



MARÍLIA GOULART DA SILVA

**INTERAÇÃO DA LUZ, DA TEMPERATURA E
DO MOLHAMENTO FOLIAR EM *Cercospora
coffeicola* E NA CERCOSPORIOSE EM
CAFEEIRO**

LAVRAS – MG

2014

MARÍLIA GOULART DA SILVA

**INTERAÇÃO DA LUZ, DA TEMPERATURA E DO MOLHAMENTO
FOLIAR EM *Cercospora coffeicola* E NA CERCOSPORIOSE EM
CAFEIEIRO**

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

Orientador

Dr. Edson Ampélio Pozza

LAVRAS - MG

2014

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

Silva, Marília Goulart da.

Interação da luz, da temperatura e do molhamento foliar em
Cercospora coffeicola e na cercosporiose em cafeeiro / Marília
Goulart da Silva. – Lavras : UFLA, 2014.

103 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Edson Ampélio Pozza.

Bibliografia.

1. Café - doenças e pragas. 2. Temperatura. 3. Intensidade
luminosa. 4. Molhamento foliar. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 633.7394

MARÍLIA GOULART DA SILVA

**INTERAÇÃO DA LUZ, DA TEMPERATURA E DO MOLHAMENTO
FOLIAR EM *Cercospora coffeicola* E NA CERCOSPORIOSE EM
CAFEIEIRO**

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

APROVADA em 16 de julho de 2014.

Dr. Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA
Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA
Dr. Rubéns José Guimarães	UFLA
Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza	Epamig

Dr. Edson Ampélio Pozza
Orientador

LAVRAS – MG

2014

Aos meus pais, Antônio e Mercês, em especial à minha mãe, pelas orações e apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos, em especial à Marina e Moisés, pelo incentivo.

DEDIDO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida, iluminando e guiando meus passos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela estrutura disponibilizada para cursar o Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao INCT – Café e ao coordenador Mário Lúcio Vilela de Resende.

Ao professor Edson Ampélio Pozza pelo apoio, orientação e valiosos ensinamentos.

Ao estagiário Caio Vitor, pelo empenho e pela competência durante a realização dos experimentos.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Aos colegas de laboratório de Epidemiologia pela convivência e ensinamentos compartilhados.

Aos meus pais, pelo amor, apoio e confiança em mim depositados.

Aos meus irmãos e a toda a minha família, pelo incentivo e carinho.

Ao meu namorado, pelo amor, paciência e incentivo.

Ao meu afilhado Pedro Lucas, pela companhia e por tornar minhas idas à Divinópolis sempre mais divertidas.

Às meninas da república, Flávia, Jessica e Helga pela convivência e amizade.

Aos amigos Aricléia, Daniella Borges, Daniela Teixeira, Davi, Eliane, Josineide, Lili, Luciana, Maria Clara, Mariana, Nayara, Tiago, Xicó, Klécia,

Amanda, Aydin, Elizabeth, Hayde, Hudson, Margie, Richard, Riccelli e Roslyn pelos momentos de descontração, amizade e agradável convívio.

A todos meus familiares, amigos e àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão de mais esta etapa.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

O café destaca-se como uma das mais importantes 'commodities' produzidas no país, sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial. A ocorrência de doenças é um dos principais fatores responsáveis por perdas na cafeicultura, as quais ocorrem desde o viveiro até a produção final. Dentre as doenças do cafeeiro destaca-se a cercosporiose, cujo plantio em áreas adversas a culturas perenes, com solos de evaporação acentuada e regiões de alta insolação e temperatura conciliada ao desequilíbrio nutricional, têm se agravado na cafeicultura e gerado significativas perdas. Visando elucidar a influência de fatores ambientais como temperatura, intensidade luminosa e molhamento foliar no comportamento do patógeno, da doença e em variáveis fisiológicas da planta, experimentos foram conduzidos no Departamento de Fitopatologia da UFLA. Para otimizar a obtenção e a germinação de conídios de *C. coffeicola* e possibilitar a realização dos experimentos, diferentes condições de temperatura e intensidade luminosa foram utilizadas e sob tais condições, escolheu-se um isolado patogênico, capaz de esporular e produzir cercosporina. Posteriormente, estudou-se o efeito da temperatura e da intensidade luminosa *in vitro*, avaliando-se o índice de velocidade de crescimento micelial e a produção de cercosporina. *In vivo*, avaliou-se o efeito de tais variáveis no progresso da incidência e da severidade da doença, a influência da doença nas clorofilas a, b e total e em variáveis fisiológicas. Outro estudo foi conduzido para avaliar a interação entre temperatura e horas de molhamento foliar *in vivo*, avaliando-se as mesmas variáveis do experimento anterior. As variáveis temperatura, intensidade luminosa e horas de molhamento foliar, influenciaram nos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Temperatura. Intensidade Luminosa. Molhamento Foliar.

GENERAL ABSTRACT

Coffee stands out as one of the most important 'commodity' produced in the country, being Brazil the largest producer and exporter. The occurrence of diseases is one of the main factors responsible for losses in the coffee fields, which occurs from the nursery to the field. Among the diseases of the coffee stands out cercospora whose adverse planting in areas with perennial crops, soils markedly evaporation and regions of high insolation and temperature reconciled to nutritional unbalance has worsened in coffee and generated significant losses. To elucidate the influence of environmental factors such as temperature, light intensity and leaf wetness on the behavior of the pathogen, disease and plant physiological variables, experiments were conducted in the Department of Plant Pathology at UFLA. To optimize the sporulation and germination of conidia of *Cercospora coffeicola* and enable the experiments, different conditions of temperature and light intensity were used and under such conditions, was chosen a pathogenic strain, able to sporulate and produce cercosporin. Subsequently, was studied the effect of temperature and light intensity *in vitro* by evaluating the rate of mycelial growth and the production of cercosporin. *In vivo*, was assessed the effect of such variables in the progress of the incidence and severity of the disease, the influence of the disease on chlorophyll a, b and total and physiological variables. Another study was conducted by evaluating the interaction between temperature and hours of leaf wetness *in vivo*, evaluating the same variables as in the previous experiment. The variables temperature, light intensity and hours of leaf wetness influence in both, the fungi and the disease.

Keywords: Temperature. Light Intensity. Leaf Wetness.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 11
2	REFERENCIAL TEÓRICO 14
2.1	A Cercosporiose do Cafeeiro 14
2.2	Influência das variáveis ambientais em <i>Cercospora coffeicola</i> e na Cercosporiose do Cafeeiro 16
2.2.1	Temperatura 16
2.2.2	Intensidade luminosa 20
2.2.3	Molhamento foliar 24
2.2.4	Interação de variáveis ambientais 27
	REFERÊNCIAS 28
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 36
	ARTIGO 1 Esporulação e germinação de conídios de <i>Cercospora coffeicola</i> em diferentes temperaturas e intensidades luminosas 36
	ARTIGO 2 Effect of light and temperature on pathosystem <i>Cercospora coffeicola</i> and <i>Coffee arabica</i> 58
	ARTIGO 3 Interação da temperatura com o período de molhamento foliar na cercosporiose do cafeeiro 79
	CONSIDERAÇÕES GERAIS 104

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é uma planta originária das regiões altas da Etiópia (GRANER; GODOY JÚNIOR, 1967) e foi introduzido no Brasil em 1727 no estado do Pará, expandindo-se posteriormente para Bahia, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (MATIELLO; CARVALHO, 1983). A cultura destaca-se como uma das mais importantes ‘commodities’ produzidas no país, sendo o Brasil o maior produtor e exportador mundial, totalizando área plantada, das espécies arábica e conilon, de 2.282.619 hectares. Minas Gerais é o maior estado produtor, com 54,25% da área total cultivada com café no Brasil, predominando a espécie arábica em 98,87% da área (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

Apesar da importância da cafeicultura para o país, o cafeeiro sofre inúmeras perdas, causadas principalmente por doenças, pragas, déficit hídrico e deficiências nutricionais, além da interação entre esses e outros fatores. Entre as doenças do cafeeiro destaca-se a cercosporiose, cujo agente etiológico é o fungo hemibiotrófico *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. Descrita pela primeira vez no Brasil em 1887, a cercosporiose é tida como uma das doenças mais antigas dos cafeeiros nas Américas, podendo infectar tanto folhas quanto frutos, em mudas ou lavouras em formação ou produção, levando à perdas de produtividade e depreciando a qualidade da bebida quando ocorre nos frutos (LIMA; POZZA; SANTOS, 2012).

Como estratégia de defesa, espécies de *Cercospora* geralmente produzem a toxina cercosporina, toxina fotoativada e na presença de luz, induz a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais danificam as células do hospedeiro (DAUB, 1982a). Geralmente, apenas organismos produtores desta,

resistem a seus efeitos. Células de vários organismos não produtores (plantas, fungos, bactérias e animais) são sensíveis à cercosporina (DAUB, 1982a; DAUB; EHRENSHAFT, 2000), sendo bem conhecido o papel da toxina na patogênese (BALIS; PAYNE, 1971; DAUB; CHUNG, 2007; DAUB; EHRENSHAFT, 2000; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005), funcionando como fator de agressividade do patógeno (STEINKAMP et al., 1981).

Variáveis ambientais influenciam a ocorrência de doenças, devido estas interferirem em fases do ciclo de vida do patógeno e do hospedeiro (WAGGONER, 1960). Variáveis como temperatura, molhamento foliar, intensidade luminosa, disponibilidade de água e fertilidade do solo podem influenciar a intensidade dos sintomas de doenças bem como a fisiologia da planta (TAIZ; ZIEGER, 2013). Para *C. coffeicola*, o efeito da interação entre essas variáveis, tanto para as fases de crescimento e desenvolvimento do patógeno quanto para a doença foram pouco estudadas. Em cafeeiro, evidenciou-se a importância da luminosidade na ocorrência e no progresso da doença em 1959, antes mesmo da descoberta da toxina (ECHANDI, 1959), justificando as cercosporioses serem mais severas em plantios instalados a pleno sol, quando comparados a plantios sombreados. A interação de tais variáveis e seus efeitos na doença e no patógeno podem causar alteração na fisiologia da planta, como por exemplo, o amarelecimento das folhas e conseqüente redução da área fotossintética. O teor de clorofila é um indicador de desenvolvimento e crescimento das plantas (FLOSS, 2004), sendo a quantidade nas folhas diretamente relacionada à atividade fotossintética da planta (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Na literatura, os relatos sobre a necessidade de luz para a esporulação de *C. coffeicola* são controversos. Inicialmente, Echandi (1959) não observou influência do regime de luz na esporulação do fungo, porém, Buitrago-Jaramillo e Fernández-Borrero (1982) descreveram maior esporulação sob 9 horas de luz

alternada com 15 horas de escuro e ainda Del Peloso et al. (1989) sob luz contínua. Dessa forma não houve consenso quanto a necessidade e o tempo de exposição do patógeno à luz para esporulação, necessários para incrementar a produção de conídios e viabilizar a inoculação desse patógeno. Além disso, espécies do gênero *Cercospora* caracterizam-se por crescimento lento e reduzida esporulação *in vitro*, dificultando estudos com o patógeno, porém poucos estudos quantitativos foram realizados até o momento.

A epidemiologia das doenças precisam ser elucidadas para incrementar técnicas de manejo. Para algumas espécies de *Cercospora*, o efeito de tais variáveis ambientais já foram estudados e seus efeitos em variáveis do patógeno como crescimento micelial, esporulação, germinação de conídios e produção de cercosporina, *in vitro*, bem como o efeito na incidência e na severidade da doença, *in vivo*. Não foi encontrado na literatura o estudo de tais variáveis e suas interações, afetando *C. coffeicola* e as variáveis fisiológicas da planta, como clorofilas, fotossíntese, carbono interno e condutância estomática. Algumas destas variáveis já foram estudadas, mas não a interação entre elas e na maioria dos casos, não procedeu-se ao ajuste de modelos.

Sendo assim, os objetivos do trabalho foram avaliar a interação das variáveis ambientais, intensidade luminosa, temperatura e molhamento foliar em *C. coffeicola* e na intensidade da cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Cercosporiose do Cafeeiro

O agente etiológico da Cercosporiose ou Mancha Olho de Pomba ou Mancha de Olho Pardo é o fungo hemibiotrófico *Cercospora coffeicola* Berkeley & Cooke, pertencente ao filo dos ascomicetos (Capnodiales, Mycosphaerellaceae). O fungo é capaz de esporular em ambas as faces do limbo foliar e nos frutos de café, formando esporodóquios, onde são produzidos os conídios, os quais são disseminados principalmente através do vento, da água e de insetos. Espécies do gênero *Cercospora* caracterizam-se por crescimento lento e reduzida esporulação em meios de cultura. Os conídios podem sobreviver por mais de sete semanas em folhas destacadas e permanecer viáveis por quase nove meses na superfície foliar, aguardando condições favoráveis para a infecção do hospedeiro. Após atingir novas folhas e frutos do cafeeiro, os conídios na presença de umidade favorável germinam e o tubo germinativo penetra diretamente através cutícula ou por aberturas naturais, colonizando o tecido hospedeiro (ECHANDI, 1959).

O fungo *Cercospora coffeicola* foi descrito em 1881 (COOKE, 1881), associado a folhas de cafeeiro oriundas da Jamaica e sua ocorrência no Brasil constatada em 1887. A partir de 1971, observaram-se epidemias com alta intensidade nas regiões altas do Espírito Santo e em Minas Gerais, com perdas significativas nos viveiros de mudas, onde a ocorrência do fungo é favorecida por regas diárias. Em folhas, as lesões são circulares e variam de pardo-claras a marrom escuras, apresentando o centro acinzentado e quase sempre circundadas por um anel amarelado, caracterizando o sintoma conhecido como mancha de olho pardo ou mancha olho de pomba. Quando a doença apresenta-se em estágio mais avançado, pode observar-se no centro das lesões, pontuações escuras, as

quais correspondem a estruturas reprodutivas do fungo, em conformação de esporodóquios, compostos geralmente por 3 a 30 conidióforos agrupados em fascículos, os quais podem ser observados no centro das lesões em ambas as faces das folhas. Na extremidade dos conidióforos formam-se os conídios hialinos, multisseptados e de extremidade afilada (CHUPP, 1953).

Quando a doença ocorre em pós plantio, observa-se intensa desfolha e atraso no crescimento das plantas. Em lavouras adultas, a perda de folhas está associada a redução da produtividade nos anos subsequentes. Apenas uma lesão, dependendo do estágio da planta e de sua nutrição, pode acarretar em abscisão foliar. A cercosporiose induz na planta a produção de etileno acima do normal, sendo este precursor de outro hormônio, o ácido abscísico, o qual provoca a abscisão precoce das folhas (VALÊNICA, 1970). A desfolha associada à doença é um sério problema em viveiros, por comprometer a comercialização das mudas, as quais ficam com porte reduzido e sem folhas, tornando-se impróprias para o plantio (FERNÁNDEZ-BORRERO; MESTRE; DUQUE, 1966). Quando a infecção ocorre nos frutos, as manchas são castanhas, deprimidas, estendendo-se no sentido dos pólos do fruto e, com isso a polpa seca e a casca adere-se ao pergaminho, dificultando o despulpamento, além disso, frutos infectados têm o processo de maturação acelerado, caindo antes da colheita. A cercosporiose aumenta também o número de frutos quebrados e reduz o peso dos grãos, causando prejuízos ao agricultor (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010). A qualidade da bebida é também afetada devido a queda na quantidade de açúcares totais, pH e aumento na lixiviação de K, devido ao rompimento de membranas, depreciando a qualidade da bebida (LIMA; POZZA; SANTOS, 2012).

