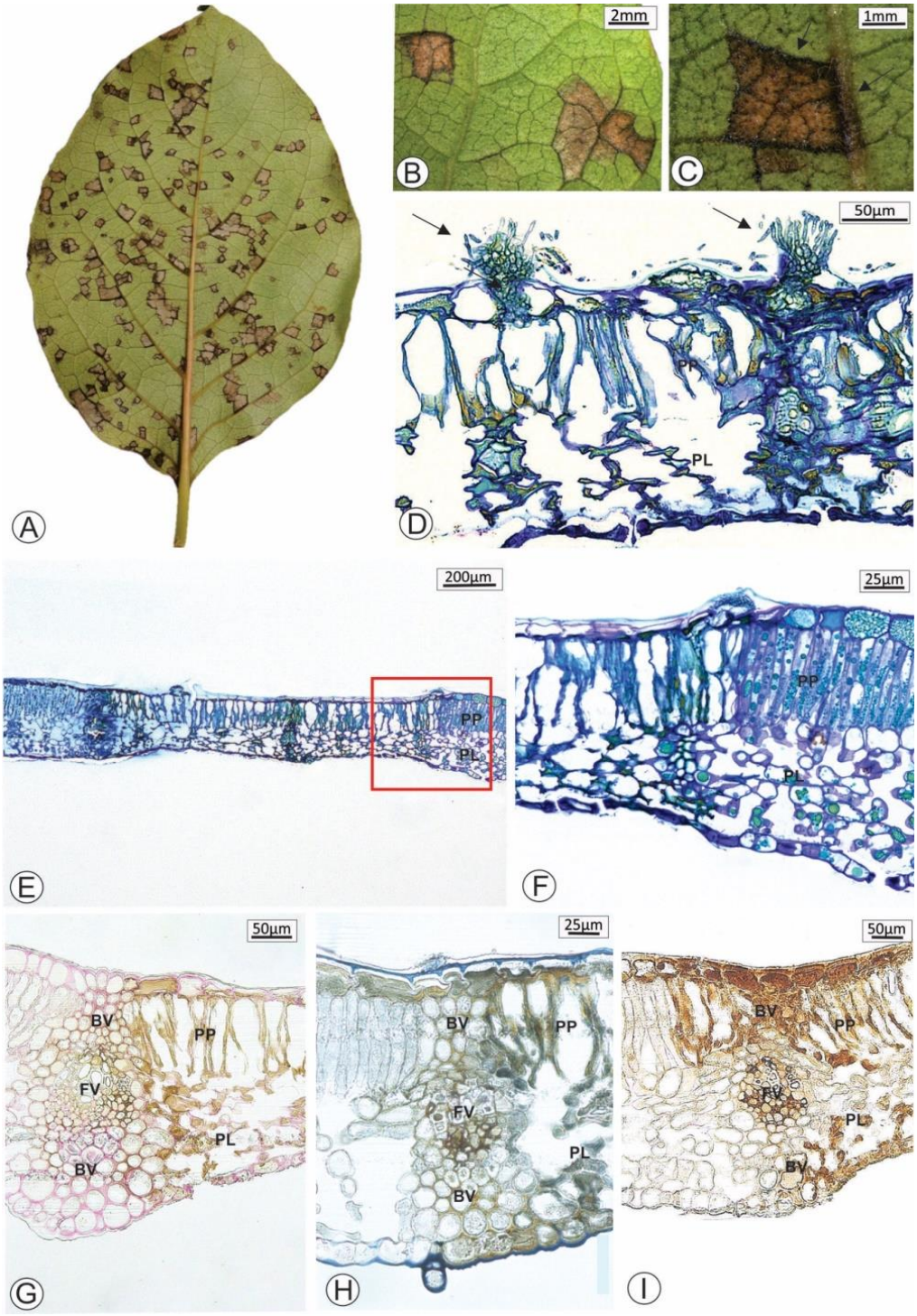

Figura 3. Folha de caquizeiro 'Fuyu' com sintomas de cercosporiose. A-C. Análise de folhas ao estéreo microscópio. D-I. Secção transversal da lesão. A. Visão geral da folha lesionada. B-C. Detalhe das lesões em formatos angulares indicando a delimitação pelas nervuras (setas). D. Mesofilo na região central da lesão é comprometido pela necrose de todos tecidos. Notar os esporodóquios (setas) na superfície adaxial da folha. E. Visão geral da lesão. F. Zona de transição entre o tecido lesionado e não lesionado onde é possível verificar alterações na cutícula. G-I. Testes histoquímicos na região de transição. G. Teste com vermelho de Rutênio indicando paredes da extensão da bainha do feixe vascular com acúmulo de pectina. H. Teste com Sudan Black B indicando o acúmulo de compostos lipofílicos (material enegrecido). I. Teste com cloreto férrico indicando o acúmulo de fenol (castanho). BV- Bainha Vascular; FV-Feixe Vascular; PP- Parênquima Paliçádico; PL-Parênquima Lacunoso.

