

ANDRÉ GOMES COELHO DE SOUZA

VARIABILIDADE FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE
Cercospora coffeicola

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

ANDRÉ GOMES COELHO DE SOUZA

VARIABILIDADE FISIOLÓGICA DE ISOLADOS DE
Cercospora coffeicola

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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2007

Prof. Eduardo Seiti Gomide
Mizubuti
(Co-Orientador)

Prof. Acelino Couto Alfnas
(Co-Orientador)

Prof. Francisco Xavier Ribeiro do
Vale

Dr. Hudson Teixeira

Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

Ofereço

a minha avó, Alair Gomes Coelho,
e a Ana Rita de Paiva Toledo, pela
presença e carinho.

Dedico

a meus pais Elenita Gomes Coelho
de Souza e José Leandro de Souza;
e a meus irmãos Thiago José
Gomes Coelho de Souza e Leandro
Gomes Coelho de Souza.

AGRADECIMENTOS

A Deus por inspirar minhas ações e acompanhá-las com teu auxílio.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela ajuda financeira.

Ao Prof. Luiz Antonio Maffia, pela dedicação, amizade e ensinamentos.

Ao pesquisador Hudson Teixeira, pela colaboração, incentivo, sugestões e críticas durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Eduardo S. G. Mizubuti, Acelino Couto Alfenas e Francisco Xavier Ribeiro do Vale pelas sugestões e críticas.

Aos demais professores do departamento de fitopatologia, pelos ensinamentos durante o curso.

A todos os colegas do laboratório de epidemiologia pelos momentos descontraídos e difíceis passados juntos.

A todos os amigos pelo convívio diário e momentos de descontração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

André Gomes Coelho de Souza, filho de José Leandro de Souza e Elenita Gomes Coelho de Souza, nasceu em 29 de maio de 1979, em Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais.

Em 2000, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa (MG), onde graduou-se em janeiro de 2005.

Em março do mesmo ano, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (MG).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos	3
2.1. Esporulação	3
2.2. Produção de cercosporina	4
2.3. Crescimento micelial.....	4
2.4. Componentes epidemiológicos em mudas de duas variedades de café, adubadas ou não com cloreto de potássio, e mantidas em diferentes temperaturas pós-inoculação.....	4
2.5. Análise dos dados.....	6
3. Resultados.....	7
3.1. Esporulação	7
3.2. Produção de cercosporina	7
3.3. Crescimento micelial	8
3.4. Componentes epidemiológicos em mudas de duas variedades de café, adubadas ou não com cloreto de potássio, e mantidas em diferentes temperaturas pós-inoculação.....	9
3.4.1. Período de incubação e período latente.....	9
3.4.2. Severidade.....	10
3.4.3. Desfolha.....	11
4. Discussão.....	12

5. Conclusões.....	16
6. Referências Bibliográficas	17

RESUMO

SOUZA, André Gomes Coelho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2007. **Variabilidade fisiológica de isolados de *Cercospora coffeicola***. Orientador: Luiz Antonio Maffia. Co-Orientadores: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Acelino Couto Alfenas.

Apesar da importância da mancha-de-olho-pardo (cercosporiose) do cafeeiro, há poucos estudos relacionados à definição de metodologia de trabalho com *Cercospora coffeicola*. Em testes *in vitro* e *in vivo*, estudou-se a variabilidade de 60 isolados do patógeno, obtidos de três regiões e de dois sistemas de cultivo em Minas Gerais. No laboratório, avaliaram-se a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACC), produção de cercosporina a 18, 22 ou 26°C e esporulação a 25°C. Seis isolados selecionados foram inoculados em mudas das variedades Catuaí e Catucaí, adubadas ou não com KCl, e mantidas em câmara de crescimento a 18, 22 ou 26°C por 48 h após a inoculação. Em casa de vegetação, avaliaram-se: período de incubação (PI), período latente (PL), severidade da doença e desfolha. Detectou-se variabilidade entre os isolados, os quais foram separados em grupos quanto à esporulação, AACC e produção de cercosporina. Dos 60 isolados, 27 não esporularam. A produção de cercosporina e o crescimento micelial tenderam a crescer com o aumento da temperatura. Verificou-se correlação positiva entre: severidade e desfolha em Catuaí e Catucaí; severidade e produção de cercosporina em Catucaí; e adubação com KCl e severidade em ambas as variedades. Houve, também, correlação positiva entre os valores de PI e PL, e pode-se avaliar apenas um desses componentes, em estudos futuros. A variabilidade de isolados de *C. coffeicola* foi afetada pela temperatura, adubação potássica e genótipo do cafeeiro.

ABSTRACT

SOUZA, André Gomes Coelho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2007. **Physiological variability of *Cercospora coffeicola* isolates.** Adviser: Luiz Antonio Maffia. Co-Advisers: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Acelino Couto Alfenas.

Despite the importance of brown eye spot, there are few studies aiming to define methodology to work with the pathogen, *Cercospora coffeicola*. Therefore, variability of 60 isolates, from three regions and two growing systems in Minas Gerais was evaluated with *in vivo* and *in vitro* tests. At the laboratory, area under mycelial growth curve (AUGC), cercosporin production at 18, 22, or 26°C, and sporulation at 25°C were evaluated. Six isolates were selected and inoculated in seedlings of Catuaí and Catucaí varieties, either fertilized or not with potassium chloride, and kept in growth chamber at 18, 22, or 26°C for 48 h after inoculation. Incubation period (IP), latent period (LP), disease severity, and leaf fall were evaluated under greenhouse conditions. High variability among *C. coffeicola* isolates was detected concerning all the variables assessed. The isolates were sorted in groups according to sporulation, AUGC, and cercosporin production. Out of the 60 isolates, 27 did not sporulate. Cercosporin production and mycelial growth tended to increase with temperature. Positive correlations were detected between: severity and leaf fall for Catuaí and Catucaí; severity and cercosporin production for ‘Catucaí’; and potassium chloride and disease severity for both varieties. As IP and LP were also correlated, either one can be assessed in future studies. Variability of *C. coffeicola* was found to be affected by temperature, potassium fertilization, and plant genotype.

1. Introdução

Como o café (*Coffea arabica* L.) é uma “commodity” de grande importância na exportação brasileira, têm-se priorizado estudos para minimizar as perdas nas lavouras. As doenças são consideradas como o principal fator de perdas no cafeeiro. Dentre essas, encontra-se a mancha de olho pardo ou cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. A doença pode ocorrer severamente, da formação de mudas no viveiro até lavouras implantadas no campo, principalmente quando mal conduzidas (Fernández-Borrero et al., 1966; López-Duque & Fernández-Borrero, 1969). Com a expansão da cultura cafeeira para o cerrado e mudanças de variedades, de tratamentos culturais e do clima, as perdas ocasionadas pela cercosporiose se agravaram (Juliatti et al., 2000), e o controle da doença é preocupação constante dos produtores.

O método mais usado no controle da doença é o químico. No entanto, o uso excessivo de fungicidas envolve altos custos e gera preocupação de produtores e consumidores quanto aos problemas ambientais e de toxicidade. Ademais, com a expansão da cafeicultura orgânica, é imperioso investigar outras medidas de manejo da doença. Por muitos anos, a cercosporiose não foi problema sério, e há poucos trabalhos disponíveis sobre a biologia do patógeno, bem como sobre a epidemiologia e manejo da doença. Para se executarem esses trabalhos, é necessário se disporem de conhecimentos básicos. Por exemplo, é difícil obter a esporulação de *C. coffeicola in vitro* (Echandi, 1959; Buitrago-Jaramillo & Fernández-Borrero, 1982; Del Peloso et al., 1989; Rengifo, 2002) e só recentemente, desenvolveu-se metodologia adequada e reproduzível para tal (Souza et al., 2005). Adicionalmente, é comum obterem-se resultados variáveis em ensaios que envolvam inoculações do patógeno em condições controladas.

Considerando as interações do triângulo de doenças, fatores do patógeno, ambiente e hospedeiro determinam a ocorrência e a intensidade da cercosporiose. Isolados de *C. coffeicola*, de diferentes regiões colombianas, diferiram quanto a aspectos morfológicos, patogênicos e moleculares (González et al., 2000). Há, também, necessidade de se compararem isolados obtidos de diferentes regiões e sistemas de cultivo no Brasil. *Cercospora* spp. podem variar quanto à produção de cercosporina (Jenks et al., 1989; Brunelli, 2004; Almeida et al., 2005). Para vários autores, a agressividade de *Cercospora* spp. relaciona-se à cercosporina (Upchurch et al. 1991; Ehrenshaft et al., 1998; Callahan et al., 1999; Almeida et al., 2005), cuja biossíntese pode ser afetada por fatores do ambiente, como a temperatura (Fajola, 1978; Jenks et al.,

1989). Sabe-se que *C. coffeicola* produz cercosporina (Lynch & Geoghegan, 1977), mas faltam estudos em que se comparem isolados do patógeno quanto à produção da toxina.