A intensidade da doença pode agravar-se em decorrência da deficiência hídrica prolongada, da adubação insuficiente e desequilibrada e da exposição solar direta (CUSTÓDIO et al., 2010). A deficiência hídrica prolongada impede

a absorção adequada de nutrientes e a adubação insuficiente e/ou desequilibrada das plantas favorece a doença (FERNÁNDEZ-BORRERO; MESTRE; DUQUE, 1966). Santos, Souza e Pozza (2004) estudando diferentes lâminas de irrigação na incidência da cercosporiose em folhas e frutos, observou tendência de redução da doença com o aumento da lâmina de água fornecida até 100% ECA (evaporação do tanque Classe 'A'). Em contrapartida, nas parcelas não irrigadas, observou-se menor produtividade, menor enfolhamento e maior incidência da cercosporiose.

A principal medida de controle adotada é o controle químico e os programas de controle geralmente, baseiam-se apenas no uso de calendários fixos de aplicação de fungicidas protetores e/ou sistêmicos. Adubações equilibradas durante o ciclo da cultura também podem ser usadas para auxiliar no controle da doença (POZZA; POZZA, 2012), porém, o manejo pode ser melhorado conhecendo quais os efeitos da interação de variáveis ambientais, influenciam na doença e no patógeno.

2.2 Influência das variáveis ambientais em *Cercospora coffeicola* e na Cercosporiose do Cafeeiro

As variáveis ambientais desempenham importantes funções tanto no patógeno quanto no hospedeiro, favorecendo ou não a ocorrência e progresso da doença.

2.2.1 Temperatura

Em fitopatógenos, a temperatura regula a produção de proteínas e de enzimas responsáveis pela manutenção da célula fúngica, podendo influenciar no crescimento da colônia, na esporulação e na germinação dos conídios, bem

como no período de incubação e no progresso da doença (SCHUMANN; ARCY, 2012). A temperatura é fator condicionante à ocorrência e ao progresso de doenças e para as de etiologia fúngica, afetando tanto as diferentes fases do patógeno (germinação, infecção, colonização e reprodução), quanto a expressão da doença (expansão da lesão, a incidência e a severidade da doença), assim como a produção de toxinas e enzimas (CARISSE; KUSHALAPPA; CLOUTIER, 1993; PAUL; MUNKVOLD, 2005).

A importância da temperatura para *C. coffeicola* foi relatada por Echandi (1959) e Wellman e Quesada (1951), os quais observaram diferentes comportamentos de crescimento micelial, esporulação e germinação de *C. coffeicola* em função da temperatura. A temperatura ótima para o crescimento micelial do fungo foi de 24°C, já a esporulação máxima foi obtida nas temperaturas de 18 a 30°C e a germinação foi máxima na temperatura de 24°C para dois isolados e a 30°C, para um isolado de *C. coffeicola*.

Posteriormente, Dell'Acqua et al. (2011) observaram diferentes comportamentos em relação a temperatura ótima para crescimento micelial de isolados de *C. coffeicola*. Os isolados IBLF004 e IBLF206 tiveram as maiores temperaturas ótimas de crescimento micelial, (27,6 e 27,8°C respectivamente), enquanto os isolados IBLF277, IBLF280 e IBLF379, as menores temperaturas (23,7 a 23,9°C) e os isolados IBL199 e IBLF270 temperaturas intermediárias (24,6 e 25,1°C). Neste mesmo estudo, foi observado também, relação entre temperatura de crescimento micelial e agressividade. Os isolados de maior temperatura de crescimento micelial (IBLF004 e IBLF206), foram os menos agressivos à quase todas as cultivares testadas (Catuaí Vermelho IAC 81, Catuaí SH3, Tupi IAC 1669 – 33, Tupi RN IAC 1669 – 13, Icatu Vermelho IAC 4045, Ouro Verde IAC H 5010-5, Geisha IAC 1137 e Mundo Novo IAC 376-4). Já os isolados de menor temperatura de crescimento micelial (IBLF277, IBLF280 e IBLF379), foram mais agressivos. O isolado IBLF270 cujo crescimento ótimo

foi em temperatura intermediária (25,1°C), apresentou moderada a elevada agressividade.

Na literatura foi demonstrado, a existência de variabilidade genética e cultural para isolados de *C. coffeicola*. Souza, Maffia e Mizubuti (2012), ao estudar 59 isolados de *C. coffeicola*, agrupou-os de acordo com a esporulação em seis grupos, os quais foram posteriormente reagrupados de acordo com a variável em estudo. Com relação ao crescimento micelial, a 18°C formaram-se três grupos, a 22°C cinco e a 26°C, seis grupos. A temperatura afetou também a produção de cercosporina e os isolados produziram mais a 22 e a 26°C em relação a 18°C. Nesta temperatura (18°C) foi onde encontrou-se o grupo dos isolados não produtores da toxina. Foi observada também correlação significativa entre a produção de cercosporina e a severidade da cercosporiose em mudas da cultivar 'Catuai'. Este autor, demonstrou a existência de variabilidade genética e cultural e também diferentes níveis de agressividade entre os isolados testados. Apesar de ter utilizado culturas monospóricas de *C. coffeicola*, *Cercospora* spp. possui conídios multisseptados, possivelmente em heterocariose, podendo resultar em variações genéticas (CAI; SCHNEIDER, 2005).

Na metodologia utilizada por Souza et al. (2011) para obter conídios de *C. coffeicola*, a temperatura de 25°C foi a utilizada. Em estudos envolvendo espécies de *Cercospora*, temperaturas entre 25 e 27°C foram as ideais para a produção de conídios (BRUNELLI et al., 2006). Para outras espécies de *Cercospora*, citam-se *C. zae-maydis*, cujo máximo crescimento micelial foi observado na temperatura de 25°C, o mínimo na de 15°C e a 30°C o crescimento foi completamente inibido. A máxima esporulação também foi observada a 25°C (KHARE et al., 2012), já a germinação dos conídios foi ótima na faixa entre 22 e 30°C (BECKMAN; PAYNE, 1983). Para *C. beticola* e *C. apii*, a temperatura ideal de crescimento micelial foi de 27°C (GROENEWALD;

GROENEWALD; CROUS, 2005), para *C. sojae* 25°C (CRUZ; DORRANCE, 2009), ou seja, a temperatura ideal varia com a espécie e até mesmo dentro da espécie, como demonstrado para *C. coffeicola* (SOUZA; MAFFIA; MIZUBUTI, 2012).

No trabalho realizado por Paul e Munkvold (2005) estudando o efeito da temperatura no tamanho das lesões causadas por *C. zea-maydis*, observaram maior expansão das lesões nas temperaturas entre 25 e 30°C e menores lesões foram observadas na temperatura de 35°C. Carisse e Kushalappa (1990) estudando o efeito da temperatura no número de lesões causadas por *C. carotae*, observaram aumento do número de lesões com o aumento da temperatura de 16 para 28°C, reduzindo na temperatura de 32°C. Canova (1959) estudando *C. beticola* e o efeito da temperatura no período de incubação, observou relação entre tais variáveis, sendo de 19 a 21 dias à 15°C, de 9 a 10 dias à 25°C, de 7 a 8 dias o período de incubação à 30°C e a 35°C não ocorreu infecção do patógeno. Com relação a produção de cercosporina, para *C. asparagi*, *C. beticola* e *C. kikuchii*, as maiores produções da toxina ocorreram entre 20 e 30°C (JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989).

Assim, observa-se espécies de *Cercospora* respondendo diferentemente à temperatura e variando de acordo com a variável avaliada. Para *C. coffeicola*, poucos são os trabalhos encontrados na literatura sobre o efeito da temperatura afetando as variáveis como as citadas acima para outras espécies de *Cercospora*, logo, estas precisam ser elucidadas, visto a influência da temperatura em fitopatógenos do mesmo gênero. As temperaturas mais favoráveis ao fitopatógeno podem também ser utilizadas em conjunto com outras técnicas, para caracterizar populações de espécies de *Cercospora* (GROENEWALD; GROENEWALD; CROUS, 2005) e segundo Campbell e Madden (1990) a variável de maior influência nos componentes biológicos do patossistema para o progresso de uma epidemia é a temperatura.

2.2.2 Intensidade luminosa

No patógeno, a qualidade e a intensidade luminosa, podem afetar a produção de conídios, a pigmentação, o desenvolvimento sexual, a germinação, a formação de estruturas de resistência, o tamanho e a forma de conídios (MINUSSI et al., 1977). Geralmente, os fungos sensíveis à luminosidade, esporulam quando expostos à luz contínua, porém outros requerem um período no escuro, variando entre as espécies e até mesmo dentro delas. Outras espécies de fungos requerem luz para iniciar a formação dos conidióforos e a esporogênese, entretanto, a esporulação é inibida por luz (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).

Em cafeeiro, evidenciou-se a importância da intensidade luminosa na ocorrência e no progresso da doença quando Quesada (1950) observou plantas de café inoculadas com *C. coffeicola* e mantidas na sombra e por vários meses, estas não exibiram sintomas de cercosporiose, porém, quando expostas ao sol, as plantas apresentaram grande quantidade de sintomas. O mesmo resultado foi encontrado por Echandi (1959), quando observou as cercosporioses serem mais severas em plantios instalados a pleno sol, quando comparados a plantios sombreados. Este autor também observou a penetração ocorrendo via estômatos e em maior frequência em plantas expostas ao sol, hipotetizando o fato das plantas expostas ao sol umidecerem e secarem com maior frequência em relação àquelas expostas à sombra, favorecendo assim a penetração do patógeno.

A intensidade da cercosporiose do cafeeiro é, portanto, influenciada por sombreamento, sendo maior em plantios instalados a pleno sol (ECHANDI, 1959), justificado posteriormente pela identificação da cercosporina, toxina produzida e ativada na presença de luz, funcionando como fator de agressividade (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005; FAJOLA, 1978). Na Colômbia, a cercosporiose tornou-se importante principalmente devido à modificação do

sistema de cultivo, o qual passou de total ou parcialmente sombreado para campos abertos, à plena exposição solar (LÓPEZ-DUQUE; FERNÁNDEZ-BORRERO, 1969). Santos (2010) observou maior incidência da doença no terço médio das plantas para a face de exposição voltada para o hemisfério norte, devido à maior incidência solar. Diferente do hemisfério norte do globo terrestre, a maior exposição de luz solar no hemisfério sul ocorre na face de exposição das plantas voltadas para o norte (VIANELLO; ALVES, 1991).

Patógenos do gênero *Cercospora* geralmente produzem cercosporina, toxina incluída no grupo químico das perylenequinonas, o qual inclui moléculas fotossensibilizadoras (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). A cercosporina foi isolada em 1950 a partir de *C. kikuchii*, em soja (KUYAMA; TAMURA, 1957). A toxina é de cor vermelha, sendo pouco solúvel em água, e devido à essa limitada solubilidade em água, quando secretada durante o crescimento micelial, em meio de cultura, forma cristais vermelhos, os quais acumulam-se no meio de cultura, sendo facilmente visíveis (DAUB, 1982a). A principal característica do grupo é a capacidade de absorver energia luminosa e os mesmos comprimentos de onda de luz necessários para as plantas realizarem a fotossíntese, também ativam a toxina.

Vários fatores afetam a produção da toxina, porém, a incidência de energia luminosa é crucial para a sua produção e atividade (JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989). Na presença de luz, a cercosporina torna-se excitada e capaz de reagir com outras moléculas, sendo o oxigênio o principal alvo de reação, levando a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais culminam com à destruição das membranas celulares das plantas, devido a peroxidação de lipídios, acarretando no vazamento de nutrientes necessários para o crescimento e esporulação do patógeno no hospedeiro (Figura 1), característica típica de fungos hemibiotróficos.

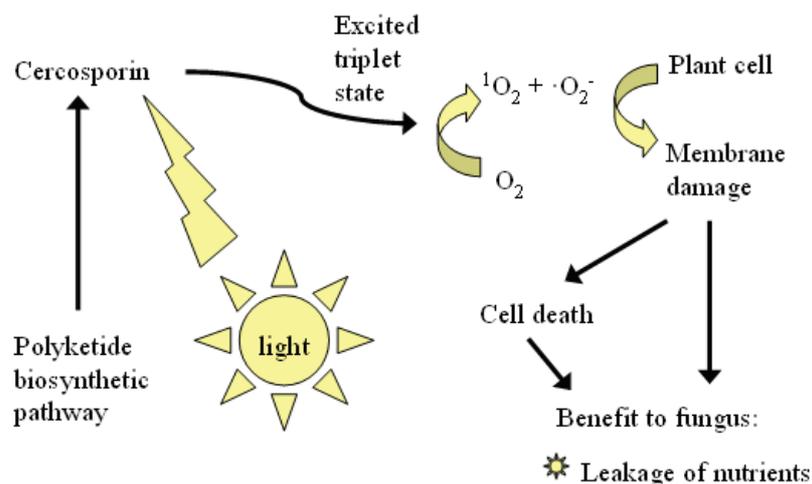


Figura 1 Ativação da cercosporina por luz, culminando com a peroxidação de lipídios da membrana e consequente extravasamento de nutrientes da célula vegetal

Fonte: (DAUB; CHUNG, 2007).

Apenas espécies de *Cercospora* e de outros fungos produtores de toxinas de atividade semelhante resistem à ação oxidante da mesma (DAUB; CHUNG, 2007), sendo poucas exceções conhecidas, como *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, a qual é capaz de detoxificar a cercosporina (TAYLOR; MITCHELL; DAUB, 2006). Embora a cercosporina seja um metabólito secundário tóxico para a maioria das células, espécies de *Cercospora* são imunes devido a presença de transportadores, os quais são responsáveis por transportar a toxina para o exterior da célula (DAUB; EHRENSHAFT, 2000). Em plantas, o tratamento de células e tecidos vegetais com cercosporina na presença de luz, resultou na peroxidação de lípidos da membrana (DAUB, 1982a, 1982b; DAUB; BRIGGS, 1983).

A produção de cercosporina *in vitro* varia entre espécies e entre isolados de uma espécie (FAJOLA, 1978; JENNS; DAUB; UPCHURCH, 1989).