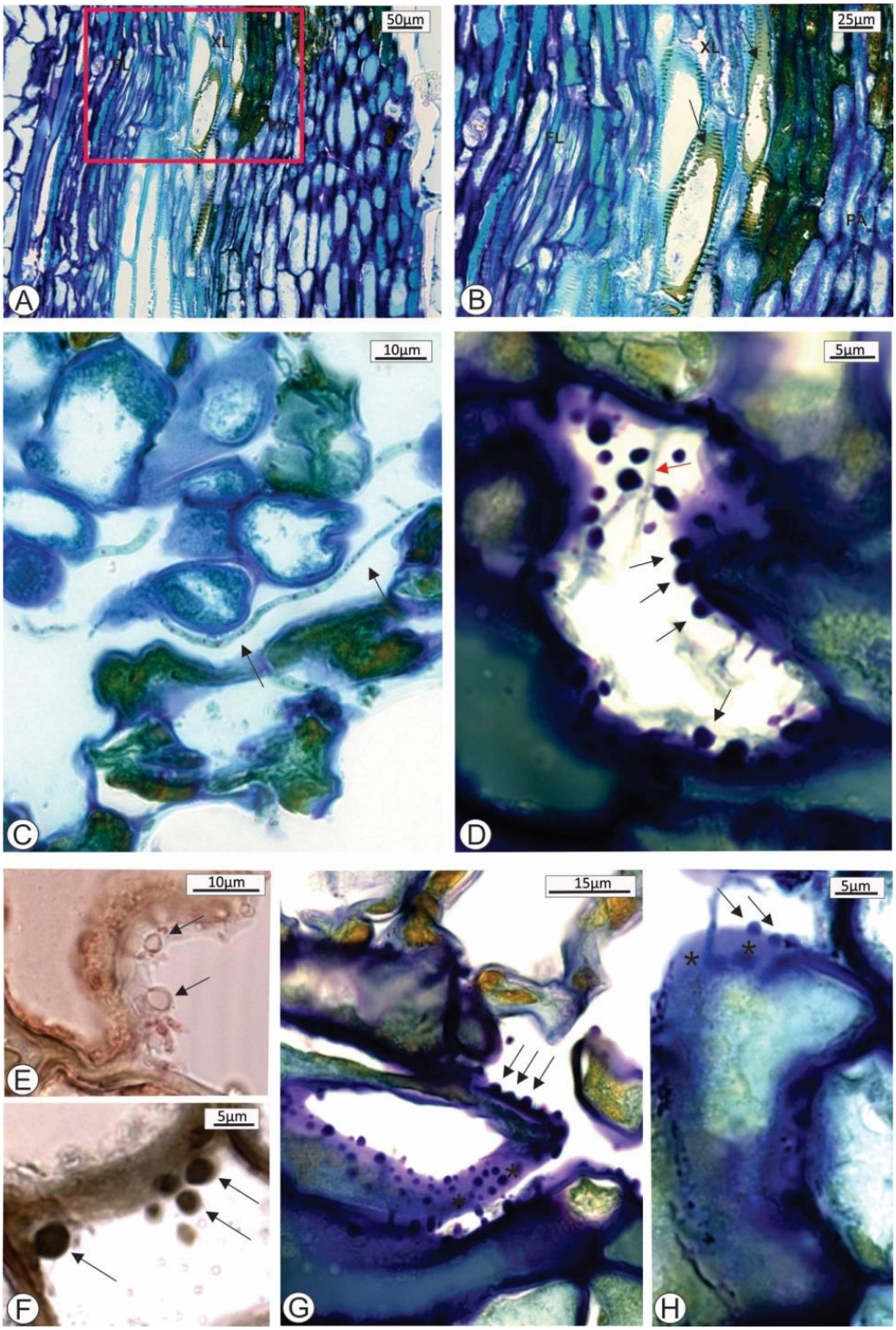

Figura 4. Micrografias de secções transversais das regiões do bordo de lesões de folhas de caquizeiro 'Fuyu' infectadas pelo agente causal da cercosporiose. A-B. Análise do xilema onde é observado acúmulo de substâncias desconhecidas nos vasos. B. Detalhe do quadrado em A. C-H. Por menores do processo de degradação da parede celular vegetal. C. Crescimento intercelular de hifas. D. O fungo produz vesículas (setas vermelha) que são liberadas no espaço intercelular. E. Teste com Xylidine Ponceu para detecção de proteínas (Setas). F. Testes com Sudan Black B indicou que as vesículas apresentam para compostos lipofílicos (setas). Essas vesículas são depositadas nas paredes celulares da planta (setas em G e H) e alteram a sua integridade (asteriscos). XL- Xilema; FL- Floema; PA- Parênquima.

4.4. Discussão

A germinação dos conídios ocorreu, principalmente, de forma basal e mais raramente no meio dos esporos. Cada conídio produziu de dois a três tubos germinativos e a formação do apressório não foi observada. A formação de vários tubos germinativos é característica de diversas espécies de fungos cercosporoides. Em *Cercospora coffeicola* foi observado a formação média de 3 tubos germinativos por conídio (SOUZA et al., 2011). Em *Cercospora moricola* e *Cercospora henningsii* em amora e mandioca, respectivamente, foram observados vários tubos germinativos formados por conídio (BABU et al., 2009; GUPTA et al., 1995). A presença de múltiplos tubos germinativos pode favorecer a infecção e aumentar a agressividade do patógeno (BABU et al., 2009).