A temperatura é fator condicionante à ocorrência e progresso de doenças. Para as doenças fúngicas, a temperatura afeta a esporulação, expansão da lesão, incidência e severidade (Carisse et al., 1993; Uddin et al., 2003; Paul & Munkvold, 2005). Para *C. coffeicola*, ainda não se têm relatos do efeito da temperatura sob diferentes isolados. A cercosporiose do cafeeiro é associada a estresses, principalmente nutricionais, e alguns autores relacionaram a adubação com potássio (K) à intensidade da doença (Pozza et al., 2000; Pozza et al., 2001; Garcia Júnior et al., 2003; Pozza et al., 2004; Santos Botelho et al., 2005). Porém, necessitam-se de estudos para se avaliar o efeito de adubação de K em mudas de diferentes cultivares, dado que a intensidade de cercosporiose é também afetada pelo genótipo do cafeeiro (Fernandes, 1989; Pozza et al., 2004).

O entendimento dos componentes epidemiológicos e da variabilidade de isolados de *C. coffeicola* é básico no sucesso de trabalhos de pesquisa, principalmente dos direcionados à epidemiologia e à definição de estratégias de manejo da cercosporiose, como obtenção de resistência e desenvolvimento de fungicidas. Assim, objetivou-se verificar a variabilidade entre isolados de *C. coffeicola* quanto à região e sistema de cultivo, por meio de testes *in vitro* e *in vivo*. Para tal, avaliou-se a variabilidade de 60 isolados, de diferentes regiões e sistemas de cultivos, quanto à influência da temperatura sobre a produção de cercosporina, crescimento micelial e esporulação. Estudou-se, também, a agressividade de seis isolados em mudas de Catuaí e Catucaí, adubadas ou não com KCl, e mantidas em diferentes níveis de temperatura pós-inoculação.

2. Material e Métodos

Realizaram-se os trabalhos no Laboratório de Epidemiologia, casa de vegetação, telado e câmara de crescimento do Departamento de Fitopatologia da UFV. Para todos os ensaios, adotaram-se procedimentos comuns, descritos a seguir.

Utilizaram-se 60 isolados de *C. coffeicola*, obtidos de três regiões de Minas Gerais (Zona da Mata, Triângulo Mineiro e Sul de Minas) e de dois sistemas de cultivo (convencional e o orgânico), da coleção do Laboratório de Epidemiologia. Os isolados foram armazenados a 5°C, em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) em tubos de ensaio, e cultivados em meio V8 sólido (200ml de suco V8, 800ml de água destilada e 20g de ágar), em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, ou V8 líquido, em Erlenmeyers de 25 ml.

Cada experimento descrito a seguir foi executado por duas vezes, em delineamento inteiramente casualizado. A não ser quando especificado, em cada execução do experimento utilizaram-se três repetições. Como uma unidade experimental, em 2.1 a 2.3, considerou-se uma placa de Petri e, em 2.4, uma muda de cafeeiro com dois pares de folhas definitivas.

2.1 Esporulação

Para avaliar a esporulação (esp) dos isolados, utilizou-se a técnica de secagem de massa micelial desenvolvida por Walker (1980), modificada por Nechet et al. (2006) e Souza et al. (2005): transferiram-se três discos de micélio (0,5cm de diâmetro), retirados das bordas das colônias em placas de Petri, para 10 ml de meio V8 líquido, em Erlenmeyers de 25 ml, que permaneceram sob agitação contínua a 120 rpm, a 25°C aproximadamente. Após 4 dias, verteu-se o conteúdo de cada erlenmeyer em ágar-água, em três placas de Petri, as quais permaneceram abertas, a 40 cm de distância de lâmpadas fluorescentes brancas de 40W, Sylvania®, intercaladas com lâmpadas grow lux de 40W, Sylvania®, intensidade luminosa de $165,3 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, com fotoperíodo de 12h, a 25°C. Quando o meio desidratou-se (após 4 dias, aproximadamente), colocaram-se 10 ml de água destilada em cada placa, raspou-se superficialmente com um bastão de vidro e filtrou-se a suspensão com uma camada de gaze. Com hemacitômetro, estimou-se a concentração de esporos de cada isolado no filtrado, pela média das leituras nos dois campos de contagem da lâmina.

2.2 Produção de cercosporina

De cada isolado, retiraram-se discos de micélio (0,5cm de diâmetro) da borda das colônias em meio V8. Colocou-se um disco no centro de cada placa de Petri (9 cm), com meio BDA, e incubou-se em câmara de crescimento a 18, 22 ou 26°C, sob lâmpadas fluorescentes como descrito em 2.1, porém com intensidade luminosa de $276,3 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, fotoperíodo de 12 h. Após 14 dias, avaliou-se a produção de cercosporina (pigmentação púrpura do meio de cultivo), com base em escala de quatro notas: 1- sem produção aparente do pigmento; 2- pigmento produzido apenas sob a colônia; 3- pigmento cobria até metade da placa e 4- pigmento cobria toda a área da placa (Wang et al., 1998; Brunelli, 2004). O experimento foi em esquema fatorial, com 3 (temperaturas) x 60 (isolados).

2.3 Crescimento micelial

De cada isolado, retiraram-se discos de meio com micélio (0,5cm de diâmetro) da borda das colônias em meio V8. Colocou-se um disco no centro de placa de Petri (9 cm) com meio BDA; incubou-se em câmara de crescimento a 18, 22 ou 26°C, sob lâmpadas fluorescentes como descrito em 2.2. Durante 18 dias, em intervalos de 3 dias, mediu-se o diâmetro das colônias em dois sentidos opostos e se calculou a média dos valores obtidos. A partir da equação para calcular a área abaixo da curva de progresso de doença (Shaner & Finney, 1977), obteve-se a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACC). O experimento foi em esquema fatorial com 3 (temperaturas) x 60 (isolados).

2.4 Componentes epidemiológicos em mudas de duas variedades de café, adubadas ou não com cloreto de potássio, e mantidas em diferentes temperaturas pós-inoculação

Dos 60 isolados utilizados nos experimentos anteriores, selecionaram-se seis, dois de cada região, com características diferentes quanto à esporulação, produção de cercosporina e ao crescimento micelial.

Mudas de Catuaí Vermelho e Catuaí Vermelho foram mantidas em sacolas plásticas (10 x 20 cm) com mistura de solo, areia de rio lavada e esterco de curral, na

proporção de 3:1:1 (v:v:v). As mudas das duas variedades procediam de viveiros diferentes e foram estabelecidas em substratos diferentes, principalmente quanto à adubação. Segundo análise granulométrica, para Catuaí Vermelho, o solo foi classificado como argiloso (28 dag/Kg, 11 dag/Kg, 10 dag/Kg, 51 dag/Kg, de areia grossa, areia fina, silte e argila, respectivamente) e, para Catucaí Vermelho, como muito argiloso (12 dag/Kg, 10 dag/Kg, 10 dag/Kg, 68 dag/Kg, de areia grossa, areia fina, silte e argila, respectivamente).

Após adquiridas, as mudas foram mantidas em casa de vegetação e telado. Quando necessário, pulverizaram-se tebuconazole (0,2ml p.a./L) e oxiclureto de cobre (1,68g p.a./L) para o controle de *C. coffeicola*, e fenthiona (0,5ml p.a./L), para controle de *Leucoptera coffeella* Guérin-Meneville (bicho-minador do cafeeiro).

Em metade das mudas de cada cultivar, regou-se o substrato com 0,35g de KCl/planta diluído em 10 ml de água destilada e, após 12 dias, efetuou-se nova aplicação de KCl na mesma proporção (Edson A. Pozza, informação pessoal). Efetuaram-se análises químicas de amostras de solo e de folhas coletadas antes e após a aplicação de KCl (Tabela 1).

Inocularam-se mudas após 4 meses da semeadura, 1 mês após a última pulverização de fungicida e 12 dias após a segunda aplicação de KCl. Produziu-se o inóculo de cada isolado como descrito em 2.1 e, com hemacitômetro, ajustou-se a concentração de cada suspensão para $4,5 \times 10^4$ conídios/ml. Com atomizador De Vilbiss, atomizou-se a suspensão de conídios nas superfícies abaxial e adaxial de quatro folhas marcadas por planta. Nas plantas da testemunha, aplicou-se água destilada. Transferiram-se todas as mudas para câmaras de crescimento a 18, 22 ou 26°C, sob lâmpadas fluorescentes como descrito em 2.2 (Fernandes, 1991). Nas primeiras 12h após a inoculação, as plantas foram envoltas com sacolas plásticas transparentes, borrifadas com água. Após 48h da inoculação, transferiram-se as plantas para casa de vegetação com iluminação natural, a aproximadamente 25°C, até o final das avaliações.

Diariamente, do 10º ao 40º dia após a inoculação, examinou-se cada folha quanto ao aparecimento de sintomas e sinais da doença. Determinaram-se o período de incubação (PI) - intervalo, em dias, da inoculação ao aparecimento do primeiro sintoma em uma folha - e o período latente (PL) - intervalo, em dias, da inoculação à visualização da primeira lesão esporulante na folha. Considerando-se as quatro folhas marcadas, obtiveram-se as médias do PI e do PL por planta.

Aos 40 dias da inoculação, avaliou-se a severidade (SEV) da doença com base em escala diagramática (Oliveira et al., 2001), com cinco notas: 1- 0%; 2- >0 a 3 %; 3- >3 a 6 %; 4- >6 a 12 % e 5- >12 a 25 % de área lesionada. Para as análises estatísticas, utilizou-se o valor intermediário de severidade compreendido entre o limite inferior e superior de cada nota. Avaliou-se também a desfolha, por meio do número de folhas que caíram em relação ao número inicial.

Para cada variedade, conduziu-se um experimento em esquema fatorial com 2 (adubação) x 3 (temperaturas) x 6 (isolados), com duas e três repetições na primeira e segunda execuções, respectivamente.