Espécies nas quais detectou-se a toxina *in vitro*, observou-se relação entre a quantidade detectada e a agressividade nas respectivas plantas hospedeiras (FAJOLA, 1978). Para *C. kikuchii*, por exemplo, houve correlação de 83% entre a concentração *in vitro* e a severidade em plantas de soja inoculadas com isolados do patógeno (ALMEIDA et al., 2005). Isolados mutantes de *C. kikuchii* (com produção de cercosporina inferior a 2% do normal) infectaram plantas, mas foram menos agressivos em relação aos isolados não mutados, com produção normal de cercosporina (DAUB; EHRENSHAFT, 2000).

Como constatado com *C. beticola* em beterraba e *C. coffeicola* em cafeeiro, a toxina não afetou a penetração e a infecção, mas influenciou o desenvolvimento do patógeno a partir da infecção (CALPOUZOS; STALLKNECHT, 1967; DAUB; CHUNG, 2007; DAUB; EHRENSHAFT, 2000; DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005; ECHANDI, 1959). Estudos envolvendo a infecção de banana, café, algodão e beterraba com espécies de *Mycosphaerella*, *Cercospora* e *Alternaria* mostraram fortes correlações entre a severidade da doença, intensidade luminosa e comprimento do dia (CALPOUZOS; STALLKNECHT, 1967; ECHANDI, 1959; THOROLD, 1940).

Estudos ultra-estruturais de danos celulares em folhas de beterraba açucareira infectadas com *C. beticola*, apresentaram danos na membrana, devido a produção de cercosporina por *C. beticola* (STEINKAMP et al., 1981). Estudos com mutantes deficientes em cercosporina confirmaram o importante papel da toxina no progresso da doença. Em outro experimento, mutantes cujo gene MAP quinase quinase foi rompido em *C. zae-maydis*, observou-se pequenas lesões cloróticas quando comparado com as grandes lesões necróticas causadas por tipo selvagem, em milho. Mutantes de *C. nicotianae*, deficientes na produção de cercosporina, obtidos através da ruptura de CTB1, produziram significativamente menos e menores lesões em fumo em relação ao tipo selvagem (CHOQUER et al., 2005).

Além disso, a luminosidade pode afetar também características culturais de *C. coffeicola*, como a cor da colônia, a qual varia em meio de cultura em função das condições de luminosidade. No escuro as colônias variam de preto-esverdeado, no início do desenvolvimento, a branco-leitoso e a pardo no final (MARTINS; MAFFIA; MIZUBUTI, 2008). Na presença de luz pode haver a produção de cercosporina, a qual produz pigmento de cor vermelha, e, conseqüentemente, a cor da colônia varia de vermelho claro a intenso, dependendo da capacidade do isolado em produzir a toxina (DAUB; HERRERO; CHUNG, 2005).

Devido à importância da intensidade luminosa para a planta hospedeira e também para patógenos do gênero *Cercospora*, como demonstrado para outras espécies do mesmo gênero e também por esta variável influenciar diretamente na produção e ativação da cercosporina, torna-se necessário o estudo desta variável no patossistema *Cercospora coffeicola* x *Coffea arabica*.

2.2.3 Molhamento foliar

A água é importante tanto para o hospedeiro (TAIZ; ZEIGER, 2013) quanto para o patógeno e a doença (AGRIOS, 2005). Para o hospedeiro, aqui o cafeeiro, a principal forma de adquirir água é via raiz, no entanto a umidade relativa do ar e o molhamento foliar são importantes para regular a abertura e o fechamento de estômatos. Já para o patógeno, o molhamento foliar influencia a germinação, a infecção e a esporulação dos fungos, além da produção e transporte de inóculo (HUBER; GILLESPIE, 1992).

Entende-se por molhamento foliar à presença de água livre sobre o tecido vegetal, podendo ser fornecida por meio de irrigação, chuva ou orvalho (HUBER; GILLESPIE, 1992), parâmetro este importante em sistemas de alerta fitossanitários (KIM; GLEASON; TAYLOR, 2006) e em estudos de trocas

gasosas da fotossíntese e da transpiração (HANBA; MORIYA; KIMURA, 2004).

O período de molhamento foliar é um fator do ambiente considerado indispensável para a germinação da maioria dos fungos. Além de influenciar na penetração do tubo germinativo, a umidade pode aumentar a suscetibilidade a certos patógenos afetando a incidência e a severidade da doença (WAGGONER, 1960). Segundo Echandi (1959) e Quesada (1950), os conídios de *C. coffeicola* requerem um filme de água livre para germinarem. A importância do molhamento foliar para *C. coffeicola* foi demonstrada por Fernandes et al. (1991), estudando os períodos de molhamento foliar de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas na intensidade da cercosporiose, observaram os maiores valores de incidência nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas de molhamento foliar. Já a severidade e a taxa de desfolha foram máximas a 6 e 12 horas de molhamento, porém, este autor não estudou a interação com outras variáveis, como a temperatura, sendo usado a temperatura fixa de 25°C.

A umidade em termos de quantidade e duração é essencial no processo infeccioso para a maioria dos fitopatógenos (SILVA; RIOS; SILVA, 2001). Períodos de molhamento foliar na faixa acima de seis até 48 horas foram considerados os melhores para o progresso da cercosporiose e também nesta faixa observou-se o maior diâmetro das lesões nas folhas (CARISSE; KUSHALAPPA, 1990). Wallin e Loonan (1971) estudando o período de incubação de *C. beticola*, em diferentes períodos de molhamento foliar e diferentes concentrações de inóculo, na temperatura fixa de 29°C, observaram aos sete dias após a inoculação, no tratamento de 72 horas de molhamento após inoculação, a produção de numerosas lesões em todas as concentrações testadas, enquanto poucas foram observadas no tratamento de 48 horas de molhamento. Apenas aos dez dias após inoculação, em todas as concentrações, observou-se sintomas da doença no tratamento de 12 horas. Com isso, os autores concluíram,

que a concentração de conídios e a duração do período de molhamento foliar influenciam no período de incubação e na severidade da doença.

Cooperman e Jenkins (1986) submeteram plantas de aspargo inoculadas com *C. asparagi* aos períodos de 0, 24, 48, 96 e 168 horas de molhamento foliar após a inoculação e observaram ausência e máxima infecção nos períodos de 0 e 168 horas de molhamento, respectivamente. Casela e Brancão (1981) após inocularem plantas de soja com *C. sojina* e manterem estas sob condições de alta umidade, observaram maior incidência da doença após 48 horas de molhamento foliar. Murakishi, Honma e Knutson (1960), inoculando *C. apii* em aipo e fornecendo altas condições de umidade, observaram após 14 dias, alta incidência da doença. Whitney e Mann (1981) inocularam *C. beticola* em beterraba e em seguir estas foram acondicionadas em câmara úmida por 72 horas e após 30 dias, alta incidência foi observada. O mesmo foi observado para *C. arachidicola* em amendoim, após 72 horas de molhamento foliar.

Carisse e Kushalappa (1990) observaram que em geral, a infecção por *C. carotae* ocorre depois de 12 horas de molhamento foliar e aumenta com o aumento da duração do período de molhamento. A infecção máxima para este patossistema foi observado a 96 horas de molhamento, período máximo testado no experimento. Darpoux, Lebrun e De La Tullayes (1953) relataram infecção foliar não significativa em beterraba açucareira até estas serem expostas a condições saturadas por 72 horas. Logo, o período de molhamento foliar é uma importante variável para o estabelecimento e progresso da doença e seu estudo com outras variáveis torna-se necessário para entender a epidemiologia das doenças.

2.2.4 Interação de variáveis ambientais

Apesar da importância do estudo da interação entre as variáveis ambientais acima mencionadas e seu efeito em doenças causadas por fitopatógenos, não foi encontrado na literatura o estudo de tais interações para o patossistema *Cercospora coffeicola* e *Coffea arabica*.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Burlington: Elsevier, 2005. 952 p.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 594-602, nov./dez. 2005.
- BALIS, C.; PAYNE, M. G. Triblycirides and cercosporin from *Cercospora beticola*: fungal growth and cercosporin production. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 1477-1484, 1971.
- BECKMAN, P. M.; PAYNE, G. A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zea-maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 2, p. 286-289, 1983.
- BRUNELLI, K. R. et al. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopatologica**, Jaguaíuna, v. 32, n. 1, p. 92-94, jan./mar. 2006.
- BUITRAGO-JARAMILLO, H. L.; FERNÁNDEZ-BORRERO, O. Esporulation *in vitro* de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke. **Cenicafé**, Chinchina, v. 33, p. 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**, Saint Paul, v. 95, n. 3, p. 257-261, Mar. 2005.
- CALPOUZOS, L.; STALLKNECHT, G. F. Symptoms of cercospora leaf spot of sugar beets influenced by light intensity. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 1, p. 799-780, 1967.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.

CANOVA, A. Ricerchesulla biologia e l'epidemiologia della *Cercospora beticola* Sacc. **Ann. Sper. Agr.**, Rome, v. 13, p. 37-82, 1959.

CARISSE, O.; KUSHALAPPA, A. C. Development of an infection model for *Cercospora carotae* on carrot based on temperature and leaf wetness duration. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 11, p. 1233-1238, 1990.

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**, Saint Paul, v. 83, n. 1, p. 338-343, 1993.

CASELA, C. R.; BRANCÃO, N. Avaliação da resistência de linhagens de soja (*Glycine max* L.) à mancha de olho rã (*Cercospora sojina* Hara). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 475-482, 1981.

CHOQUER, M. et al. The CTB1 gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin toxin biosynthesis and fungal virulence in *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 5, p. 468-476, 2005.

CHUPP, C. A. **Monograph of the fungus genus *Cercospora***. Ithaca: [s.n.], 1953. 667 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_09_09_18_57_boletim_cafe_-_original.pdf>. Acesso em: 16 maio 2014.

COOKE, M. C. *Cercospora coffeicola*. **Grevillea**, Cincinnati, v. 9, p. 99, 1881.

COOPERMAN, C. J.; JENKINS, S. F. Conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora asparagi* and cercospora blight development in *Asparagus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 1, p. 617-622, 1986.

CRUZ, C. D.; DORRANCE, A. E. Characterization and survival of *Cercospora sojina* in Ohio. **Plant Health Progress**, Saint Paul, May 2009. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2009/frogeye/>>. Acesso em: 10 maio 2014.

CUSTÓDIO, A. A. P. et al. Intensidade da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro quanto à face de exposição das plantas. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 3, p. 214-228, set./dez. 2010.

DARPOUX, H.; LEBRUN, A.; DE LA TULLAYES, B. On the phenomenon of infection of *Cercospora beticola*. **Phytiatrie-Phytopharm**, v. 2, p. 125-131, 1953.

DAUB, M. E. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 4, p. 370-374, 1982a.

DAUB, M. E. Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 69, n. 6, p. 1361-1364, 1982b.

DAUB, M. E.; BRIGGS, S. P. Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by the fungal toxin, cercosporin. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 71, n. 4, p. 763-766, 1983.

DAUB, M. E.; CHUNG, K. R. **Cercosporin**: a photoactivated toxin in plant disease. Saint Paul: APSnet Features, 2007. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Cercosporin.aspx>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

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

DAUB, M. E.; HERRERO, S.; CHUNG, K. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 252, n. 2, p. 197-206, 2005.

DELL'ACQUA, R. et al. Variabilidade *in vitro*, *in vivo* e molecular de isolados de *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 313-326, 2011.

DEL PELOSO, M. C. et al. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 41-44, 1989.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2nd ed. Boca Raton: Lewis, 1995. 442 p.

ECHANDI, E. La chasparria de los cafetos causada por El hongo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. **Turrialba**, San José, v. 9, p. 54-67, 1959.

FAJOLA, A. O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**, New York, v. 13, n. 2, p. 157-164, 1978.

FERNANDES, C. D. et al. Influência da concentração de inóculo de *Cercospora coffeicola* e do período de molhamento foliar na intensidade da cercosporiose do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, p. 39-43, mar. 1991.

FERNÁNDEZ-BORRERO, O.; MESTRE, A. M.; DUQUE, S. L. Efecto de la fertilizacion em la incidência de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) em frutos de café. **Cenicafé**, Caldas, v. 1, p. 5-16, 1966.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê**. Passo Fundo: UPF, 2004. 528 p.

GRANER, E. A.; GODOY JÚNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: USP, 1967. 320 p.

GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 8, p. 951-959, 2005.

HANBA, Y. T.; MORIYA, A.; KIMURA, K. Effect of leaf surface wetness and wettability on photosynthesis in bean and pea. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 413-421, 2004.

HUBER, L.; GILLESPIE, T. J. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 553-577, 1992.

JENNS, A. E.; DAUB, M. E.; UPCHURCH, R. G. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 2, p. 213-219, 1989.

KHARE, K. B. et al. Effect of media, pH and temperature on growth and sporulation of *Cercospora zea-maydis*, the causal agent of grey leaf spot of maize. **International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences**, Jaipur, v. 2, p. 87-90, May/Aug. 2012.

KIM, K. S.; GLEASON, M. L.; TAYLOR, S. E. Forecasting site-specific leaf wetness duration for input to disease-warning systems. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, n. 5, p. 650-656, 2006.

KUYAMA, S.; TAMURA, I. Cercosporin: a pigment of *Cercospora kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu: II., cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. **Journal of the American Chemistry Society**, Washington, v. 79, n. 21, p. 5725-5726, 1957.

LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; SANTOS, F. S. Relationship between incidence of brown eye spot of coffee cherries and the chemical composition of coffee beans. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 4, p. 209-211, Apr. 2012.

LÓPEZ-DUQUE, S.; FERNÁNDEZ-BORRERO, O. Epidemiología de la mancha de hierro del caféto (*Cercospora coffeicola* Berk. & Cook.). **Cenicafé**, Caldas, v. 20, p. 3-19, 1969.

MARTINS, R. B.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Genetic variability of *Cercospora coffeicola* from organic and conventional coffee plantings, characterized by vegetative compatibility. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, p. 1205-1211, Nov. 2008.

MATIELLO, J. B.; CARVALHO, F. Pesquisa cafeeira: contribuição marcante para o desenvolvimento da cafeicultura. In: MALAVOLTA, E. et al. (Coord.). **Nutrição e adubação do cafeeiro**. 3. ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1983. p. 1-9.

MINUSSI, E. et al. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 167-171, 1977.

MURAKISHI, H. H.; HONMA, S.; KNUTSON, R. Inoculum production and seedling evaluation of celery for resistance to *Cercospora apii*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 50, n. 8, p. 505-507, 1960.

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**, Quebec, v. 89, n. 6, p. 624-630, 2005.

POZZA, E. A.; CARVALHO, L. C.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. A nutrição mineral no manejo de doenças de plantas. In: GRUPO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM FITOPATOLOGIA. **Nutrição mineral no manejo de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFA, 2012. v. 1, p. 177-212.

QUESADA, G. T. R. **Estudios sobre la mancha de la hoja del café producida por *Cercospora* en la región de Turrialba, Costa Rica**. Turrialba: [s.n.], 1950. 90 p.