A penetração do fungo ocorreu via estômato, não sendo verificada penetração direta ou por ferimentos. Fungos cercosporoides apresentam diversas vias de penetração que variam entre espécies. A penetração pode ocorrer através da epiderme; como por exemplo, para *Cercospora henningsii* em folhas de mandioca (BABU et al., 2009); pela epiderme e estômatos, como em *Cercospora arachidicola* no amendoim ou somente pelos estômatos como em *Pseudocercospora macadamiae* em macadâmia (MILES et al., 2009), *Cercospora beticola* em beterraba (RATHAIAH, 1977) e *Pseudocercospora musae* em folhas de bananeira (FREITAS et al., 2017).

O crescimento aleatório dos tubos germinativos, que foi verificado neste trabalho, pode ter ocorrido devido a influência da água livre durante todo o período de inoculação. Beckman & Payne (1983), relataram que *Cercospora zeae-maydis* precisa de umidade relativa do ar próxima de 98% para que a infecção ocorra, mas a presença de água livre na superfície foliar pode diminuir a capacidade do fungo em localizar os estômatos, fazendo com que os tubos germinativos tornem-se mais alongados. Caso durante o crescimento do tubo germinativo o filme d'água seja removido, o tropismo volta a ser eficiente e a localização dos estômatos favorecida.