2.5 Análise dos dados

Realizou-se o teste de Levene ($\alpha= 0,05$), para verificar a homogeneidade de variância dos dados entre as duas execuções de cada experimento. Entretanto, mesmo quando houve homogeneidade das variâncias entre as duas execuções, avaliou-se cada execução independentemente, para se checar a repetibilidade dos resultados. Efetuou-se, também, o teste de Shapiro-Wilk ($\alpha= 0,05$), para avaliar a normalidade dos erros e o teste de Qui-quadrado (χ^2) para a freqüência das notas de produção de cercosporina nas diferentes temperaturas. Para atender à pressuposição da análise de variância (ANOVA), os valores de esporulação foram transformados para log (esp).

Após efetuar a ANOVA, utilizaram-se os testes de médias de Scott-Knott ($\alpha= 0,05$) ou o de Tukey ($\alpha= 0,05$). Para a severidade, efetuou-se ANOVA não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis) e o teste de comparações múltiplas (LSD – diferença mínima significativa). Para distinguir os isolados, empregou-se a análise de agrupamento (“Cluster”) baseado nos níveis de similaridade dos valores da moda e da média de produção de cercosporina, utilizando a distância Euclidiana. O agrupamento foi realizado com base no algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

Utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman para estudar a correlação entre PI, PL, produção de cercosporina, severidade e desfolha dos seis isolados comparados *in vivo*. Para as análises estatísticas, utilizaram-se os programas SAS (SAS Institute Inc., versão 9.1, Cary, NC, U.S.A.) e SISVAR (Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.6, UFLA, MG, Brasil), o segundo apenas para o teste de Scott-Knott.

3. Resultados

3.1 Esporulação

Pelo teste de Levene, verificou-se homogeneidade das variâncias entre as duas execuções do experimento ($P=0,89$). Houve efeito significativo de isolados quanto à esp ($P < 0,0001$) e se detectaram seis grupos (A, B, C, D, E e F) pelo teste de Scott-Knott (Tabela 2). O grupo A incluiu nove isolados (esp entre $5,9 \times 10^4$ e $1,3 \times 10^5$ conídios/ml); o B, oito isolados (esp entre $2,5 \times 10^4$ a $4,5 \times 10^4$ conídios/ml); o C, oito isolados (esp entre $1,6 \times 10^4$ a $2,3 \times 10^4$ conídios/ml); o D, sete isolados (esp entre $5,4 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^4$ conídios/ml); o E, um isolado com esp de $4,7 \times 10^3$ conídios/ml; o F, com 27 isolados que não esporularam, em ambas as execuções. Com exceção dos isolados SC21, TO03, SO29, TO13, SO37, TO01, SC23 e ZO54, os demais permaneceram no mesmo grupo, em ambas as execuções do experimento. Não houve tendência de agrupamento de isolados, segundo a região e/ou sistema de cultivo (Tabela 2).

3.2 Produção de cercosporina

Pelo teste de Levene, verificou-se homogeneidade das variâncias entre as duas execuções do experimento ($P=0,26$). Estudou-se a frequência de isolados com as notas da escala de 1 a 4. A 18°C , atribuiu-se nota 1 para 12 isolados; notas de 2 a 3 para 47 isolados; notas entre 3 e 4 para um isolado (nota 4 para nenhum isolado). A 22°C , atribuiu-se nota 1 para seis isolados; notas de 2 a 3 para 52 isolados e notas entre 3 e 4 para dois isolados. A 26°C , atribuiu-se nota 1 para oito isolados; notas de 2 a 3 para 45 isolados; notas entre 3 e 4 para cinco isolados; e nota 4 para dois isolados (Figura 1).

Pelo teste de qui-quadrado, não houve diferença na frequência de isolados nas classes de notas 1, 2, 2 a 3 e 3 ($P=0,34$; $P=0,20$; $P=0,36$ e $P=0,06$, respectivamente) entre as temperaturas. Para as notas de 3 a 4, houve diferença na frequência entre as temperaturas ($P=0,04$), e a 26°C se observou maior número de isolados com esse intervalo.

Pelo teste de Scott-Knott, organizaram-se os isolados em cinco grupos, em todas as temperaturas. A 18°C , o grupo A com um isolado (média de 3,5); B com seis isolados (médias entre 2,8 e 3,0); C com sete isolados (médias entre 2,5 e 2,6); D com 34 isolados (média entre 2,0 e 2,3); e E com 12 isolados (média de 1,0). A 22°C , o grupo A com três isolados (médias entre 3,1 e 3,5); B com 21 isolados (médias entre 2,6 e 3,0);

C com 14 isolados (médias entre 2,3 e 2,5); D com 16 isolados (médias entre 2,0 e 2,1); e o grupo E com seis isolados (média de 1,0). A 26°C, o grupo A com quatro isolados (médias entre 3,6 e 3,8); B, 17 isolados (médias entre 2,8 a 3,1); C, nove isolados (médias entre 2,5 e 2,6); D, 22 isolados (médias entre 2,0 e 2,3); E, com oito isolados (média de 1,0). O resultado da segunda execução foi similar ao da primeira (Tabela 3). Em ambas as execuções do experimento, os isolados que não produziram cercosporina (média de 1,0) sempre foram agrupados em conjunto, em todas as temperaturas.

Com a análise de agrupamento com base nos valores da moda, separaram-se os isolados em quatro grupos por temperatura, em ambas as execuções: grupo A, isolados com moda 1; B, moda 2; C, moda 3 e D, moda 4. Quando se utilizaram os valores médios de produção de cercosporina para a análise, o agrupamento foi semelhante ao obtido no estudo de frequência, a 22 e 26°C em ambas as execuções e a 18°C na primeira execução (dados não apresentados).

3.3 Crescimento micelial

Observou-se homogeneidade das variâncias entre as execuções do experimento ($P=0,12$). A temperatura afetou o crescimento micelial, e maiores valores de AACC ocorreram a 26°C e menores a 18°C, em ambas as execuções. A 18°C, formaram-se três grupos: o A com seis isolados (médias de AACC entre 8,7 e 9,7); B com 30 isolados (médias entre 7,1 e 8,3) e C, com 24 isolados (médias entre 5,3 a 6,9). A 22°C, obtiveram-se cinco grupos: A com 10 isolados (médias entre 12,3 e 13,8); B com 15 isolados (médias entre 11,1 e 12,1); C com 26 isolados (médias entre 9,5 e 10,9), D com cinco isolados (médias entre 8,6 e 9,1) e E, com quatro isolados (médias entre 7,7 e 8,1). A 26°C, obtiveram-se seis grupos: A com dez isolados (médias entre 14,0 e 15,5); B com 13 isolados (médias entre 12,9 e 13,8); C com 14 isolados (médias entre 11,4 e 12,3); D com 17 isolados (médias entre 10,4 e 11,3); E com três isolados (médias entre 9,9 e 10,1) e F, com três isolados (médias entre 8,0 e 8,6) (Tabela 4).

3.4 Componentes epidemiológicos em mudas de duas variedades de café, adubadas ou não com cloreto de potássio, e mantidas em diferentes temperaturas pós-inoculação

3.4.1 Período de Incubação e Período Latente

Pelo teste de Levene, houve homogeneidade das variâncias entre as duas execuções apenas para PL em Catucaí. Como não houve normalidade dos dados na primeira execução do experimento em ambas as variedades, realizou-se análise descritiva dos dados de PI e PL. Na segunda execução, houve normalidade para os dados de PI e PL, e se procedeu à ANOVA. Detectaram-se efeitos significativos da adubação com KCl, isolado e temperatura para ambas as variedades e da interação KCl - temperatura para o PL em Catucaí ($P < 0,0001$; $P < 0,0001$; $P = 0,01$ e $P = 0,04$, respectivamente).

Na primeira execução, os valores de PI e PL tenderam a ser menores em mudas de ambas as variedades adubadas com KCl. Na segunda execução, ocorreu a mesma tendência, e as médias foram estatisticamente diferentes (Tabela 5). Na segunda execução, o PL nas mudas sem KCl e mantidas a 18 (32,2 dias) ou 22°C (32,9 dias) foi maior que o das adubadas com KCl, cujos valores a 18 e 22°C foram 29,9 e 29,6 dias, respectivamente. A 26°C, o PL com KCl (32,3 dias) não diferiu do sem (33,9 dias).

Os valores de PI e PL tenderam a ser maiores nas mudas mantidas a 26°C, em ambas as variedades e execuções. O PI e PL em Catucaí foram menores a 18°C, em ambas as execuções. Na primeira execução, PI e PL foram menores em mudas de Catucaí mantidas a 18°C e, na segunda, a 22°C (Tabela 5).

Os valores de PI e PL variaram entre os isolados de *C. coffeicola*, em ambas as execuções. Nas mudas inoculadas com o isolado TO02, ocorreram maiores valores de PI e PL em ambas as variedades e execuções. O PI nas mudas de Catucaí foi menor com o isolado SC40 e não diferiu do com ZC56. Maior PI foi com o isolado TO02, e não diferiu do com os isolados TC07 e ZO53. O PL em Catucaí foi menor com o isolado ZC56, que não diferiu do com os isolados SC40, SO31 e TC07. Com Catucaí, o menor PI foi com o isolado SO31, que não diferiu do com os isolados SC40, ZO53 e ZC56. Com TO02, estimou-se o maior PI, que não diferiu do com TC07. O PL em Catucaí foi menor com SO31, que não diferiu do PL com SC40, ZO53, ZC56 e TC07 (Tabela 5).