SANTOS, F. S.; SOUZA, P. E.; POZZA, E. A. Epidemiologia da cercosporiose em cafeeiro (*Coffea arabica* L.) fertirrigado. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 31-37, jan./mar. 2004.

SANTOS, L. S. D. **Incidência da cercosporiose em frutos de cafeeiro irrigado**. 2010. 42 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SCHUMANN, G. L.; ARCY, C. J. d'. **Review of hungry planet: stories of plant diseases essential plant pathology**. Saint Paul: APS, 2012. 304 p.

SILVA, S. R.; RIOS, G. P.; SILVA, S. C. Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 726-731, 2011.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, Jan. 2011.

SOUZA, A. G. C.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Cultural and aggressiveness variability of *Cercospora coffeicola*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 10, p. 540-546, Oct. 2012.

STEINKAMP, M. P. et al. Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by cercosporin, a toxin from *Cercospora beticola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 12, p. 1272-1281, 1981.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

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

THOROLD, C. A. Cultivation of bananas under shade for the control of leaf spot disease. **Tropical Agriculture, Trinidad and Tobago**, Port of Spain, v. 17, p. 213-214, 1940.

VALÊNCIA, A. G. Estudio fisiológico de la defoliación causada por *Cercospora coffeicola* em el cafeto. **Cenicafé**, Chinchina, v. 21, p. 105-114, 1970.

VIANELLO, R. L.; ALVES, A. R. **Meteorologia básica e aplicações**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 449 p.

WAGGONER, P. E. Forecasting epidemics. In: HORSFALL, J. G.; COWLING, E. B. (Ed.). **Plant pathology**. San Francisco: Academic, 1960. v. 3, p. 291-310.

WALLIN, J. R.; LOONAN, D. V. Effect of leaf wetness duration and air temperature on *Cercospora beticola* infection of sugar beet. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 546-549, May 1971.

WELLMAN, F. L.; QUESADA, T. R. **Certain factors limiting *Cercospora* disease on coffee leaves**. México: Secretaria da Agricultura y Ganaderia, 1951. 251 p.

WHITNEY, E. D.; MANN, N. F. Effect of resistance on growth of *Cercospora beticola* race C2 on the leaf surface and within leaf tissue of sugar beet. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, n. 6, p. 633-638, 1981.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS**ARTIGO 1 Esporulação e germinação de conídios de *Cercospora coffeicola* em diferentes temperaturas e intensidades luminosas**

Redigido conforme as normas para submissão na revista *Coffee Science*.

RESUMO: Obter abundante esporulação em meio de cultura, para muitas espécies de *Cercospora*, pode ser o fator limitante em estudos de biologia, sistemática e inoculação das espécies do gênero. Por isso, faz-se necessário o entendimento dos requerimentos nutricionais e ambientais, os quais influenciam o crescimento micelial, a esporulação e a germinação. Devido a dificuldade de obter conídios de *Cercospora coffeicola in vitro*, objetivou-se avaliar diferentes condições de temperatura (17, 22, 27 e 32°C) e intensidade luminosa (80, 160, 240 e 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com o intuito de otimizar a esporulação do patógeno e avaliar as condições favoráveis à germinação dos conídios, visando táticas de controle da doença. Para a esporulação, adicionou-se o tratamento escuro (0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Observou-se interação significativa entre temperatura e intensidade luminosa para ambas as variáveis testadas. A maior esporulação de *C. coffeicola* foi observada na intensidade de 240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e na temperatura de 22°C. Na intensidade luminosa de 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi onde observou-se a menor esporulação, seguido pela intensidade de 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Com relação à germinação, esta foi maior na temperatura de 17°C e na intensidade luminosa de 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, intensidade onde observou-se o maior índice de germinação, enquanto a menor foi sempre observada à 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (menor intensidade testada), independente da temperatura. A interação entre intensidade luminosa e temperatura, mostrou influenciar os processos de esporulação e germinação de *C. coffeicola*.

Termos para indexação: Variáveis ambientais, cercosporiose, *Coffea arabica*.

SPORULATION AND GERMINATION CONIDIA OF *Cercospora coffeicola* AT DIFFERENT TEMPERATURES AND LIGHT INTENSITIES

ABSTRACT: *To obtain abundant sporulation in culture medium, for many species of Cercospora, may be the limiting factor in studies of biology, systematics and inoculation of the genus. Therefore, it is necessary to understand the nutritional and environmental requirements, which influence the mycelial growth, sporulation and germination. Due to the difficulty of obtaining conidia of Cercospora coffeicola in vitro, aimed to evaluate different temperatures (17, 22, 27 and 32° C) and light intensity (80, 160, 240 and 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), in order to optimize the pathogen sporulation and evaluate favorable conditions for spore germination, aiming strategies to control the disease. For sporulation, was added the dark treatment (0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A significant interaction between temperature and light intensity for both variables tested. Most sporulation of C. coffeicola was observed in intensity at 240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and at temperature of 22°C. In light intensity of 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ was where there was the least sporulation, followed by the intensity of 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. With respect to germination, it was higher in temperature of 17°C and light intensity of 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, disease where was observed the highest rate of germination, while the lowest was always observed at 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (lowest tested intensity), independent of temperature. The interaction between light intensity and temperature, shown to influence the processes of sporulation and germination of C. coffeicola.*

Index terms: *Environmental variables, cercospora leaf spot, Coffea arabica.*

1 INTRODUÇÃO

A cercosporiose do cafeeiro, cujo agente etiológico é *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke, ocorre desde mudas no viveiro até plantas em produção no campo, causando sérios prejuízos ao agricultor (POZZA et al., 2010). A intensidade dos sintomas, assim como o crescimento, o desenvolvimento, a capacidade de infecção do patógeno e as respostas fisiológicas da planta à sua penetração e a colonização podem ser influenciados por variáveis ambientais, como temperatura, molhamento foliar, luminosidade, disponibilidade de água e fertilidade do solo. Para a maioria dos fungos, a luminosidade e a temperatura são capazes de induzir ou inibir o crescimento do micélio, influenciar a esporulação e a germinação dos conídios, bem como seu período de incubação e o progresso da doença (SCHUMANN & D'ARCY, 2012; CAMPBELL & MADDEN, 1990). Em fitopatógenos, a temperatura pode também influenciar o crescimento da colônia, a esporulação e a germinação dos conídios (WAGGONER, 1960).

Trabalhos envolvendo o estudo de 30 diferentes meios de cultura para otimizar a esporulação de espécies de *Cercospora in vitro*, não foram inicialmente bem sucedidos para *C. beticola*, *C. dubia*, *C. davisii* e *C. zebrina* (NAGEL & DIETZ, 1932). Posteriormente, obteve-se abundante esporulação de *C. beticola* em meio composto da decocção de folhas de beterraba e ágar (NAGEL, 1934). Este autor observou, para todas as espécies de *Cercospora* testadas, quando se procedia a transferência de culturas esporulantes, conídios eram produzidos em grandes quantidades, enquanto a transferência de micélio produzia apenas hifas estéreis. Já para *C. nicotianae* a esporulação foi otimizada em meio de decocção de folhas de fumo-ágar (DIACHUN & VALLEAU, 1941; STAVELY & NIMMO, 1968) e em meio V8-ágar (STAVELY & NIMMO, 1968; QUEIROZ & MENEZES, 1993), e a temperatura ótima para esporulação foi de 18°C (STAVELY & NIMMO, 1968), discordando do obtido

anteriormente por Diachun & Valleau (1941), os quais observaram maior esporulação a 27°C.

A luz, especialmente em condições naturais, é fator importante, embora menos efetivo quando comparado à temperatura e umidade sobre o progresso da cercosporiose. A duração e/ou, a intensidade luminosa pode aumentar ou reduzir tanto a suscetibilidade de plantas à infecção como a severidade da doença (WAGGONER, 1960). A intensidade da cercosporiose do cafeeiro foi demonstrada ser também influenciada pelo sombreamento, sendo maior em plantios instalados a pleno sol (ECHANDI, 1959). A qualidade e a intensidade da luz são suas principais características, as quais são capazes de afetar também a esporulação e a germinação de conídios, a taxa de crescimento vegetativo e a indução de formação de estruturas reprodutivas (MINUSSI et al., 1977). Também podem ser afetadas a pigmentação, forma e tamanho dos esporos de grande parte das espécies fúngicas (TEIXEIRA et al., 2001; MATHUR et al., 1973).

A maioria dos fungos sensíveis à luminosidade esporula quando expostos à luz contínua, porém alguns, chamados de esporuladores diurnos, requerem um período no escuro, geralmente com variabilidade entre as espécies e até mesmo dentro delas. Outras espécies de fungos requerem luz para iniciar a formação de conidióforos e a esporogênese, entretanto, a esporulação é inibida pela luz (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). Para *C. nicotianae* a maior esporulação foi observada em fotoperíodo de 12 horas quando comparada ao escuro contínuo (QUEIROZ & MENEZES, 1993). Já Kilpatrick & Johnson (1956) ao estudarem várias espécies de *Cercospora*, em meio de decocção de folha de cenoura-ágar, observaram quando as culturas foram expostas à luz do dia, abundante esporulação em relação àquelas mantidas no escuro.

Na literatura, os relatos sobre a necessidade de luz para a esporulação de *C. coffeicola* são controversos. Inicialmente, Echandi (1959) não observou

influência do regime de luz (escuro contínuo, luz contínua, ou alternância luz-escuro) na esporulação do fungo, porém, Buitrago Jaramillo & Fernández Borrero (1982) descreveram maior esporulação sob 9 horas de luz alternada com 15 horas de escuro e ainda Del Peloso et al. (1989) sob luz contínua, no entanto, não estudaram a interação com a temperatura. Dessa forma não houve consenso quanto a necessidade e ao tempo de exposição do patógeno à luz para esporulação e qual a temperatura de incubação nessas condições, seriam necessários para incrementar a produção de conídios e viabilizar a inoculação desse patógeno. Além de produzirem poucos conídios *in vitro*, espécies do gênero *Cercospora* caracterizam-se também por crescimento lento, dificultando estudos com o patógeno.

Com relação a germinação, conídios de *C. arachidicola* germinaram na superfície foliar (ABDOU et al., 1974; JENKINS, 1938) e em lâmina de vidro (OSO, 1972), em temperaturas entre 25 a 30°C, com intervalo de três a seis horas de incubação, em condições de umidade próxima a saturada. A faixa ótima de temperatura para a germinação foi observada de 20 a 30°C, com baixa germinação ocorrendo acima de 30°C (OSO, 1972). Para *C. zea-maydis*, a luz constante inibiu a germinação de conídios, a alongação do tubo germinativo e a esporulação (BECKMAN & PAYNE, 1983), porém, conidióforos formaram-se, mas a produção de conídios foi inibida, concordando com os resultados obtidos por Latterell & Rossi (1974).

Até onde se sabe, não foi estudado o efeito da interação entre temperatura e intensidade luminosa na esporulação e na germinação de *C. coffeicola*. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito dessa interação em tais variáveis para *C. coffeicola*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos abaixo foram conduzidos duas vezes.

Obtenção de isolados

A partir de folhas de cafeeiros coletadas no município de Lavras – MG, infectadas com o patógeno e apresentando diferentes níveis de severidade da doença, foram obtidos dez isolados de *C. coffeicola*, os quais foram incubados a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, em meio malte (20 g de extrato de malte, 20 g de Agar e 1000 mL de água destilada). Posteriormente, procedeu-se a obtenção de culturas puras.

Esporulação do patógeno e teste de patogenicidade

Para obter conídios de *C. coffeicola*, 12 discos de meio contendo micélio, com 0,5 cm de diâmetro, foram retirados das bordas das colônias em placas de Petri e transferidos para 30 mL de meio de suco de tomate temperado líquido (STT) em Erlenmeyer de 125 mL. O STT foi composto por 200 mL de suco de tomate ‘Super Bom[®]’, 3,2 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada. Os Erlenmeyers com o STT e o fungo permaneceram sob agitação contínua a 120 rpm, a 25°C aproximadamente. Após quatro dias, verteu-se o conteúdo de cada Erlenmeyer em STT sólido, meio anterior acrescido de 16 g de ágar por litro de meio, em duas placas de Petri, as quais permaneceram abertas em câmara de crescimento tipo BOD a 25°C sob luz contínua. Quando o meio desidratou, dois dias após, adicionou-se 5 mL de água destilada em cada placa e em seguida estas foram raspadas superficialmente com um bastão de vidro e a suspensão filtrada em uma camada de gaze esterilizada. Em microscópio óptico, com auxílio de hemacitômetro, estimou-se a concentração de conídios de cada isolado no filtrado, pela média das leituras nos dois campos de contagem da lâmina. Esse procedimento foi realizado por duas vezes, totalizando quatro leituras. A partir destas, com a diluição em água, calibrou-se suspensão de inóculo para 2×10^4 conídios. mL⁻¹.

Com a suspensão anterior, realizou-se o teste de patogenicidade dos dez isolados obtidos, por pulverização em ambas as faces das folhas até o ponto de escorrimento, em mudas da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 com quatro a cinco pares de folhas verdadeiras, cultivadas em substrato padrão (700 litros de solo e 300 litros de esterco de curral por metro cúbico de mistura), sendo adicionados 1,0 kg de P_2O_5 (5 kg de superfosfato simples) e 0,3 kg de K_2O (0,5 kg de cloreto de potássio), as quais foram mantidas em umidade relativa do ar superior a 90%, por 72 horas em câmara de crescimento a 21°C. O delineamento experimental foi o em blocos casualizados, com três repetições, cada uma com duas plantas. Para escolher o isolado, aos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a incidência e a severidade da doença em todas as folhas. A incidência foi determinada contando-se o número de folhas doentes em relação ao total de folhas da planta. A severidade (porcentagem da área foliar lesionada) foi avaliada, em todas as folhas com incidência, de acordo com a escala de Custódio et al., (2011). Com os dados, procedeu-se a análise de variância.

Produção de cercosporina *in vitro*

Para avaliar a produção de cercosporina de cada isolado, provenientes de colônias crescidas por 14 dias em meio malte (fotoperíodo de 12 horas/25°C), retirou-se da borda das placas três discos de meio (0,5 cm de diâmetro) com crescimento micelial, os quais foram imersos em 8 mL de KOH 5N por quatro horas a 25°C, no escuro, para extração da cercosporina (JENNS et al., 1989). Decorridas às quatro horas, procedeu-se à leitura da absorbância a A_{480} nm em espectrofotômetro. Para cada isolado utilizou-se quatro repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri. A concentração da toxina no extrato foi estimada pelo uso do coeficiente de extinção molar de 23300 para as leituras realizadas (JENNS et al., 1989). Com os dados obtidos, procedeu-se à análise de variância.

Delineamento experimental dos ensaios de esporulação e germinação

Ambos os experimentos, de esporulação e de germinação foram implantados em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri.