Neste trabalho a esporulação só foi observada na face adaxial da folha com o rompimento da epiderme pelos esporodóquios, entretanto, esse comportamento não é comum a fungos cercosporoides. Na maioria dos casos a esporulação ocorre através dos estômatos, como observado em *Pseudocercospora musae* em folhas de banana (FREITAS et al., 2017), *Cercospora beticola* em folhas de cártamo (LARTEY

et al., 2007), *Pseudocercospora mori* em folhas de amora (BABU; KUMAR, 2002) e *Phaeoisariopsis griseola* em folhas de feijão (MONDA; SANDERS; HICK, 2001). Porém, outras formas de esporulação também podem ser observadas, como ao redor do estômato em *Cercospora coffeicola* (SOUZA et al., 2011), subepidérmicas em *Pseudocercospora macadamiae* (MILES et al., 2009) e, em alguns casos, por diversas vias como ocorre em *Cercospora hennigsii* na mandioca, no qual o patógeno pode esporular rompendo a epiderme adjacente ao estômato, através do estômato ou através das papilas da epiderme (BABU et al., 2009).

O crescimento das lesões foi limitado pela presença das nervuras, porém não foi observado elevadas concentrações de celulose na parede celular das células da bainha vascular que, ocasionalmente, junto com o feixe vascular poderiam funcionar como uma barreira física a colonização do patógeno. Portanto, a limitação das lesões pelas nervuras, deve estar relacionada a outros mecanismos. Segundo Monda; Sanders e Hick (2001), o formato angular das lesões de *Phaeoisariopsis griseola*, em folhas de feijoeiro, são decorrentes da incapacidade do patógeno em penetrar as nervuras, devido a falta de espaços intercelulares que restringe a colonização do patógeno.

Os testes histoquímicos revelaram o acúmulo de compostos fenólicos nas células dos parênquimas e epiderme das regiões infectadas, porém não foram capazes de conter o processo de colonização. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas que desempenham um importante papel na resistência à fitopatógenos (KULBAT, 2016). Resultados semelhantes ao observado neste estudo também foram obtidos por Sanchez-Garcia et al. (2013) ao inocular *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka-Negra, em folhas de bananeira. Os autores observaram o acúmulo de fenol desde o início do aparecimento das primeiras lesões que gradualmente aumentou com o progresso dos sintomas, variando de 29 $\mu g.cm^2$ a 79 $\mu g.cm^2$, embora não tenha sido o suficiente para conter o desenvolvimento do patógeno. Em contrapartida, Rodríguez et al. (2004), comparando a colonização de *Sclerotinia sclerotiorum* entre variedades resistentes e suscetíveis de girassol, verificou que nas variedades resistentes ocorreu o acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos da corola e estilete, prevenindo o desenvolvimento do patógeno. Essa resposta foi mais fraca nas variedades suscetíveis e ocorreu somente no estilete, possibilitando o desenvolvimento do patógeno até atingir o ovário. Além disto, segundo os autores, o

acúmulo de compostos fenólicos nas variedades resistentes ocorreu somente na presença do patógeno, constituindo uma resposta induzida.

O acúmulo de pectina observado nos espaços intercelular das células das paredes da extensão da bainha do feixe vascular pode ser o resultado da atividade de pectinases liberadas pelo patógeno. Resultados semelhantes foram obtidos por Braga et al. (2019) ao avaliar regiões infectadas por *Elsinoë ampelina*, agente causal da antracnose da videira, no qual foi observado acúmulo de pectina nos espaços intercelulares.

Durante a observação dos cortes histológicos, foram encontradas vesículas em regiões com grande quantidade de hifas. A presença dessas vesículas sugere que a sua formação seja resultado decorrente da interação entre planta-patógeno. A reação do corante Sudan Black B às vesículas extracelulares sugere a presença de lipídios na parede vesicular. Essa reação reforça a hipótese da origem das vesículas estar associada a interação planta-patógeno, pois a parede das vesículas extracelulares liberadas pelas células são compostas por uma camada dupla de lipídios (MARCILLA et al., 2014). Diversas moléculas fúngicas, incluindo proteínas, lipídios, polissacarídeos e pigmentos, são liberados para o espaço extracelular em vesículas. Em fungos patogênicos, vários desses componentes vesiculares estão associados à patogenicidade (RODRIGUES et al., 2011).