Observou-se correlação significativa entre PI e PL na primeira ($r = 0,93$) e segunda ($r = 0,87$) execuções. Houve, também, correlação significativa entre PI e PL em Catuaí ($r = 0,88$) e Catucaí ($r = 0,90$). Para todos os valores de r , $P < 0,0001$.

3.4.2 Severidade

Pelo teste de Levene, houve homogeneidade das variâncias entre as execuções do experimento apenas em Catuaí. Valores de SEV em Catuaí e Catucaí foram similares em ambas as execuções do experimento: na primeira, foi de 7,12% e 6,43% em Catuaí e Catucaí, respectivamente; na segunda, de 6,06% e 5,47% em Catuaí e Catucaí, respectivamente.

Detectou-se efeito significativo da adubação com KCl. Maiores valores de SEV ocorreram quando se adubaram as mudas de ambas as variedades com KCl, em ambas as execuções. Na primeira execução, sem KCl, SEV= 3,58 e 4,73; com KCl, SEV= 10,26 e 7,94, em Catuaí e Catucaí, respectivamente. Na segunda, sem KCl, SEV= 3,64 e 3,79; com KCl, SEV= 8,17 e 6,97, em Catuaí e Catucaí, respectivamente (Figura 2A).

Houve efeito de isolados em ambas as execuções e variedades. Em ambas as execuções, em Catucaí, SEV foi maior com o isolado SO31, e menor com TO02. Os valores de SEV com os isolados SC40, ZC56 e TC07 não diferiram do com SO31, na primeira execução (Figura 2D). Em Catuaí, maiores valores ocorreram com SO31 e SC40, na primeira e segunda execuções, respectivamente. Em ambas as execuções, menores valores de SEV ocorreram com TO02. Na primeira execução, em Catuaí os valores de SEV com os isolados SC40, ZC56 e ZO53 não diferiram daqueles com SO31. Na segunda execução em Catuaí, SEV com os isolados SO31, ZC56, ZO53 e TC07 não diferiram daqueles com SC40 (Figura 2C).

Quanto à temperatura, e verificou-se tendência da SEV ser maior a 22 ou 18°C e menor a 26°C, em ambas as execuções e variedades (Figura 2B).

Em Catucaí, houve correlação positiva de SEV e cercosporina ($r = 0,59$, $P = 0,0024$). Quando se adubou com KCl, ocorreu correlação positiva de SEV e cercosporina ($r = 0,65$, $P = 0,0007$). Sem KCl, houve correlação positiva de SEV e cercosporina ($r = 0,55$, $P = 0,0056$). Em ambas as execuções e variedades, houve correlação positiva de adubação com KCl e SEV: em Catuaí, $r = 0,59$ ($P < 0,0001$) e $r = 0,58$ ($P < 0,0001$); em Catucaí, $r = 0,40$ ($P = 0,0006$) e $r = 0,44$ ($P < 0,0001$).

3.4.3 Desfolha

A desfolha tendeu a ser maior quando se adubaram as mudas com KCl. Em todas as combinações de temperatura e variedade, ocorreu desfolha, que variou de 8,33 a 66,67 %, em mudas adubadas com KCl e inoculadas com os isolados ZC56, SC40, SO31 e TC07, o que não ocorreu com as não adubadas. Menor desfolha ocorreu com o isolado TO02, e maior com o SO31. Não se observou qualquer tendência quanto ao efeito da temperatura na desfolha (Figura 3).

Em Catuaí, houve correlação positiva entre desfolha e cercosporina ($r = 0,58$, $P = 0,0479$) e entre SEV e desfolha ($r = 0,82$, $P = 0,0012$); em Catucaí, houve correlação positiva entre SEV e desfolha ($r = 0,86$, $P = 0,0004$). Quando se adubou com KCl, ocorreu correlação positiva entre desfolha e cercosporina ($r = 0,68$, $P = 0,0152$) e entre SEV e desfolha ($r = 0,87$, $P = 0,0003$). Sem KCl, houve também correlação positiva entre desfolha e cercosporina ($r = 0,71$, $P = 0,0110$).

4. Discussão

Entre os fatores que decrescem o potencial produtivo do cafeeiro, encontra-se a cercosporiose, que pode causar perdas de até 30% da produção (Zambolim et al., 1997). Apesar da importância crescente da doença (Juliatti et al., 2000), há poucos estudos para definição de metodologia de trabalho com *C. coffeicola*. Assim, há necessidade de se definir um protocolo para testes *in vitro* e *in vivo* com o patógeno. Aspecto que demanda estudos é a variabilidade de *C. coffeicola*, pois compreender a diversidade em populações de fitopatógenos é fundamental no sucesso de trabalhos de pesquisa, principalmente os direcionados à epidemiologia e manejo de doenças (Brown, 1998). Nos experimentos conduzidos *in vitro* e *in vivo*, constatou-se variabilidade de isolados do patógeno, quanto a todas as variáveis analisadas. Quanto à esporulação, houve uniformidade dos resultados entre as duas execuções experimentais, e se separaram os 60 isolados em seis grupos. Souza et al. (2005) também verificaram diferenças na esporulação de mais de 400 isolados de *C. coffeicola*, coletados em Minas Gerais. Tal fato devorre, possivelmente, por diferenças no potencial genético de cada isolado, como observado para *Pseudocercospora musae* (Rosa & Menezes, 2001). Necessita-se, agora, definir se os isolados também diferem quanto à esporulação em plantas e se os resultados *in vitro* correlacionam-se aos obtidos *in vivo*.

Ocorreram variações nos resultados de crescimento micelial e produção de cercosporina entre as duas execuções experimentais. Tais variações podem ser oriundas de características genéticas e fisiológicas do patógeno, bem como da falta da uniformização do volume do meio de cultura, em cada placa de Petri. Apesar de se terem utilizado culturas monospóricas do patógeno, *Cercospora* spp. têm conídios multisseptados, possivelmente em heterocariose, o que pode resultar em variações (Cai & Schneider, 2005). Observou-se diferença no crescimento de isolados nas diferentes temperaturas, com tendência de maior crescimento micelial com o aumento da temperatura. Aparentemente, essa tendência é comum para *Cercospora* spp: o ótimo de crescimento micelial de *C. carotae* foi entre 20 e 25°C (Carisse et al., 1993), de *C. piaropi* entre 25 e 30°C (Ávila & Pitelli, 2004), e de *C. asparagi* entre 20 e 28°C (Cooperman et al., 1986). Com os valores de AACC, discriminaram-se mais os isolados de *C. coffeicola*, pois obteve-se maior número de grupos com AACC que com esporulação e produção de cercosporina. Para definir se essa maior discriminação é

relevante em populações de *C. coffeicola*, necessitam-se estudos comparativos de ensaios *in vivo* e *in vitro*.

A variabilidade de isolados de *C. coffeicola* quanto à produção de cercosporina também ocorre em outras espécies de *Cercospora* (Jenns et al., 1989; Brunelli, 2004; Almeida et al., 2005). A temperatura afetou a produção da toxina, e os isolados produziram mais a 22 e 26 que a 18°C. No grupo de isolados com maior produção, maiores valores de médias ocorreram a 22 e 26°C. O grupo dos isolados que não produziram cercosporina foi maior a 18°C. Para *C. ricinella*, crescendo entre 10 e 35°C, o ótimo para produção foi 22,5°C (Fajola, 1978). Produção alta de cercosporina por *C. asparagi*, *C. beticola* e *C. kikuchii* ocorreu a 20 e 30°C (Jenns et al., 1989). Considerando esses resultados e os obtidos no presente estudo, depreende-se haver maior produção de cercosporina quando a temperatura for superior a 20°C. Assim, quando se objetivar a produção da toxina por *C. coffeicola*, seria melhor incubar-se entre 22 e 26°C que a 18°C. A escala de notas utilizada para avaliar a produção de cercosporina foi de uso fácil. Entretanto, a nota atribuída pode depender do volume do meio de cultura, o que pode influenciar na difusão da toxina. Portanto, sugere-se, novamente, padronizar o volume do meio de cultura.

Aparentemente, diferenças em agressividade são comuns entre isolados de *Cercospora spp.*, como observado em *C. coffeicola* (Lombardi, 2002), *C. zea-maydis* (Carson et al., 2002; Brunelli, 2004) e *C. sorghi* (Okori et al., 2004). Não houve relação entre a origem dos isolados e SEV. Os valores de SEV foram maiores na primeira que na segunda execução experimental, o que pode ser atribuído às estações do ano em que se executou o experimento: na primeira execução, realizada no outono, a amplitude da temperatura foi menor que na segunda, instalada no inverno.

Entre as variedades, ocorreram diferenças quanto aos componentes epidemiológicos. O genótipo do hospedeiro é fator condicionante no estabelecimento do patógeno. Plantas de Catuaí, Mundo Novo e Icatú, inoculadas com *C. coffeicola*, diferiram quanto ao número de folhas lesionadas e ao total de lesões por planta (Pozza et al., 2004). Portanto, a escolha do genótipo de cafeeiro é importante em estudos de variabilidade de *C. coffeicola*. Além das diferenças entre os genótipos, a composição diferente dos substratos em que cresceram as mudas de cada variedade, possivelmente influenciou na interação patógeno-hospedeiro. Assim, é importante padronizar as condições de condução de experimentos, principalmente quanto ao substrato a ser usado, para facilitar a interpretação dos resultados e a comparação de genótipos.