Para a esporulação foi avaliada a interação de cinco intensidades luminosas, 0, 80, 160, 240 e 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e de quatro temperaturas, 17, 22, 27 e 32°C, em esquema de análise de variância fatorial 5x4, totalizando 20 tratamentos.

Para a germinação de conídios, também avaliou-se a mesma interação, com quatro intensidades luminosas, 80, 160, 240 e 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e quatro temperaturas, 17, 22, 27 e 32°C, em esquema de análise de variância fatorial 4x4, totalizando 16 tratamentos.

Para obter as intensidades luminosas testadas, em ambos os experimentos, utilizou-se estrutura em degraus, com duas lâmpadas metálicas de 400 Watts, localizadas a 100, 80, 60 e 40 cm das placas, para obter as intensidades luminosas de 80, 160, 240 e 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente, em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 horas.

Esporulação do patógeno

A partir de colônias do isolado selecionado de *C. coffeicola*, cultivadas em meio malte por 14 dias, retiraram-se da borda de cada colônia, 12 discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro, os quais foram transferidos para 30 mL de meio de suco de tomate temperado líquido (STT) em Erlenmeyer de 125 mL. O STT foi composto por 200 mL de suco de tomate 'Super Bom[®]', 3,2 g de CaCO_3 e 800 mL de água destilada. Os Erlenmeyers com o STT e o fungo permaneceram sob agitação contínua a 120 rpm, a 25°C aproximadamente. Após quatro dias, verteu-se o conteúdo de cada Erlenmeyer em STT sólido, meio anterior acrescido de 16 g de ágar por litro de meio, em duas placas de Petri, as

quais permaneceram abertas nos respectivos tratamentos em câmaras de crescimento. Quando o meio desidratou, dois dias após, adicionou-se 5 mL de água destilada em cada placa, as quais em seguida foram raspadas superficialmente com um bastão de vidro e a suspensão filtrada em uma camada de gaze esterilizada. Os conídios foram contados em microscópio óptico, com auxílio de hemacitômetro e a concentração por mL, foi estimada em cada tratamento pela média das leituras nos dois campos de contagem da lâmina.

Germinação de conídios

Conídios produzidos *in vitro*, como descrito anteriormente, foram obtidos e a suspensão calibrada para 1×10^4 conídios.mL⁻¹. Placas de 60x15mm contendo 10 mL de Agar-água foram preparadas e 100 uL da suspensão foram depositadas e espalhadas com alça de Drigalski e em seguida colocadas nos devidos tratamentos em câmara de crescimento para germinar. Decorridas 11 horas, paralisou-se a germinação com lactoglicerol + azul de tripan para posterior contagem dos conídios. O conídio foi considerado germinado quando o tubo germinativo foi igual ou maior à metade do comprimento do conídio (BECKMAN & PAYNE, 1983). A taxa de germinação foi obtida por meio de duas contagens da germinação de 100 conídios por placa, de forma aleatória.

Análise estatística dos experimentos

Foi realizada análise conjunta dos dois experimentos e suas respectivas repetições ao longo do tempo, tanto para a esporulação quanto para a germinação do patógeno. Os dados foram submetidos ao teste de Levene para analisar a homogeneidade e a variância dos resíduos. Como os dados seguiram as pressuposições da análise de variância (ANAVA), foi feito o teste F para as variáveis analisadas, sem a necessidade de transformar os dados, no programa SAS. Com as variáveis significativas no teste F, procedeu-se ao ajuste de

modelos lineares e não lineares de regressão. Os modelos ajustados foram obtidos no programa R. Os cortes das superfícies de resposta e os gráficos dos dados observados foram plotados no programa Sigma Plot.

3 RESULTADOS

A análise conjunta dos experimentos não foi significativa ($P>0.05$), portanto tanto os resultados da esporulação quanto da germinação referem-se as suas respectivas médias.

Teste de patogenicidade e escolha do isolado

Escolheu-se o isolado capaz de causar a maior intensidade da doença e com maior capacidade de produzir a toxina cercosporina em meio de cultura. De acordo com o resultado do teste de Tukey, o isolado 8 apresentou as maiores incidência e severidade da doença e também a maior produção de cercosporina *in vitro*, justificando a escolha deste para realizar os experimentos (Figura 1).

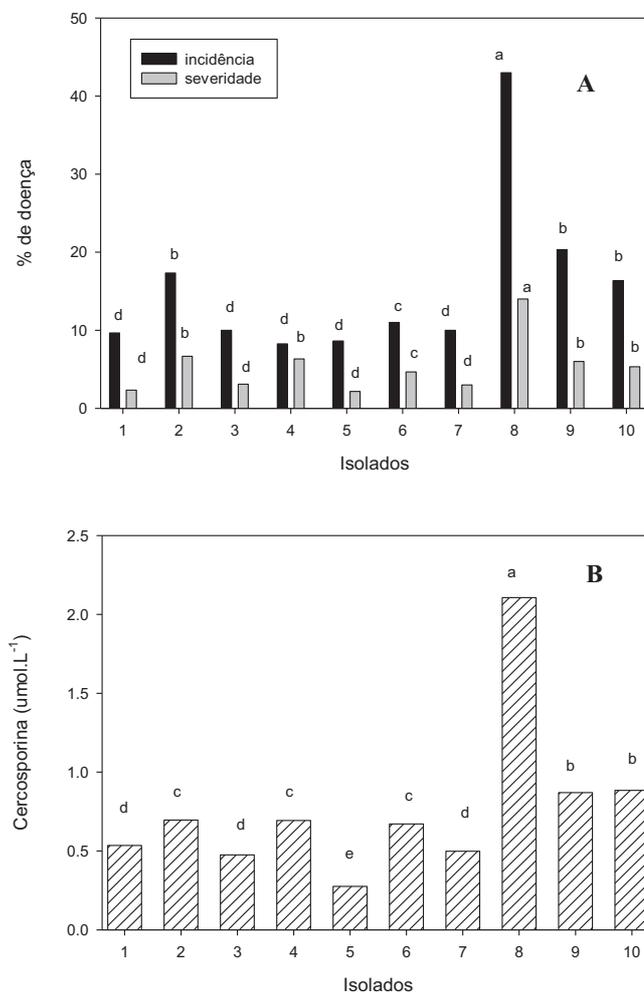


Figura 1. Incidência e severidade da doença (A) e produção de cercosporina *in vitro* (B) dos isolados obtidos.

Esporulação *in vitro* de conídios de *C. coffeicola*

Observou-se interação significativa entre intensidade luminosa e temperatura para o isolado avaliado. De acordo com os valores observados, a maior esporulação foi obtida na temperatura de 22°C e na intensidade luminosa de 240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, atingindo $5,9 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹. Já os menores valores de

esporulação foram obtidos para as extremidades das intensidades luminosas, 0 e 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em todas as temperaturas avaliadas. A partir desses valores extremos, mínimo e máximo, de luminosidade houve aumento da esporulação até a luminosidade citada. Na temperatura de 32°C foi onde observou-se a menor esporulação (Figura 2). De acordo com os ajustes realizados (Tabela 1), observou-se com base nos dois avaliadores de qualidade, a superfície de resposta gerada pelo modelo Polinomial forneceu o melhor ajuste (Tabela 2).

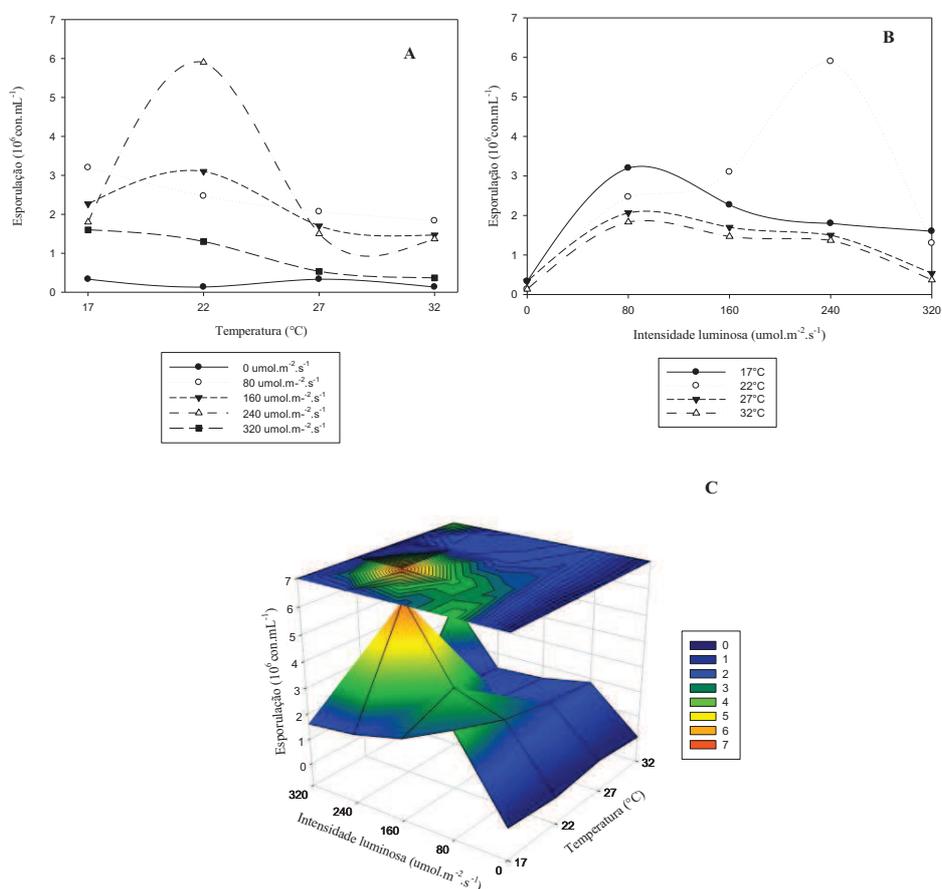


Figura 2: Esporulação de *C. coffeicola*, em função da temperatura (A), da intensidade luminosa (B) e da interação entre temperatura e intensidade luminosa (C).

Tabela 1: Estimativas para os parâmetros do modelo de regressão linear quadrático $y = a * Lum + b * Lum^2$ ajustado aos dados em função da luminosidade e $y = a * Temp + b * Temp^2$ ajustado aos dados em função da temperatura. Estimativas para os parâmetros do modelo polinomial $Y = a * Temp + b * Lum + c * Temp^2 + d * Lum^2$ ajustado aos dados de esporulação em função da luminosidade e da temperatura.

Modelos	Parâmetros	Estimativas	Erro-padrão
Quadrático Lum	a	30565,4	4487,43
	b	-85,84	16,33
Quadrático Tem	a	230753	55859
	b	-6303	2038
Polinomial	a	120487,68	35497,02
	b	26588,45	4190,45
	c	-4091,20	1126,18
	d	-76,74	12,57

Tabela 2: Qualidade de ajuste da superfície de resposta gerada pela combinação dos modelos marginais lineares quadráticos e do modelo polinomial (linear múltiplo):

Avaliadores	R_a^2	AIC*
Quadrático*Quadrático	0,5361	2480,79
Polinomial	0,7865	1839,16

*Akaike's Information Criterion

Germinação de conídios de *C. coffeicola*

Observou-se interação significativa entre intensidade luminosa e temperatura para o isolado avaliado. A maior porcentagem de germinação foi observada na temperatura de 17,0°C e na intensidade luminosa de 320 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, atingindo 52%. Independente da intensidade luminosa, a germinação reduziu com o aumento da temperatura e a 32°C obteve-se a menor germinação (Figura 3). De acordo com os ajustes realizados (Tabela 3), observou-se com base nos dois avaliadores de qualidade, a combinação dos modelos Gompertz e Linear forneceu o melhor ajuste (Tabela 4).

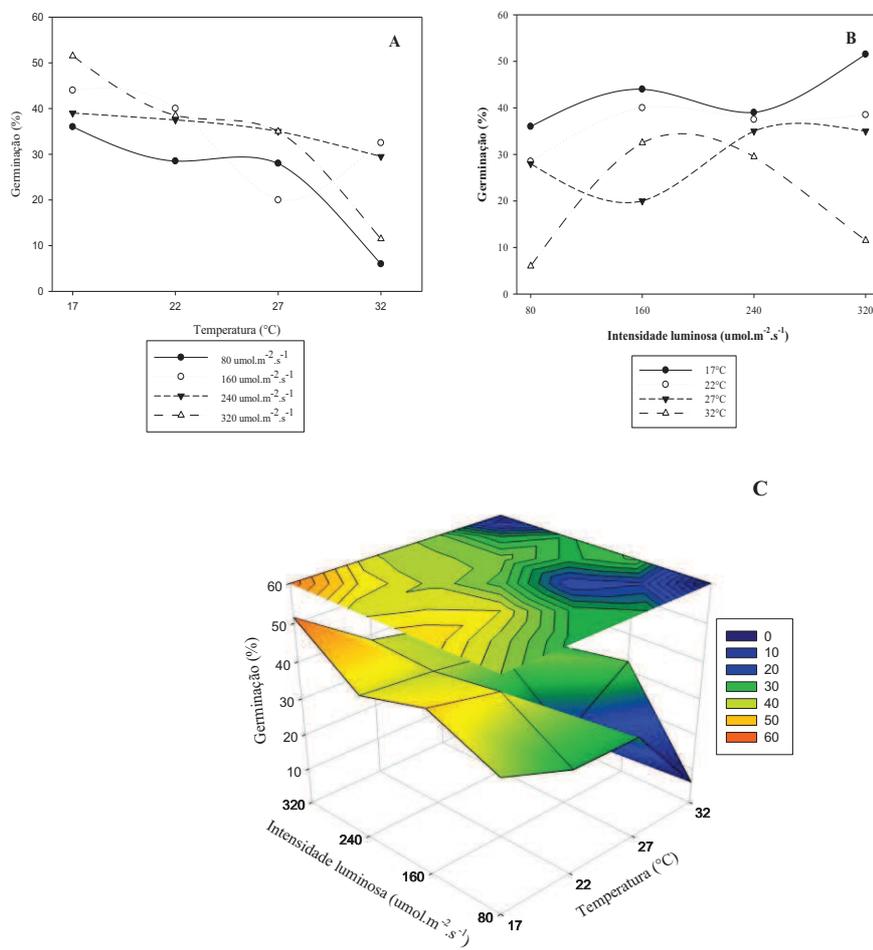


Figura 3: Germinação observada de *C. coffeicola*, em função **A**, temperatura e **B**, intensidade luminosa. **C**, Efeito da temperatura e da intensidade luminosa na germinação de *C. coffeicola*.

Tabela 3: Estimativas para os parâmetros do modelo de regressão não linear de Gompertz $y = ae^{(-e^{(-k*(Lum - b)})}$ ajustado aos dados em função da luminosidade e modelo de regressão linear simples $y = a + b * Temp$ ajustado em função da temperatura. Estimativas para os parâmetros do modelo polinomial $Y = a * Temp + b * Lum + c * (Temp * Lum)$ ajustado aos dados de germinação em função da luminosidade e temperatura.