A adesão das vesículas a parede celular e consequente desarranjo na estrutura da parede, indicam um possível envolvimento de enzimas relacionadas a degradação da parede celular (*cell wall–degrading enzyme* - CWDE) nos cortes histológicos. As CWDEs são direcionadas para a lise de celulose, xilano e pectina, devido a capacidade de degradar os polímeros da parede celular (ANDERSON, 1978). Essas enzimas são de grande importância para fitopatógenos que não possuem estrutura especializada de penetração (KUBICEK; STARR; GLASS, 2014), como verificado para *Pseudocercospora* do sudeste brasileiro. Portanto, este estudo mostrou que a penetração do isolado patogênico do fungo agente causal da cercosporiose, pertencente ao gênero *Pseudocercospora*, ocorreu somente na parte adaxial da folha e a colonização do patógeno resultou no colapso do parênquima e epiderme, com o acúmulo de compostos fenólicos que não previnem a colonização e a degradação do tecido do hospedeiro. Devido a complexidade do processo avaliado, mais estudos são necessário para elucidar detalhadamente cada processo envolvido na interação planta-patógeno durante o processo de colonização.

Referências

AGRIOS, G. N. Parasitism and disease development. In: AGRIOS, G. N. (Ed.) . **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005. p. 77–104.

ANDERSON, A. J. Extracellular Enzymes Produced by *Colletotrichum lindemuthianum* and Helminthosporium maydis During Growth on Isolated Bean and Corn Cell Walls. **Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 1585–1589, 1978.

BABU, A. M. et al. Scanning Electron Microscopy of the Infection Process of *Cercospora henningsii* on Cassava Leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 1, p. 57–62, 2009.

BABU, A. M.; KUMAR, V. Surface ultrastructural studies on the infection process of *Pseudocercospora mori* causing grey leaf spot disease in mulberry. **Mycological Research**, v. 106, n. 8, p. 938–945, 2002.

BASSANEZI, R. B. et al. Doenças do caquizeiro. In: AMORIM, L. et al. (Eds.). . Manual de Fitopatologia. **Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. 5. ed. OURO FINO: CERES LTDA., 2016. p. 243–249.

BRAGA, Z. V. et al. Histopathology of infection and colonisation of *Elsinoë ampelina* on grapevine leaves. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1–11, 14 mar. 2019.

CORTELAZZO, A. L.; VIDAL, B. C. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 14, n. 1, p. 27–33, 1991.

FREITAS, A. S. et al. Infection process of *Pseudocercospora musae* on banana leaf. **Phytoparasitica**, v. 45, p. 317–324, 2017.

HORRIDGE, G. A.; TAMM, S. L. Critical Point Drying for Scanning Electron Microscopic Sthdy of Ciliary Motion. **Science**, v. 163, p. 817–818, 1969.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principle and practice**. San Francisco: W.H. Freeman, 1962.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 1. ed. London: McGraw-Hill Book Company, 1940.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 137–138, 1965.

KUBICEK, C. P.; STARR, T. L.; GLASS, N. L. Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 427–451, 4 ago. 2014.

LARTEY, R. T. et al. Comparative Structural Study of Leaf Spot Disease of Safflower and Sugar Beet by *Cercospora beticola*. **Plant Pathology Journal**, v. 6, n. 1, p. 37–43, 1 jan. 2007.

MARCILLA, A. et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 1, p. 25040, 22 jan. 2014.

MILES, A. K. et al. Infection, colonisation and sporulation by *Pseudocercospora macadamiae* on macadamia fruit. **Australasian Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 36, 2009.

MONDA, E. O.; SANDERS, F. E.; HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology**, v. 50, p. 103–110, 2001.

NAMEKATA, T.; TOKESHI, H. Controle da cercosporiose do caqui. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 21, p. 239–246, 1964.

PENTEADO, S. R. **Fruticultura de clima temperado em São Paulo**. Campinas: Campinas Fundação Cargill, 1986.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular transport systems in fungi. **Future microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1371–81, nov. 2011.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. **Stain technology**, v. 48, n. 5, p. 247–249, 1973.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 1, p. 6–11, jan. 2011.