Detectou-se correlação significativa da produção de cercosporina *in vitro* à SEV, fato já observado em *Cercospora* spp. (Daub, 1982; Callahan et al., 1999; Choquer et al., 2005), inclusive com isolados de *C. kikuchii* de diferentes regiões do Brasil (Almeida et al., 2005). Houve, também, correlação entre produção de cercosporina e intensidade de desfolha. Entretanto, não se pode ignorar o papel do etileno, produzido intensamente em folhas infectadas com *Cercospora* spp. (Valencia, 1970; Ketring & Melouk, 1982). Seria interessante efetuar estudos para correlacionar a produção de cercosporina à agressividade de número maior de isolados de *C. coffeicola*. Se essa correlação persistir, poder-se-ia adotar a produção de cercosporina, como indicativo da agressividade do patógeno.

Não se verificou normalidade dos dados de PI e PL na primeira execução, o que provavelmente se deve ao menor número de repetições (duas), que na segunda (três). Para severidade e desfolha, também, não houve normalidade dos dados, o que possivelmente se deve à variação ocorrida entre os resultados no mesmo tratamento. Sugere-se, portanto, usar número maior de repetições em estudos futuros.

A adubação com KCl tendeu a aumentar a intensidade da cercosporiose. Vários autores já avaliaram o efeito da nutrição mineral na intensidade da cercosporiose (Fernández-Borrero & López-Duque, 1971; Pozza et al., 2000; Pozza et al., 2001; Garcia Júnior et al., 2003; Pozza et al., 2004; Santos Botelho, 2005). O potássio especificamente, predispõe a planta ao patógeno por afetar os teores e atividade de outros elementos, como N, Ca e Cu (Pozza et al., 2001). Os dois últimos são importantes na defesa da planta: Ca inibe a atividade de enzimas pectolíticas e Cu está envolvido nos mecanismos de lignificação, senescência foliar precoce e no metabolismo de fenóis (Fernández-Borrero & López-Duque, 1971; Pozza et al., 1997; Pozza et al., 2000; Garcia Júnior et al., 2003). No presente estudo, a aplicação de KCl, resultou em maior teor de K e menor de N e Ca nas folhas. Apesar dos resultados já obtidos, necessita-se elucidar melhor o efeito de K na predisposição de plantas. Ademais, deve-se atentar, em estudos futuros, em se uniformizar o teor de K no substrato para se obterem resultados uniformes e reproduzíveis.

Aparentemente, a temperatura em pós-inoculação afetou a intensidade da doença, pois houve tendência de SEV ser maior e PI e PL menores a 18 e 22°C. Em outros patossistemas, a temperatura afetou a duração do período latente, incidência, severidade e expansão das lesões (King et al., 1997; Webb & Nutter, 1997; Turechek & Stevenson, 1998; Carisse et al., 2000; Pfender, 2001). Não se obtiveram sintomas da

cercosporiose em cafeeiros inoculados e mantidos durante toda a avaliação em câmara de crescimento com temperatura fixa (dados não publicados). Portanto, o efeito da temperatura no patossistema café - *C. coffeicola* precisa ser mais bem compreendido.

Testes *in vitro* e *in vivo* foram eficientes para detectar a variabilidade de isolados de *C. coffeicola*, a qual está não foi afetada pela região e sistema de cultivo. Portanto, estes testes podem ser adotados em estudos comparativos. Isolados de *C. coffeicola* diferiram quanto a características fisiológicas e a componentes epidemiológicos. Em estudos futuros, sugere-se avaliar apenas o PI, por ser mais fácil de quantificar e por se correlacionar ao PL. A adubação mineral, a temperatura, a variedade e o isolado de *C. coffeicola* interferiram na intensidade da cercosporiose do cafeeiro. Em trabalhos futuros, devem-se manter esses fatores o mais uniforme possível, para se obter resultados mais confiáveis. Há necessidade de estudos comparativos de testes *in vitro* e *in vivo* com maior número de isolados, principalmente nos testes *in vivo*, para embasar as conclusões quanto à variabilidade do patógeno.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

.Há variabilidade de isolados de *C. coffeicola*, quanto às características fisiológicas e a componentes epidemiológicos;

.Testes *in vitro* e *in vivo* são eficientes para avaliar essa variabilidade;

.A região e o sistema de cultivo não afetaram a variabilidade do patógeno;

.A adubação mineral e a temperatura em pós-inoculação interferem na intensidade da cercosporiose do cafeeiro.

6. Referências Bibliográficas

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

ÁVILA, Z.R. & PITELLI, R.A. **Efeito de condições de cultivo sobre a produção e virulência de *Cercospora piaropi***. Summa Phytopathologica 30:382-388, 2004.

BROWN, J.K.M. **Surveys of variation in pathogen populations and their application to disease control**. In: Jones, D.G. (Ed.) The Epidemiology of Plant Diseases. Dordrecht Kluwer, pp.73-102,1998.

BRUNELLI, K.R. ***Cercospora zea-maydis*: esporulação, diversidade morfo-genética e reação de linhagens de milho**. Piracicaba: ESALQ, 105p., 2004. (Tese de Doutorado em Fitopatologia).

BUITRAGO-JARAMILLO, H. & FERNÁNDEZ-BORRERO, O. **Esporulacion “in vitro” de *Cercospora coffeicola* Berk. y Cooke**. Cenicafé 33:3-14, 1982.

CAI, G. & SCHNEIDER, R. W. **Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain in soybean**. Phytopathology 95:257-261, 2005.

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

CARISSE, O.; KUSHALAPPA, A.C.; CLOUTIER, D.C. **Influence of temperature, leaf wetness, and high relative humidity duration on sporulation of *Cercospora carotae* on carrot leaves**. Phytopathology 83:338-343, 1993.

CARISSE, O.; BOURGEOIS, G.; DUTHIE, J.A. **Influence of temperature and leaf wetness duration on infection of strawberry leaves by *Mycosphaerella fragariae*.** *Phytopathology* 90:1120-1125, 2000.

CARSON, M.L.; GOODMAN, M.M.; WILLIAMSON, S.M. **Variation in aggressiveness among isolates of *Cercospora* from maize as a potential cause of genotype-environment interaction in gray leaf spot trials.** *Plant Disease* 86:1089-1093, 2002.

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

COOPERMAN, C.J. & JENKINS, S.F. **Conditions influencing growth sporulation of *Cercospora asparagi* and *Cercospora* blight development in Asparagus.** *Phytopathology* 76:617-622, 1986.

DAUB, M.E. **Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species.** *Phytopathology* 72:370-374, 1982.

DEL PELOSO, M.C.; FERNANDES, C.D.; FIGUEIRAS, A.T.; CHAVES, G.M. **Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura.** *Fitopatologia Brasileira* 14:41-44, 1989.

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

EHRENSHAFT, M.; JENNS, A.E.; CHUNG, K.R.; DAUB, M.E. ***SORI*, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms.** *Molecular Cell* 1:603-609, 1998.

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

FERNANDES, C.D.; DEL PELOSO, C.M.; MAFFIA, L.A.; VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Influência da concentração de inóculo de *Cercospora coffeicola* e do período de molhamento foliar na intensidade da cercosporiose do cafeeiro.** Fitopatologia Brasileira 16: 39-43, 1991.

FERNANDES, A. T. F. **Componentes que expressam a intensidade da cercosporiose (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke) em progênies de Catimor.** Viçosa: UFV, 65p., 1989. (Dissertação de Mestrado em Fitopatologia).

FERNÁNDEZ-BORRERO, O. & LOPEZ-DUQUE, S. **Fertilizacion de plantulas de café e su relacion com la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*, Berk. & Cooke).** Cenicafé 22:95-108, 1971.

FERNÁNDEZ-BORRERO, O.; MESTRE, A.M.; DUQUE, S.I.L. **Efecto de la fertilización en la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) en frutos de café.** Cenicafé 17:5-16, 1966.

GARCIA JÚNIOR, D.; POZZA, E.A.; POZZA, A.A.A.; SOUZA, P.E.; CARVALHO, J.G.; BALIEIRO, A.C. **Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva.** Fitopatologia Brasileira 28: 286-291, 2003.

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

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

JULIATTI, F. C.; RAMOS, A. S.; MENDONÇA, F. C.; SANTOS, C. M. **Incidência e severidade da cercosporiose em lavoura cafeeira conduzida sob diferentes sistemas de irrigação e lâminas d'água.** In: 1º Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas, MG. Resumos expandidos: Embrapa Café, p.219-222, 2000.

KETRING, D.L. & MELOUK H.A. **Ethylene production and leaflet abscission of three peanut genotypes infected with *Cercospora arachidicola* Hori.** *Plant Physiology* 69:789-792, 1982.

KING, W.T.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M.A.; WILSON, L.L. **Effects of temperature on sporulation and latent period of *Colletotrichum* spp. infecting strawberry fruit.** *Plant Disease* 81:77-84, 1997.

LOMBARDI, A.P.Z. **Caracterização patogênica, morfológica, fisiológica, molecular e sensibilidade a fungicidas de *Cercospora coffeicola*.** Botucatu: UNESP, 141p., 2002. (Dissertação de Mestrado em Agronomia).