Modelos	Parâmetros	Estimativas	Erro-padrão
Gompertz	a	34,67515	0,60178
	k	0,03946	0,02559
	b	52,83025	17,1685
Linear	a	68,7200	2,6853
	b	-1,4975	0,1069
Polinomial	a	0,899941	0,159742
	b	0,300212	0,033626
	c	-0,010304	0,001494

Tabela 4: Qualidade de ajuste da superfície de resposta gerada pela combinação dos modelos de Gompertz e linear simples e do modelo polinomial (linear múltiplo):

Avaliadores	R_a^2	AIC*
Gompertz*Linear	0,9585	194,29
Polinomial	0,9261	238,18

*Akaike's Information Criterion

4 DISCUSSÃO

Até onde se sabe, este foi o primeiro estudo relatando a interação entre temperatura e intensidade luminosa, seguidos por ajuste de modelos, para as variáveis esporulação e germinação de conídios de *C. coffeicola*. Na metodologia utilizada por Souza (2011) para obter conídios de *C. coffeicola*, foi utilizada a intensidade luminosa de $165 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, intensidade luminosa abaixo da qual observou-se a maior produção de conídios neste trabalho. Echandi (1959) observou maior esporulação de *C. coffeicola* em folhas de cafeeiro na temperatura de 24°C , mas o autor não estudou a interação com a intensidade luminosa.

Em trabalhos realizados com *C. arachidicola*, obteve-se maior esporulação em meio de extrato de folhas de amendoim-aveia-ágar a 28°C, sob regime de luz contínua (SMITH, 1971; MORAES & SALGADO, 1978). Moraes & Salgado (1978), concluíram ser a luz fator essencial na esporulação de *C. arachidicola*, pois na ausência de luz a produção de conídios foi praticamente nula, concordando com os resultados obtidos para esporulação de *C. coffeicola* neste trabalho, onde observou-se esporulação praticamente nula em condições de ausência de luz. O efeito da luminosidade foi também demonstrado para *C. beticola*, onde observou-se aumento da esporulação quando as colônias foram expostas à luz, por período de 72 horas e mantidas a 15°C em meio de extrato de folhas de beterraba-ágar (CALPOUZOS & STALLKNECHT, 1967). Anteriormente, estes autores (CALPOUZOS & STALLKNECHT, 1965) já haviam verificado interação significativa entre temperatura e luz, e, sob luz contínua, a 15 e 30°C, a esporulação do fungo foi estimulada e inibida, respectivamente. Em estudos envolvendo espécies de *Cercospora*, temperaturas entre 25 e 27°C foram as ideais para a produção de conídios (BRUNELLI et al., 2006), porém, estes autores não estudaram a interação com a variável luminosidade.

A luminosidade pode exercer efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas reprodutivas. Trione & Leach (1969) relataram para fungos cuja esporulação é induzida por luz, ocorre a ação direta desta na ativação de enzimas-chave envolvidas na esporogênese. Os mesmos autores afirmam que a quantidade e a qualidade da luz necessária para induzir a formação de estruturas reprodutivas variam de acordo com a espécie fúngica. Beckman & Paine (1983) já haviam relatado a maior produção de conídios quando submeteram um isolado de *C. zea-maydis* a fotoperíodo de 12 horas, utilizando lâmpadas brancas fluorescentes. Estes verificaram após dez dias de claro contínuo seguido de três dias de escuro, indução da esporulação, embora em quantidade inferior

àquela obtida por fotoperíodo. Já foi relatada em fungos fitopatogênicos como *Alternaria brassicae* (ROTEM et al., 1989), *Alternaria solani* (LUKENS, 1963) e *Mycosphaerella fijiensis* (HANADA et al., 2002) o uso da ausência de luz para induzir a esporulação. Nestes casos, a luz age como fotoinibidor da esporulação, com isso o fornecimento de luz seguido por um período de escuro é necessário para a completa reprodução destes patógenos.

Dados quantitativos de esporulação do patógeno são necessários para padronizar o inóculo, importante em trabalhos de avaliação da resistência e no estudo da variabilidade do patógeno, por exemplo. Em programas de controle biológico de insetos-pragas, doenças e plantas daninhas, onde há a necessidade de elevadas concentrações do agente antagonista, pode-se utilizar do comprimento de onda para obter maior esporulação do agente de biocontrole. Já para o desenvolvimento do ciclo biológico dos fungos entomopatogênicos, a temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes (IGNOFFO et al., 1976; SOSA GOMEZ, 1990).

Com relação a porcentagem de germinação, este resultado diferiu do obtido por Echanti (1959), o qual observou maior germinação de *C. coffeicola* na temperatura de 30°C, seguida por 24°C, porém o autor não estudou a interação com a intensidade luminosa. Para outras espécies de *Cercospora* também foi observada essa variação na temperatura ideal para as diferentes fases do ciclo do patógeno. Para *C. arachidicola*, Gobina & Melouk (1981) não observaram diferença significativa na germinação de conídios depois de 48 horas em suspensão aquosa nas temperaturas entre 15 a 35°C. Em contrapartida, Jenkins (1938), observou germinação de conídios em um filme de água, mas não quando imerso em água. Alderman & Beute (1986) observaram condições ótimas de germinação de conídios e alongação do tubo germinativo em temperaturas mais baixas (19 a 25°C) e entre 28 e 32°C a germinação foi baixa. Para *C. zea-maydis*, o uso de luz constante inibiu a germinação de esporos,

elongação do tubo germinativo e esporulação (BECKMAN & PAYNE, 1983). Essa variação no comportamento em diferentes temperaturas observado para espécies de *Cercospora* e até mesmo entre os isolados pode ser devido à ocorrência de variabilidade genética (SOUZA et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

Como em outros patossistemas, neste trabalho foi observado a influência da interação das variáveis temperatura e intensidade luminosa na esporulação e na germinação de *C. coffeicola*. Nas condições estudadas, a maior esporulação de *C. coffeicola* foi obtida na temperatura de 22°C e na intensidade luminosa de 240 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, atingindo $5,9 \times 10^6$ con.mL⁻¹ e a maior porcentagem de germinação de conídios foi obtida a 17°C e na intensidade luminosa de 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, atingindo 52%. Portanto, as condições ótimas de temperatura e luminosidade variam entre as espécies fúngicas e também entre isolados de uma mesma espécie, sendo preciso conhecer as condições ótimas para o isolado de estudo.

6 REFERÊNCIAS

- ABDOU, Y.A.M.; GREGORY, W.C.; COOPER, W.E. Sources and nature of resistance to *Cercospora arachidicola* Hori and *Cercospora personatum* (Beck and Curtis) Deighton in *Arachis* species. **Peanut Science** 1:169-172, 1974.
- ALDERMAN, S.C. & BEUTE, M.K. Influence of temperature and moisture on germination and germ tube elongation of *Cercospora arachidicola*. **Phytopathology** 76:715-719, 1986.
- BECKMAN, P.M. & PAYNE, G.A. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zea-maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology** 73:286-289, 1983.
- BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopatologica** 32:92-94, 2006.

BUITRAGO JARAMILLO, H.L. & FERNÁNDEZ BORRERO, O. Esporulacion *in vitro* de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke. **Cenicafé** 33: 03-14, 1982.

CALPOUZOS, L. & STALLKNECHT, G.F. Sporulation of *Cercospora beticola* affected by an interaction between light and temperature. **Phytopathology** 55:1370-1371, 1965.

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

CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532p.

CUSTÓDIO, A.A. P.; POZZA, E.A.; GUIMARÃES, S.S.C.; KOSHIKUMO, E.S.M.; HOYOS, J.M. A.; SOUZA, P.E. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1067-1076, 2011.

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

DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. 2nd ed. Lewis Publisher, Boca Raton, 442p. 1995.

DIACHUN, S. & VALLEAU, W.D. Conidial production in culture by *Cercospora nicotianae*. **Phytopathology** 31: 97-98, 1941.

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

GOBINA, S.M. & MELOUK, H.A. Effect of temperature on the sporulation and conidial germination of *Cercospora arachidicola*. (Abstr.) **Phytopathology** 71:876,1981.

HANADA, R.E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, 27:170-173, 2002.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D.L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Environmental Entomology** 5:935-936, 1976.

JENKINS, W.A. Two fungi causing leaf spot of peanut. **Journal of Agricultural Research** 56:317-332, 1938.

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.

KILPATRICK, R.A. & JOHNSON, H.W. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. **Phytopathology** 46:180-181, 1956.

LATTERELL, F.M. & ROSSI, A.E. Structural, cultural, and metabolic variability in *Cercospora zea-maydis*. **Phytopathology** 1:26-27, 1974.

LUKENS, R.J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. **American Journal of Botany**, New York, 50:721-724, 1963.

MATHUR, S.B. & NEERGAARD, P. Seed health testing of rice IV. Effect of light and temperature on seed-borne fungi in the blotter test. **Handbook on Seed Health Testing**, Vollebekk 37:723-730, 1973.

MINUSSI, E.; MACHADO, C.C.; MENTEN, J.O.M.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. **Fitopatologia Brasileira** 2:167-171, 1977.

MORAES, S.A. & SALGADO, C.L. Influência da luz sobre a esporulação de *Cercospora arachidicola* Hori. **Summa Phytopathologica** 4: 128-135, 1978.

NAGEL, C.M. Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology** 24: 1101-1110, 1934.

NAGEL, C.M. & DIETZ, S.M. Sporulation of five species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology** 22: 20 (Abs.). 1932.

OSO, B.A. Conidial germination in *Cercospora arachidicola* Hori. **Transactions of the British Mycological Society** 59:169-172, 1972.

POZZA, E. A.; CARVALHO, L. C.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: Guimarães, R. J.; Mendes, A. N. G.; Baliza, D. P. **Semiologia do cafeeiro**: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas. Lavras, p.68-106, 2010.

QUEIROZ, F.M. & MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora nicotianae*. **Fitopatologia Brasileira** 18: 545-547, 1993.

ROTEM, J.; BICKLE, W.; KRANZ, J. Effect on environment and host on sporulation of *Alternaria macrospora* in cotton. **Phytopathology** 79:263-266. 1989.

SCHUMANN, G. L. & D'ARCY, C. J. **Review of Hungry Planet**: Stories of Plant Diseases Essential Plant Pathology. St. Paul, Minn.: APS Press. 2012.

SMITH, D. H. A simple method for producing *Cercospora arachidicola* conidial inoculum. **Phytopathology** 61:1414, 1971.

SOSA GOMEZ, D.R. Caracterização de isolados de *Beauveria* spp. e determinação das exigências térmicas e hídricas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Piracicaba**: 98p. 1990.

SOUZA, A.G.C.; RODRIGUES, F.A; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. **Journal of Phytopathology** 159:6-11, 2011.

SOUZA, A.G.C.; MAFFIA, L.A; MIZUBUTI, E.S.G. Cultural and Aggressiveness Variability of *Cercospora coffeicola* **Journal of Phytopathology** 160:540-546, 2012.

STAVELY, J.R. & NIMMO, J.A. Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. **Phytopathology** 58: 1372-1376, 1968.

TEIXEIRA, H; CHITARRA, L.G.; ARIAS, S.M.S.; MACHADO, J.C. Efeito de diferentes fontes de luz no crescimento e esporulação *in vitro* de fungos fitopatogênicos. **Ciência Agrotécnica** 25:1314-1320, 2001.

TRIONE, E.J. & LEACH, C.M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology** 59:1077-1083, 1969.

WAGGONER, P.E. **Forecasting Epidemics**. In: Horsfall, J.G & Cowling, E.B. Plant Pathology. Academic Press, NY, San Francisco and London, 3:291-310. 1960.

(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 2 Effect of light and temperature on pathosystem *Cercospora coffeicola* and *Coffee arabica*

Submetido para *Australasian Plant Pathology*

Effect of light and temperature on pathosystem *Cercospora coffeicola* and *Coffee arabica*

M. G. Silva¹, E. A. Pozza^{1*}, F. P. Monteiro¹

¹ Department of Plant Pathology, Lavras Federal University, Lavras, Minas Gerais State, 37200-000, Brazil

*Corresponding author: Marilia Goulart da Silva (mariliagoularts@gmail.com)

Abstract

The mycelial growth rate (MGR), *in vitro* production of cercosporin, and intensity (incidence and severity) of *Cercospora* leaf spot on coffee seedlings Catuaí Vermelho IAC 144 were evaluated under different light intensities (80, 160, 240, and 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and temperatures (17, 21, 25, and 29°C). Dark condition (0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) was also included in *in vitro* experiments. Rates of chlorophyll a, b, and total in both healthy and sick tissues, and the photosynthetic rate and variables affecting it were also evaluated. All the experiments were done at least two times. In *in vitro* experiments, the highest mycelial growth rate (MGR) was observed at 24.1°C in the dark condition (0 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), while the highest amount of toxin occurred at 24.9°C and light intensity 320 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. When dishes were incubated in the dark, the lowest levels of cercosporin were produced by the pathogen, regardless of temperature, thus confirming the importance of light in the activation of toxin production. In *in vivo* experiments, the highest incidence and severity of disease were observed at 21°C. With respect to the amounts of chlorophyll a, b, and total, regardless of treatment, the lowest levels were found in the sick part of the leaf compared to the healthy area. Photosynthesis correlated positively with temperature and negatively with internal carbon. According this study, light and temperature showed be essential for *Cercospora* leaf spot on coffee seedlings, mycelium growth and cercosporin production for *Cercospora coffeicola*.

Keywords Epidemiology, cercosporin, physiologic parameters

Introduction

Cercospora leaf spot caused by the fungus *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke is one of the oldest known and most important coffee diseases. The pathogen infects seedlings from nursery to trees in field production. In the nursery, the disease causes severe defoliation thus reducing growth of seedlings, which become inappropriate for planting and marketing (Pozza et al. 2010). In mature fields, in addition to leaf drop the disease causes premature fall, breaking during pith processing of grains, which reduces production and can also reduce quality of beverage, thus causing depreciation (Lima et al. 2012).

Intensity of symptoms, pathogen infection ability, and plant physiological responses to penetration and colonization are mainly influenced by environmental variables such as temperature, leaf wetness, light, water availability, and soil fertility (Colhoun 1973). Light and temperature are important for affecting chlorophyll thus directly influencing photosynthesis. To the host, light is essential for the first step, a process of producing the biochemical energy required for growth and production of plant species (Taiz and Zieger 2013). However, high light intensities saturate the photosynthetic apparatus causing severe photo inhibition (Nunes et al. 1993) which can be further aggravated by water deficit and temperature extremes (Rena et al. 1994). In turn, temperature has an important role in controlling the speed of chemical reactions which drive plant growth and development (Lehninger et al. 2011).

Light and temperature are capable of inducing or inhibiting vegetative growth and reproductive process of most fungi. In plant pathogens, temperature modulates the production of proteins and enzymes responsible for maintaining fungal cells, and can influence colony growth, sporulation and germination of conidia, as well as the incubation period and progress of disease (Schumann and D 'arcy 2012). In studies of *Cercospora* species, temperatures 25 to 27°C were suitable for production of conidia (Brunelli et al. 2006). Light exerts a direct

effect, inducing or inhibiting the formation of reproductive structures, although some species are indifferent to quantity or quality of light (Hawker 1957). Echandi (1959) reported the relationship between *C. coffeicola* and light intensity, as the genus *Cercospora* produce cercosporin toxin which is activated in the presence of light (Daub et al. 2005), resulting in necrosis of plant cells (Daub and Ehrenshaft 2000); however, the effect was not quantified. According to Echandi (1959), light was important in the occurrence and progression of disease in coffee plants, even before the toxin was discovered (Guzmán et al. 2002), but few quantitative studies have been conducted to date. Like *C. beticola* in sugar beets and *C. coffeicola* in coffee, the toxin does not affect penetration and infection, but influences pathogen colonization after infection (Daub and Chung 2007). This fact justifies more severe cercospora infections in full-sun plantations when compared to shaded plantations.

Besides affecting disease and photosynthesis, light can directly affect cultural characteristics of *C. coffeicola*, since colony color in culture varies depending on lighting conditions. In the dark, colonies vary from greenish-black during early growth and milky-white to brown at the end (Martins et al. 2008). In the presence of light toxin production may occur as a red pigment, and hence mycelium color ranges from light to intense red, depending on the ability of the isolate to produce pigment. Even brief exposure to light can stimulate pigment production (Daub et al. 2005).

Knowledge of environmental conditions needed for mycelium growth and for disease progress is a key step to understanding the epidemiology and control of plant diseases. Thus, the influence of different light intensities and temperatures on mycelium growth, *in vitro* production of cercosporin, incidence and severity of disease, disease progress, chlorophyll content, and physiological variables were evaluated in coffee seedlings.

Material and Methods

Coffee leaves infected with the pathogen, collected in Lavras, state of Minas Gerais, were previously tested for pathogenicity. The most virulent isolate was chosen for these experiments. Each experiment that is described below was performed twice (two trials).

Effects of light intensity and temperature on mycelium growth of *C. coffeicola*

The mycelium growth of the isolate chosen was evaluated in different conditions of light and temperature. Plugs with malt medium and mycelium 0.5 cm diameter were removed from the edge of colonies. Then one plug was placed at the center of Petri dishes (9 cm) with malt, which were incubated in their respective treatments. Factor 1 was light intensities 0, 80, 160, 240, and 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and factor 2 the temperatures 17, 21, 25, and 29°C, totaling 20 treatments. A randomized block design was used with six replicates, each consisting of a Petri dish. A stepped structure with 400 Watts metal lamps was used for light intensity, which varied with distance of seedlings from lamps. Evaluation was made at two-day intervals by measuring colony diameter in both orthogonal growth directions, then the average was calculated, totaling seven evaluations. Then, the mycelial growth rate (MGR) was calculated according to Maguire (1962).

***In vitro* production of cercosporin**

After assessing mycelial growth, toxin cercosporin was extracted from each experiment in each treatment. After 14 days of incubation, three plugs 0.5 cm diameter with mycelium growth were removed from the edge of dishes, which were immersed in 8 ml KOH 5N for four hours at 25°C in the dark for extracting cercosporin (Jenns et al. 1989). Then, absorbance was measured using

a spectrophotometer. Toxin concentration in the extract was estimated by using the molar extinction coefficient of 23 300 to A_{480} nm readings (Jenns et al. 1989) in each treatment.

Seedling inoculation and assessment of intensity disease

For obtaining conidia of *C. coffeicola*, 12 plugs of mycelium 0.5 cm diameter were removed from the edges of colonies in Petri dishes and transferred to 30 ml tomato juice medium (STT) in 125 ml Erlenmeyer flasks. Medium was composed of 200 ml Super Bom[®] tomato juice, 3.2 g CaCO_3 and 800 ml distilled water. The flasks with medium and fungus were kept under continuous stirring at 120 rpm at 25°C approximately. After four days, the content of each flask was poured in solid tomato juice, in the previous medium (STT) plus 16 g agar per liter of medium, in two Petri dishes, which were kept open in BOD chamber at 25°C under continuous light. When the medium dehydrated after two days, 5 ml distilled water was added to each plate, which was then lightly scraped with a glass rod. Next, the suspension was filtered through a layer of sterile gauze. The concentration of conidia was estimated using a hemacytometer, based on the average of readings in both slide fields. This procedure was repeated two times, totaling four readings. Based on these readings, the inoculum suspension was calibrated to 2×10^4 conidia.mL⁻¹ after dilution in water.

Using this suspension, the experiments were performed by spraying to run off on all leaves in seedlings of Catuaí Vermelho IAC 144 with four to five pairs of leaves, grown in standard substrate (700 liters of soil and 300 liters of manure per cubic meter of mixture) plus 1kg P_2O_5 (5 kg superphosphate) and 0.3 kg K_2O (0.5 kg potassium chloride). Then, all leaves were inoculated with the suspension in randomized block design with three replicates, each consisting of two plants, in factorial analysis of variance (4x4). Factor 1 was light intensities

80, 160, 240, and 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and factor 2 the temperatures 17, 21, 25, and 29°C, totaling 16 treatments. After inoculation, seedlings were subjected to the conditions mentioned and incubated in humid chamber above 90% relative humidity for 72 hours in a controlled environment. After incubation period, the incidence and severity of disease were assessed at five-day intervals, totaling five evaluations in each trial.

Incidence was determined by counting number of sick leaves in relation to total inoculated leaves. Severity (percentage of sick leaf area) was measured in all leaves with incidence, according to the scale by Custódio et al. (2011), with the intervals of 0.1-3.0; 3.1-6.0; 6.1-12.0; 12.1-18.0; 18.1- 30.0; 30.1-49.0% of diseased leaf area. A graph for disease progress over time was plotted for both incidence and severity. To compare the treatments, the area under the disease progress curve for incidence (AUDPCI) and severity (AUDPCS) was calculated according to Shanner and Finey (1977). Analysis of variance was performed on the results.

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} (y_i + y_{i+1}/2) (t_{i+1} - t_i)$$

Wherein:

y: intensity of disease in the "i"-th observation;

t: time in days on the "i"-th observation;

n: number of evaluations over time.

Evaluation of chlorophyll

Fresh leaf tissue of coffee seedlings in different shades of green chlorophyll, were measured for chlorophyll content for calibration purposes by a portable SPAD-502®. After reading, 0.2 g of plant tissue was weighed, macerated in liquid nitrogen, and transferred to tubes containing 10 ml 80% acetone (v/v), remaining for 24 hours in a cold room, protected from light. After

24 hours, the extracts were filtered and read in spectrophotometer at wavelengths 663 and 645 nm for chlorophyll a and b, respectively. Measurements of chlorophyll (mg.gMF^{-1}) were made according to Whithan et al. (1971).

After the calibration curve was made, symptomatic leaves were marked in all treatments to monitor chlorophyll readings with the progress of disease. A factorial analysis of variance ($4 \times 4 \times 2$) was used, where factor 1 was light intensities, factor 2 was temperatures and factor 3 was leaf section (healthy/sick), totaling 32 treatments. Readings were made with portable SPAD-502[®] to evaluate the incidence and severity of disease. Ten readings were performed per leaf, five in healthy areas (no symptoms) and five in sick areas (with symptoms). Based on the results, the levels of chlorophyll a, b, and total were determined in each experiment and each treatment over time.

Gas exchange

At the end of the experiment, net photosynthetic rate (A), intercellular CO_2 concentration (C_i), stomatal conductance (Cond), transpiration (Tr), and leaf temperature (T_{leaf}) were evaluated in sick and healthy leaves, using a portable infrared gas analyzer (IRGA-ADC-LCA4[®]). Carboxylation efficiency was obtained by A/ C_i relationship. These variables were measured in the two trials. Then these data were correlated with temperature and light.

Statistical analysis of the experiments

Data were subjected to Levene's test to assess homogeneity and variance of residuals. As data met the assumptions of analysis of variance, F test was performed for variables at 5% probability in SAS[®] software. In the case of significant variables, linear regression models were fit to the quantitative variables. For estimating chlorophyll in healthy and sick leaves, the F test of

analysis of variance was used to discriminate treatments. The gas exchange data were correlated with temperature, light, and incidence of disease. Adjusted models were plotted in Sigma Plot[®], and response surface graphs in R.

Results

The combined analysis of both trials in both experiments (*in vitro* and *in vivo*) were not significant, so far as the results refer to their respective averages

Mycelial growth and cercosporin production

A significant interaction was found between light intensity and temperature for mycelial growth rate (MGR) and cercosporin production. At the lowest temperature, 17°C, MGR ranged from 1.19 to 1.54, reducing from dark to the highest light intensity. This pattern in relation to light kept the same at all temperatures, and MGR kept reducing up to 21°C. From this temperature, MGR increased up to 24.1°C at all light intensities and then kept drastically reducing up to 29°C, where the lowest MGR values were found (Fig. 1). The highest MGR, 1.67 ($r = 0.88$), occurred at 24.1°C and in the dark ($0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

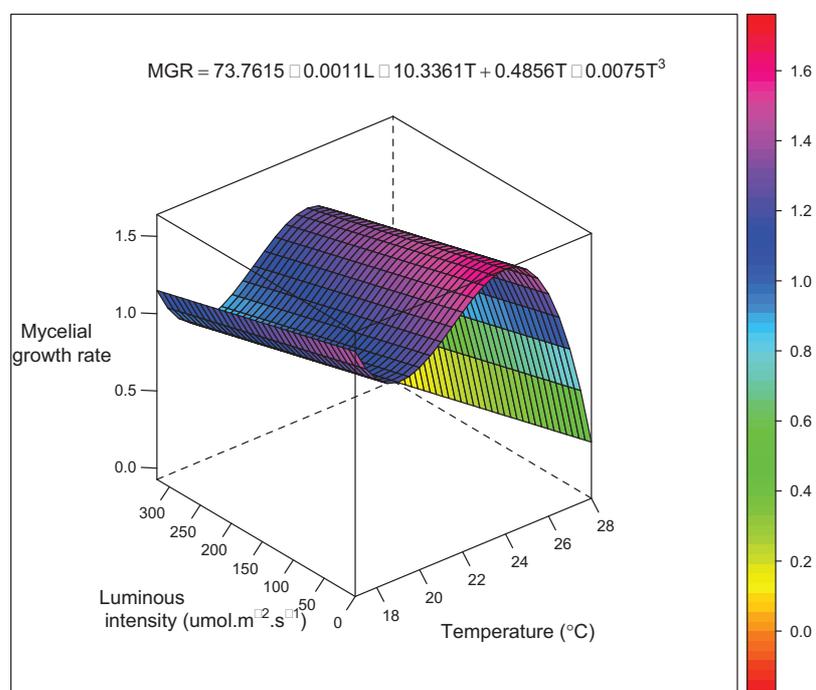


Fig. 1 Mycelial growth rate (MGR) versus temperature (T) and light intensity (IL)

The highest cercosporin production, $1.43 \mu\text{mol.L}^{-1}$ was found at 24.9°C ($r = 0.83$) and $320 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. At temperatures below and above this value cercosporin production decreased at all light intensities with a slight increase at 17°C , but always below 24.9°C (Fig. 2). At all temperatures toxin production increased with the highest light intensity while the lowest was found in the dark ($0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), contrary to MGR behavior.

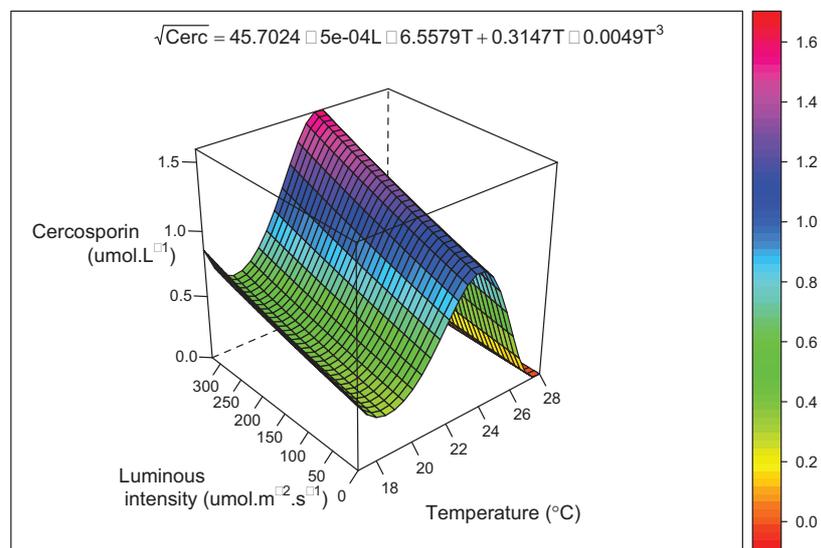


Fig. 2 Cercosporin ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) versus temperature (T) and light intensity (IL)

Progress curves of *Cercospora* leaf spot in coffee seedlings

The first symptoms of disease appeared 22 days after inoculation, and from this date the rate of progress leading to the exponential phase of disease occurred. The progress curve of incidence varied according to light intensity versus temperature. The highest progress of disease was found at 21 $^{\circ}\text{C}$, reaching 31.2% incidence at light intensity 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and 12.7% incidence at light intensity 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. At temperatures 17, 25, and 29 $^{\circ}\text{C}$ the highest progress occurred at intensity 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ followed by 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 3).