LÓPEZ-DUQUE, S. & FERNÁNDEZ-BORRERO, O. **Epidemiología de la mancha de hierro del cafeto (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke).** *Cenicafé* 20:3-19, 1969.

LYNCH, F.J.; GEOGHEGAN, M. J. **Production of cercosporin by *Cercospora* species.** *Transactions of the British Mycological Society* 69:496-497, 1977.

NECHET, K.L., BARRETO, R.W.; MIZUBUTI, E.S.G. ***Bipolaris euphorbiae* as a biological control agent for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host populations.** *BioControl* 51:259–275, 2006.

OKORI, P.; RUBAIHAYO, P.R.; EKWAMU, A.; FAHLESON, J.; DIXELIUS, C. **Genetic characterization of *Cercospora sorghi* from cultivated and wild sorghum and its relationship to other *Cercospora* fungi.** *Phytopathology* 94:743-750, 2004.

OLIVEIRA, C.A.; POZZA, E.A.; OLIVEIRA, V.B.; SANTOS, R.C.; CHAVES, Z.M. **Escala diagramática para avaliação da severidade de cercosporiose em folhas de cafeeiro.** In: 2º Simpósio Brasileiro de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Vitória, ES. Anais: Embrapa Café, 1151-1157, 2001.

PAUL, P.A. & MUNKVOLD, G.P. **Influence of temperature and relative humidity on sporulation of *Cercospora zea-maydis* and expansion of gray leaf spot lesions on maize leaves.** Plant Disease. 89:624-630, 2005.

PFENDER, W.F. **A temperature-based model for latent-period duration in stem rust of perennial ryegrass and tall fescue.** Phytopathology 91:111-116, 2001.

POZZA, A.A.A.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; CARVALHO, J.G.; MONTANARI, M.; GUIMARÃES, P.T.G.; SANTOS, D.M. **Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro.** Fitopatologia Brasileira 29:185-188, 2004.

POZZA, A.A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; CAIXETA, S.L.; O CARDOSO, A.A.; ZAMBOLIM, L.; POZZA, E.A. **Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro.** Pesquisa Agropecuária Brasileira 36: 53-60, 2001.

POZZA, A.A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; POZZA, E.A.; CAIXETA, S.L.; ZAMBOLIM, L. **Intensidade da mancha de olho pardo em mudas de cafeeiro em função da dose de N e de K em solução nutritiva.** Summa Phytopathologica 26:29-34, 2000.

POZZA, E.A.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F.X.R. **Controle químico da mancha-de-olho-pardo (*Cercospora coffeicola*) do cafeeiro em condições de viveiro.** Fitopatologia Brasileira 22:543-545, 1997.

RENGIFO, H.G.G.; LEGUIZAMÓN, J.E.C.; RIAÑO, N.M.H. **Algunos aspectos biológicos de *Cercospora coffeicola*.** Cenicafé 53:169-177, 2002.

ROSA, C. T. & MENEZES, M. **Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*.** Fitopatologia Brasileira 26:141-147, 2001.

SANTOS BOTELHO, D.M.; POZZA, E.A.; POZZA, A.A.A.; CARVALHO, J.G.; BOTELHO, C. E.; SOUZA, P.E. **Intensidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício.** Fitopatologia Brasileira 30:582-588, 2005.

SHANER, G. & FINNEY, R.E. **The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat.** *Phytopathology* 67:1051-1056, 1977.

SOUZA, A. G. C.; MARTINS, R. B.; MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Esporulação in vitro de *Cercospora coffeicola*.** In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2005, Brasília-DF. *Fitopatologia Brasileira* 30:116, 2005.

TURECHEK, W.W. & STEVENSON, K.L. **Effects of host resistance, temperature, leaf wetness duration, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab.** *Phytopathology* 88:1294-1301, 1998.

UDDIN, W.; SERLEMITSOS, K.; VIJI, G. **A temperature and leaf wetness duration-based model for prediction of gray leaf spot of perennial ryegrass turf.** *Phytopathology* 93:336-343, 2003.

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

VALENCIA, A.G. **Estudio fisiológico de la defoliación causada por *Cercospora coffeicola* en el cafeto.** *Cenicafé* 21:105-114, 1970.

WALKER, H.L. ***Alternaria macrospora* as a potential biocontrol agent for spurred anoda: production of spores for field studies.** USDA Advanced Agricultural Techniques, Southern Series N°. 12. New Orleans, LA, USA, USDA-ARS-SE. 1980.

WANG, J.; LEVY, M.; DUNKLE, L.D. **Sibling species of *Cercospora* associated with gray leaf spot of maize.** *Phytopathology* 88:1269-1275, 1998.

WEBB, D.H. & NUTTER, F.W. Jr. **Effects of leaf wetness duration and temperature on infection efficiency, latent period, and rate of pustule appearance of rust in alfalfa.** *Phytopathology* 87:946-950, 1997.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; PEREIRA, A.A.; CHAVES, G. M. **Café** (*Coffea arabica*). In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.(eds.) Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa: UFV, pp.83-180, 1997.

TABELA 1 - Análises foliar e de solo de mudas de café das variedades Catuaí e Catucaí, nos tratamentos com aplicação (+) ou não (-) de cloreto de potássio (KCl).

Análise Foliar*							
Variedade	Execução	KCl	N	P	K	Ca ⁺²	Mg ⁺²
Catuaí	1	-	2,164	0,356	1,054	2,138	0,662
		+	2,148	0,421	1,294	1,853	0,383
	2	-	2,055	0,356	0,976	2,021	0,582
		+	1,989	0,501	1,154	1,954	0,411
Catucaí	1	-	2,303	0,311	1,294	1,477	0,141
		+	2,272	0,242	1,414	1,081	0,122
	2	-	2,221	0,270	1,233	1,366	0,134
		+	2,152	0,231	1,399	1,101	0,145

Análise de Solo**													
Variedade	Execução	KCl	pH H ₂ O	P	K	Ca ⁺²	Mg ⁺²	H + Al	SB - t	T	V	P-rem	
Catuaí	1	-	5,74	39,2	38	2,19	0,24	3,2	2,53	5,73	44,2	19,2	
		+	6,64	243,6	372	2,46	0,36	1,7	3,77	5,47	68,9	40,1	
	2	-	5,90	36,7	26	1,89	0,21	3,3	2,33	5,12	44,0	18,7	
		+	6,24	212,3	245	2,56	0,34	1,6	3,65	5,32	62,3	37,2	
	Catucaí	1	-	6,40	244,3	14	3,06	0,43	1,7	3,53	5,23	67,5	41,3
			+	6,48	80,8	294	2,43	0,25	3,2	3,43	6,63	51,7	22,0
2		-	6,00	124,3	10	2,71	0,39	1,5	3,12	5,13	55,4	39,1	
		+	6,05	60,8	215	2,62	0,23	2,9	3,29	6,05	48,5	20,8	

*Valores em dag/kg (%).

**Valores de P e K em mg/dm³; P-rem (fósforo remanescente) em mg/L; Ca⁺², Mg⁺², H+Al, SB (soma de bases trocáveis), t (capacidade de troca catiônica efetiva) e T (capacidade de troca catiônica a pH 7,0) em cmol_c/dm³; V (índice de saturação de bases) em %. Em ambas as execuções do experimento os valores de Al³⁺ foram iguais a zero.

TABELA 2 - Esporulação (conídios/ml) *in vitro* de isolados de *Cercospora coffeicola* em meio ágar-água em placas de Petri, a 25°C e fotoperíodo de 12h. Médias de três repetições. Para análise estatística, os valores foram transformados para log (esporulação).

Grupo	Amplitude*	Isolados**
A	$5,9 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^5$	SC21; SC25; SO29; SO40; TC07; TC10; TO04; ZC48; ZC59
B	$2,5 \times 10^4$ a $4,5 \times 10^4$	SC34; TO01; TO02; TO03; TO05; TO11; TO13; TO14
C	$1,6 \times 10^4$ a $2,3 \times 10^4$	SC31; SO37; TC17; TC18; TO15; ZC47; ZO41; ZO44
D	$5,4 \times 10^3$ a $1,1 \times 10^4$	SC22; SC23; TC16; ZC49; ZC56; ZC58; ZO54
E	$4,7 \times 10^3$	ZO53
F	Não houve esporulação	SC20; SC24; SC32; SC33; SC35; SO26; SO27; SO28; SO30; SO36; SO38; SO39; TC06; TC08; TC09; TC19; TO12; ZC46; ZC57; ZC60; ZO42; ZO43; ZO45; ZO50; ZO51; ZO52; ZO55

* Valores médios da amplitude de esporulação dos isolados para cada grupo.

** Isolados incluídos no mesmo grupo não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ($\alpha=0,05$). As médias zero não foram incluídas na análise estatística. As letras representam a região de coleta (S= Sul de Minas, T= Triângulo Mineiro ou Z= Zona da Mata) e o sistema de cultivo (C= Convencional ou O= Orgânico) e, o número, a ordem de coleta de cada isolado.

TABELA 3 - Produção de cercosporina por isolados de *Cercospora coffeicola* em meio BDA em placas de Petri, mantidas a 18, 22 ou 26°C, fotoperíodo de 12h. Os valores da média e moda foram obtidos a partir de três repetições.

Grupo	Temperatura	Amplitude*	Isolados**
A	18	3,5	SC34
	22	3,1 a 3,5	SC25; SC33; SC34
	26	3,6 a 3,8	SC33; SC34; SO29; ZO52
B	18	2,8 a 3,0	SC25; SO36; TC10; ZC48; ZO51; ZO52
	22	2,6 a 3,0	SC32; SO28; SO37; TC09; TC10; TC20; TO03; TO04; TO05; TC07; TO14; ZC49; ZC50; ZC56; ZC57; ZC58; ZC59; ZO43; ZO51; ZO52; ZO55
	26	2,8 a 3,1	SC21; SC25; SO27; SO30; TC06; TC10; TC08; TO03; TO04; TO05; ZC48; ZC56; ZC59; ZO43; ZO44; ZO45; ZO51
C	18	2,5 a 2,6	SO27; SO40; TC09; TO13; ZC56; ZC59; ZC60
	22	2,3 a 2,5	SC21; SC22; SC31; SO27; SO40; TC08; TO13; ZC46; ZC47; ZC48; ZO41; ZO42; ZO44; ZO45
	26	2,5 a 2,6	SC22; SC31; SO37; SO39; SO40; TO14; TC18; ZC49; ZC60
D	18	2,0 a 2,3	SC21; SC22; SC24; SC32; SC33; SC31; SO26; SO28; SO37; SO38; SO39; TC08; TC16; TC17; TC18; TC20; TO01; TO03; TO04; TO05; TC07; TO11; TO12; TO15; ZC47; ZC49; ZC50; ZC57; ZO42; ZO43; ZO44; ZO45; ZO54; ZO55
	22	2,0 a 2,1	SC24; SO26; SO29; SO36; SO39; TC06; TC16; TC17; TC18; TC19; TO01; TO11; TO12; TO15; ZC60; ZO54
	26	2,0 a 2,3	SO26; SO28; TC07; TC09; TC16; TC17; TC19; TC20; TO02; TO11; TO12; TO13; TO15; ZC46; ZC47; ZC50; ZC57; ZC58; ZO41; ZO42; ZO54; ZO55
E	18	1,0	SC23; SC35; SO29; SO30; TC06; TC19; TO02; TO14; ZC46; ZC58; ZO41; ZO53
	22	1,0	SC23; SC35; SO30; SO38; TO02; ZO53
	26	1,0	SC23; SC24; SC32; SC35; SO36; SO38; TO01; ZO53

*Utilizou-se uma escala de notas de 1 a 4, descrita no texto, para avaliar a produção de cercosporina. Valores médios da amplitude de produção de cercosporina dos isolados para cada grupo.

** Isolados incluídos no mesmo grupo não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ($\alpha=0,05$). As letras representam a região de coleta (S= Sul de Minas, T= Triângulo Mineiro ou Z= Zona da Mata) e o sistema de cultivo (C= Convencional ou O= Orgânico) e, o número, a ordem de coleta de cada isolado.

TABELA 4 - Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACC, em cm.dia) de isolados de *Cercospora coffeicola* em meio BDA em placas de Petri, a 18, 22 ou 26°C, fotoperíodo de 12h. Médias de três repetições.

Grupo	Temperatura	Amplitude*	Isolados**
A	18	8,7 a 9,7	SC35; SO30; TC06; TO02; ZO43; ZO53
	22	12,3 a 13,8	SC35; SO30; SO36; TC06; TO02; ZO41; ZO43; ZO51; ZO53; ZO54
	26	14,0 a 15,5	SC34; SO29; ZC49
B	18	7,1 a 8,3	SC21; SC22; SC24; SC32; SO26; SO36; SO38; SO39; SO40; TC07; TC09; TC10; TC16; TC20; TO01; TO03; TO04; TO11; TO13; TO14; TO15; ZC56; ZC57; ZC60; ZO41; ZO45; ZO51; ZO52; ZO54; ZO55
	22	11,1 a 12,1	SC32; SO37; SO38; SO39; TC09; TC10; TO01; TO03; TO11; TO15; ZC57; ZC58; ZC60; ZO45; ZO52
	26	12,9 a 13,8	SO28; ZC46; ZC50
C	18	5,3 a 6,9	SC23; SC25; SC31; SC33; SC34; SO27; SO37; SO28; SO29; TC08; TC17; TC18; TC19; TO05; TO12; ZC46; ZC47; ZC48; ZC49; ZC50; ZC58; ZC59; ZO42; ZO44
	22	9,5 a 10,9	SC21; SC22; SC23; SC24; SC25; SC33; SO26; SO40; TC07; TC08; TC16; TC18; TC19; TC20; TO04; TO05; TO12; TO13; TO14; ZC48; ZC50; ZC56; ZC59; ZO42; ZO44; ZO55
	26	11,4 a 12,3	SC21; SC25; SC31; SC33; SO27; SO37; SO39; TC08; TC16; TC17; TC19; TO04; TO12; ZC48; ZC58; ZC59; ZO44
D	22	8,6 a 9,1	SC31; SO29; ZC46; ZC47; TC17
	26	10,4 a 11,3	SC22; SC23; SO26; SO40; TC09; TC10; TC18; TO02; TO05; TO11; TO13; ZC47; ZC56; ZC57
E	22	7,7 a 8,1	SC34; SO27; SO28; ZC49
	26	9,9 a 10,1	SC24; SO38; TC07; TC20; TO01; TO03; TO15; ZO41; ZO42; ZO43; ZO45; ZO51; ZO52
F	26	8,0 a 8,6	SC32; SC35; SO30; SO36; TC06; TO14; ZC60; ZO53; ZO54; ZO55

* Amplitude da área abaixo da curva de crescimento micelial média dos isolados para cada grupo.

** Isolados incluídos no mesmo grupo não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ($\alpha=0,05$). As letras representam a região de coleta (S= Sul de Minas, T= Triângulo Mineiro ou Z= Zona da Mata) e o sistema de cultivo (C= Convencional ou O= Orgânico) e, o número, a ordem de coleta de cada isolado.

TABELA 5 - Períodos de incubação (PI) e latente (PL), em dias, em mudas de duas variedades de café, adubadas (+) ou não (-) com KCl, inoculadas com seis isolados de *Cercospora coffeicola* e mantidas após a inoculação a 18, 22 ou 26°C. O experimento foi executado por duas vezes. Na primeira execução, as médias proviram de duas repetições e, na segunda, de três (uma planta = unidade experimental).

Variedade	Tratamento	Execução do experimento			
		1		2	
	KCl	PI	PL	PI	PL
Catuaí*	+	21,50	31,58	21,95 b	30,60 b
	-	23,37	34,16	23,50 a	33,33 a
Catucaí*	+	20,31	30,83	21,83 b	29,89 b
	-	21,06	32,65	23,38 a	32,47 a
Temperatura					
Catuaí	18°C	21,82	32,27	21,81	31,28
	22 °C	21,92	32,58	22,36	31,39
	26 °C	23,45	33,54	23,97	33,06
Catucaí	18 °C	19,95	30,87	22,58	31,54
	22 °C	20,27	31,36	21,12	29,00
	26 °C	21,82	32,90	23,91	32,64
Isolado					
Catuaí**	SC40	21,08	30,42	20,39 d	30,22 c
	SO31	21,25	30,17	22,39 bc	31,17 bc
	ZC56	21,05	31,92	21,72 cd	30,17 c
	ZO53	22,25	32,83	23,72 ab	32,78 b
	TC07	23,08	34,42	23,50 abc	32,44 bc
	TO02	26,50	39,12	25,25 a	35,92 a
Catucaí**	SC40	19,75	29,25	22,50 bc	31,11 b
	SO31	17,75	27,75	21,00 c	29,50 b
	ZC56	20,58	31,25	21,94 bc	30,06 b
	ZO53	22,92	35,08	22,33 bc	29,83 b
	TC07	19,08	30,92	23,39 ab	32,00 b
	TO02	25,50	38,00	25,56 a	36,67 a

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste F ($\alpha = 0,05$).

**Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

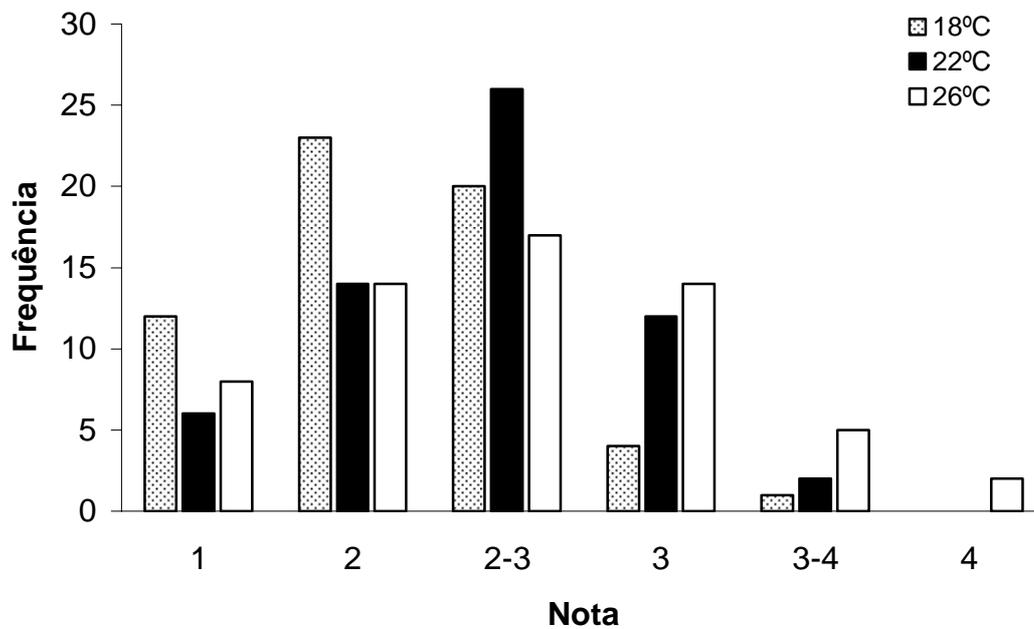


FIGURA 1 - Freqüência de isolados de *Cercospora coffeicola* segundo a produção de cercosporina a 18, 22 ou 26°C. As notas correspondem a três repetições por isolado em ambas as execuções do experimento. A freqüência considerou o número de isolados a que se atribuiu determinada nota.

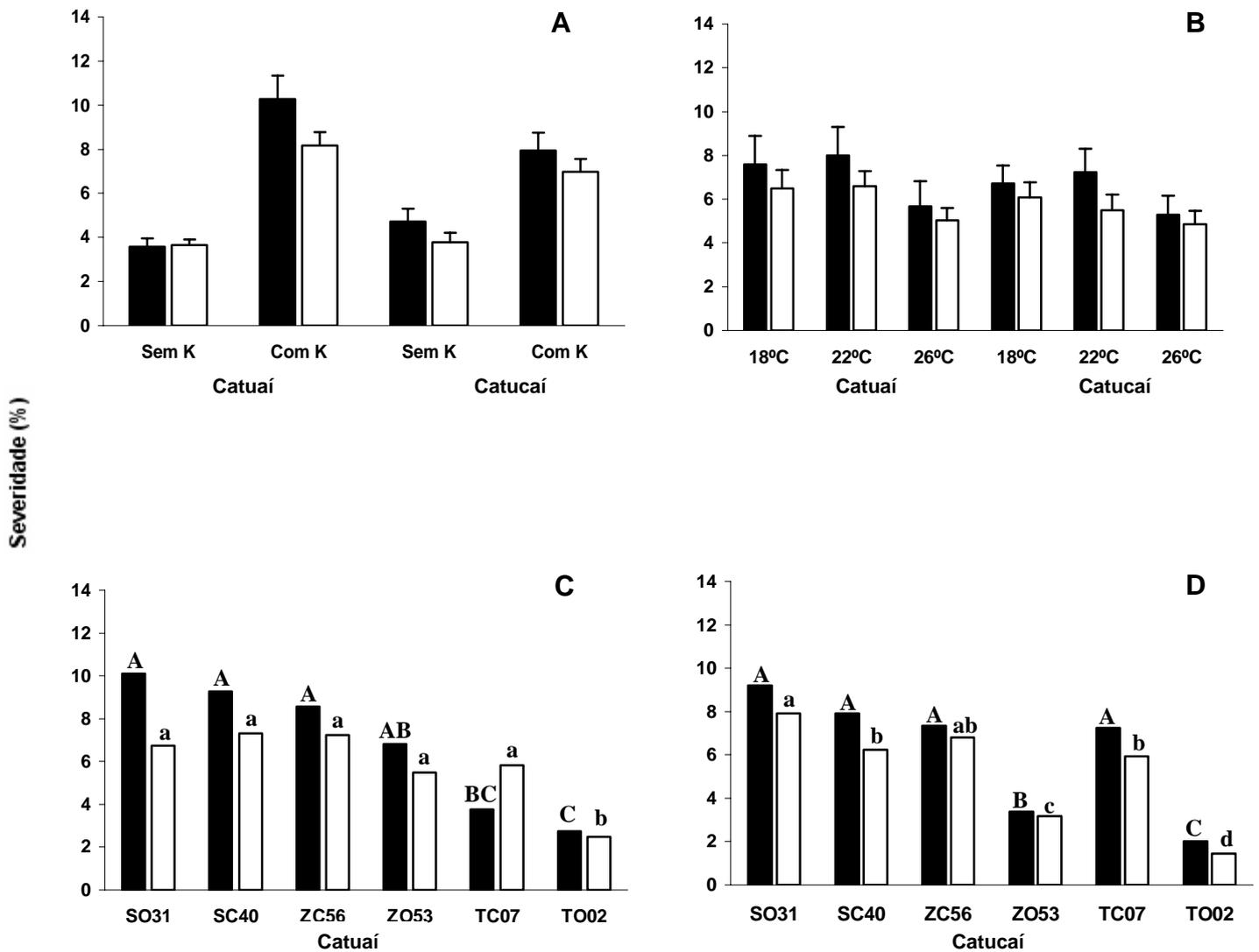


FIGURA 2 – Severidade média da cercosporiose em mudas de café: (A) adubadas ou não com cloreto de potássio; (B) mantidas a 18, 22 ou 26°C durante 48h após a inoculação; de (C) Catuaí e (D) Catuaí inoculadas com seis isolados de *Cercospora coffeicola*. O experimento foi executado por duas vezes (■primeira e □segunda). Barras verticais em A e D correspondem ao erro padrão da média. Em B e C, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na execução 1, e minúscula, na execução 2, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de LSD ($\alpha = 0,05$).

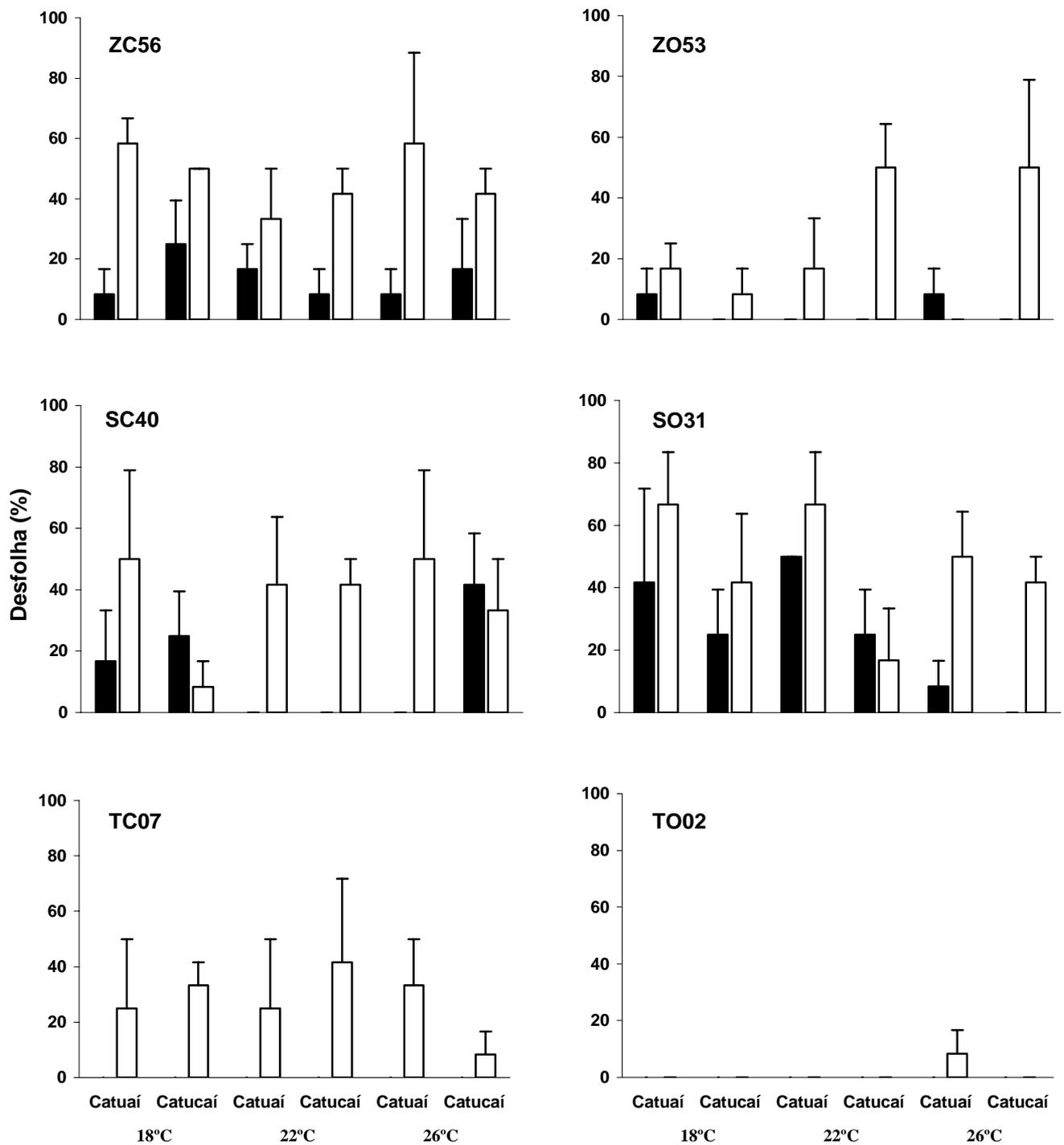


FIGURA 3 – Desfolha, em mudas de café das variedades Catuaí e Catucaí, adubadas (□) ou não (■) com cloreto de potássio, e inoculadas com os isolados ZC56, ZO53, SC40, SO31, TC07 e TO02 de *Cercospora coffeicola*. Barras verticais correspondem ao erro padrão da média.