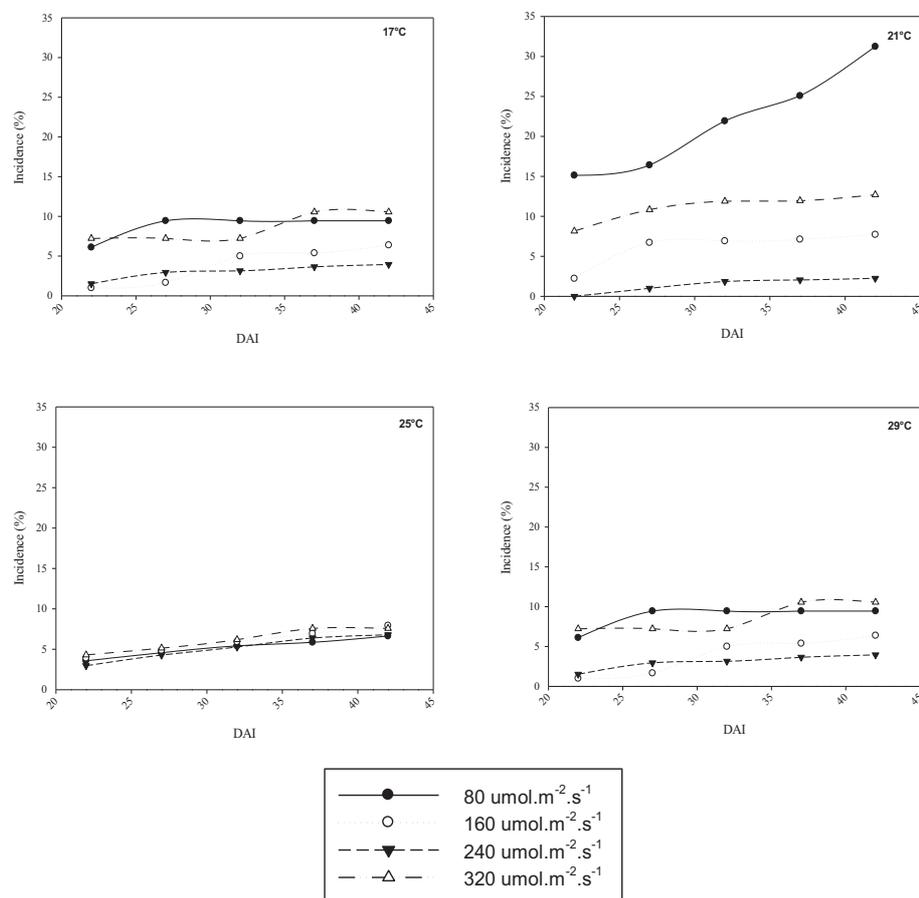


Fig. 3 Progress curves of *Cercospora* leaf spot incidence at different temperatures

With respect to the disease severity, the behavior was similar to that of incidence. The highest progress rates occurred at 21°C, at intensity 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (9.9%) followed by 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (9.7%). At temperatures 17, 25, and 29°C the highest rate occurred at intensity 320 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ followed by 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Fig. 4).

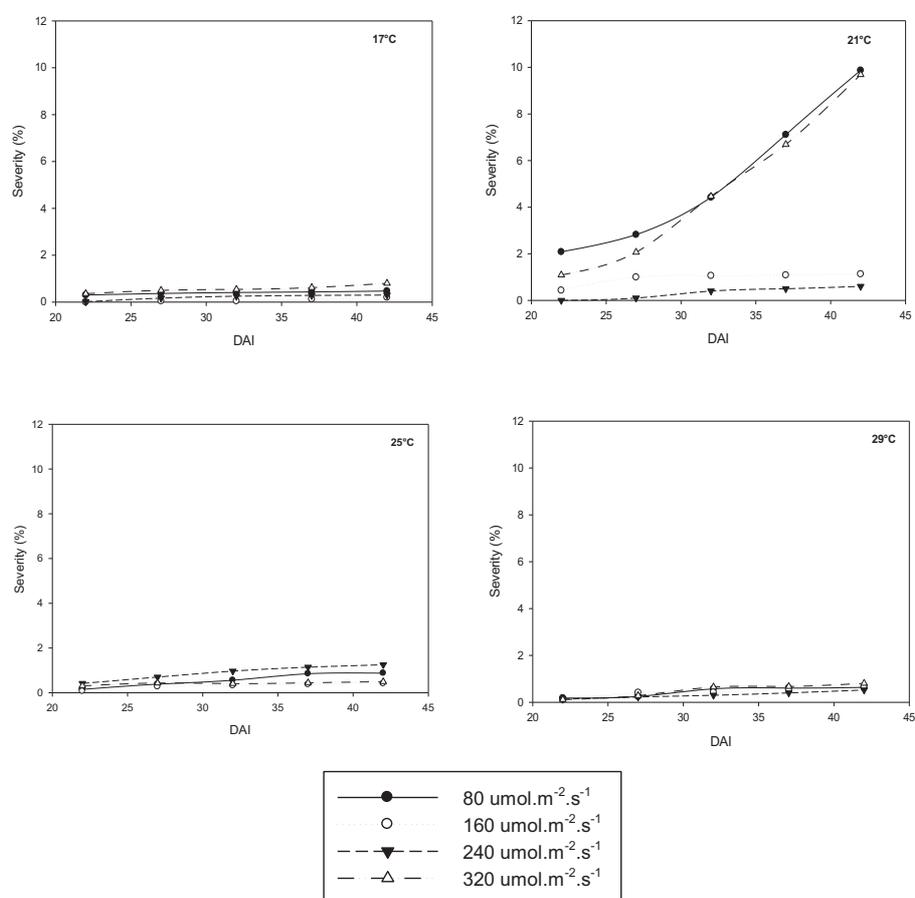


Fig. 4 Progress curves of severity of disease at different temperatures

Area under the disease progress curve (AUDPC)

Results of area under the disease progress curve for incidence (AUDPCI) and severity (AUDPCS) were not significant according to F test.

Analysis of chlorophyll a, b, and total

According to F test, the variables of light, temperature and leaf section (sick/healthy) were individually significant for chlorophyll a, b, and total, but there was no interaction between them. The amount of chlorophyll in sick tissues was always lower in the healthy side. Regarding temperature, the smaller quantities of chlorophyll a, b, and total were found at 24, 22.6, and 20.3°C, respectively, with the highest production always occurring at 17°C (Fig. 5).

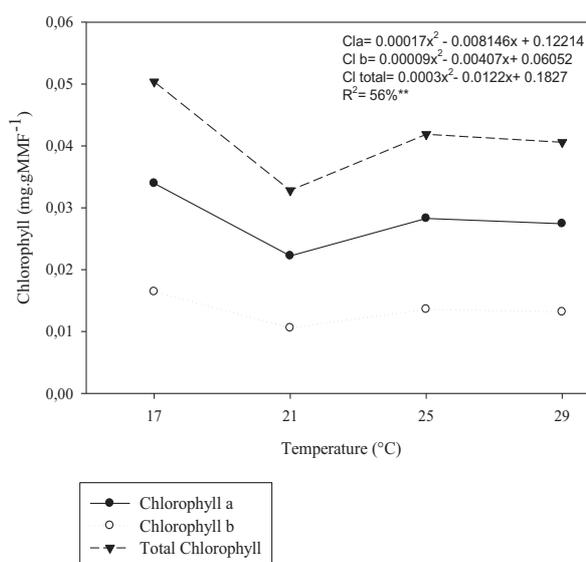


Fig. 5 Behavior of chlorophyll a, b, and total according to temperature

With respect to light intensity, the highest amounts of chlorophyll a, b, and total were found at 217, 133, and 290 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively, while the lowest occurred at 320 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 6).

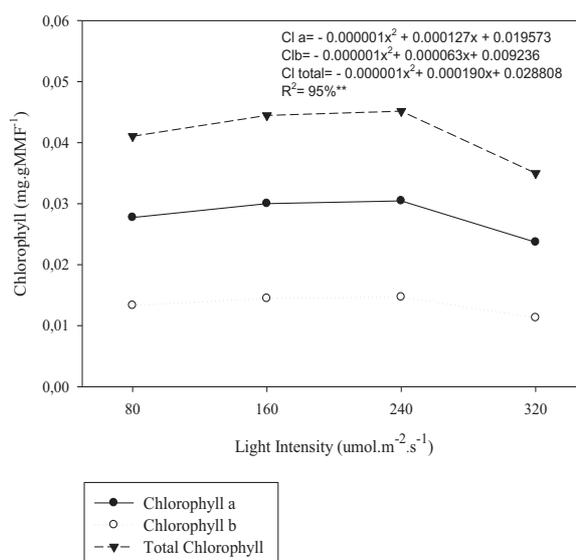


Fig. 6 Behavior of chlorophyll a, b and total according to light intensity

Correlation between physiological variables and temperature and light intensity

Significant negative correlations were found between temperature ($^{\circ}\text{C}$) and internal carbon (C_i), and positive relationship between temperature and leaf temperature (T_{leaf}). Photosynthesis was negatively correlated with C_i and positively with T_{leaf} . There was positive correlation between stomatal conductance ($Cond$) and transpiration (Tr). These results were found in both sick and healthy leaves (Table 1).

Table 1 Correlation between physiological variables and temperature and light intensity for healthy and sick leaves

Variables - Healthy Leaves			
	¹ Ci	Tr	Tleaf
Temp (°C)	-0.63*	0.27 ns	0.90*
Light intensity	-0.16 ns	-0.39 ns	-0.14 ns
Photosynthesis	-0.87*	0.35 ns	0.77*
Cond	0.03 ns	0.95*	-0.06 ns
Variables - Sick Leaves			
	Ci	Tr	Tleaf
Temp (°C)	-0.66*	0.27 ns	0.56*
Light intensity	-0.11ns	-0.37 ns	-0.35 ns
Photosynthesis	-0.76*	0.21 ns	0.52*
Cond	0.10 ns	0.87*	-0.31 ns

Ns= not significant * significant 0.05 ** significant 0.01%

¹Ci= internal carbon. Tr= transpiration. Tleaf= leaf temperature. Cond=stomatal conductance.

Discussion

In this study the highest mycelial growth rate (MGR) and highest cercosporin production were found at close temperatures, 24.1°C in the dark and 24.9°C at the highest light intensity, respectively. Although fungi had grown in the dark, there was low cercosporin production under these conditions probably because the fungal genes responsible for toxin production were not activated in the dark. Thus, as fungi used no energy for toxin production, this energy may have been used in their own growth. Echandi (1959) also found increased

mycelial growth of three isolates of *C. coffeicola* at 24°C and a reduced fungal growth at 30°C, results close to those reported in the present study, however, the author did not evaluate the relationship between temperature and light intensity. Souza (2007) studied different isolates of *C. coffeicola* and found higher growth at 26°C than at 18 or 22°C, but the study neither evaluated temperature 24°C nor adjusted regression equations. Other species of *Cercospora* had the following optimum growth temperatures: 27°C for *C. beticola* and *C. apii* (Groenewald et al. 2005); 20 to 25°C for *C. carotae* (Carisse et al. 1993); and 25 to 28°C for *C. piaropi* (Ávila and Pitelli 2004). Thus, the optimal temperature for mycelial growth differs between species.

The highest amount of cercosporin was found at 24.9°C and light intensity 320 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, followed by 240, 160, 80, and 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, contrary to the results for mycelial growth rate (MGR). This confirms the crucial role of both light and interaction between temperature and light in toxin production and activity (Jenks et al. 1989), which increase pathogen aggressiveness (Steinkamp et al. 1981). In *C. asparagine*, *C. beticola* and *C. kikuchii* the highest toxin production occurred at 20 to 30°C (Jenks et al. 1989). *In vitro* production of cercosporin varies among species and isolates (Jenks et al. 1989). In the presence of light, cercosporin is toxic to organisms such as plants, bacteria, fungi, and rats (Fajola 1978). Only species of *Cercospora* and other fungi producing toxin with activity similar to cercosporin resist to its oxidizing action (Daub and Chung 2007). Few known exceptions, such as *Xanthomonas campestris* pv. *Zinnia* can detoxify cercosporin (Taylor et al. 2006).

The incidence and severity of the disease in *in vivo* experiments were higher at 21°C at the extremes of light intensity, 80 and 320 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. In a study to assess the effect of different temperatures on the severity of disease in coffee seedlings, Souza (2007) found that severity was higher at 22°C, close to the temperature reported herein; however, the study did not describe temperature

interaction with light. The light extreme $320 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ was optimal for *in vitro* production of cercosporin, thus it could be related to pathogen aggressiveness at 22°C . This light intensity fits the range required for proper growth and development of coffee plant C3 in shaded area. This plant is morphologically and physiologically adapted to this environment, with low saturation irradiance ranging $300\text{-}600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Kumar and Tieszen 1980).

Cercospora leaf spot causes physiological disorder in plants, such as leaf yellowing, reduction in photosynthetic area, and leaf drop. One cause of leaf yellowing is the reduction in leaf chlorophyll content. According to the results, it was found that regardless of temperature and light intensity the levels of chlorophylls a, b, and total were consistently lower in the area infected than in the healthy leaf side. This was due to destruction of chlorophyll or chloroplasts in the yellowish halo in gray leaf spot lesions (Rezende et al. 2011). It was also found that, regardless of temperature, from the intensity $160 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ the decrease in amounts of chlorophyll was accentuated. This was probably because from that light intensity the infectious process is favored, which affect chlorophyll content and consequently the photosynthetic area. Studies conducted by Benedict (1971) reported improved penetration of *Septoria tritici* in wheat leaves at light intensity $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 23°C , approximately 50% of the intensity responsible for the increased intensity (severity) of cercospora leaf spot found in the present study.

According to the results, positive correlation between temperature and photosynthesis and negative correlation between internal carbon and photosynthesis imply that Rubisco was probably functional, as internal carbon was being consumed to perform photosynthesis which had been facilitated by increased temperature. Positive correlation between stomatal conductance and transpiration is justified, as transpiration also occurs through open stomata.

In this study, both light intensity and temperature influenced plant physiology, directly affecting photosynthesis (Taiz and Zeiger 2013). Light intensity and temperature levels, as well as water and nutrients are important factors in photosynthetic activity in coffee plants. Furthermore, quality and intensity of light can affect physiological responses of pathogens, such as conidia production, pigmentation, sexual development (Purschwitz et al. 2006), germination, formation of resistance structures, and size and shape of conidia (Minussi et al. 1977). Temperature influences the occurrence and progress of diseases (Agrios 2005) and also affects pathogen sporulation, lesion expansion, incidence and severity of fungal diseases (Carisse et al. 1993; Paul and Munkvold 2005).

Certainly more studies of abiotic factors and their interference in plant physiology should be performed with the pathosystem *C. coffeicola* versus coffee plant due to the importance of coffee culture and the potential ability of the pathogen to cause epidemics in cultivated fields, leading to production losses.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge the financial support and scholarships provided by CNPq, Capes, Fapemig and INCT- Café for their financial support and scholarship.

References

Agrios, G.N. Plant Pathology, 5th edn. Burlington, MA, USA, Elsevier, 2005.

Ávila ZR, Pitelli RA. (2004) Efeito de condições de cultivo sobre a produção e virulência de *Cercospora piaropi*. Summa Phytopathologica 30:283-288

Benedict WG. (1971) Differential effect of light intensity on the infection of wheat by *Septoria tritici* Desm. under controlled environmental conditions. Physiological Plant Pathology 1: 55-66

Brunelli KR, Fazza AC, Sobrinho CA, Camargo LEA. (2006) Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zae-maydis*. Summa Phytopathologica 32:92-94

Carisse O, Kushalappa AC, Cloutier DC. (1993) Influence of temperature, leaf wetness, and high relative humidity duration on sporulation of *Cercospora carotae* on carrot leaves. Phytopathology 83:338-343

Colhoun, J. 1973. Effects of environmental factors on plant disease. Annual Review of Phytopathology 11:343-364

Custódio AAP, Pozza EA, Guimarães SSC, Koshikumo ESM, Hoyos JMA, Souza PE. (2011) Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. Ciência e Agrotecnologia 35:1067-1076

Daub ME, Chung KR. (2007) Cercosporin: a photoactivated toxin in plant disease. Online. APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature/2007-0207

Daub ME, Ehrenshaft M. (2000) The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. Annual Review of Phytopathology 38:461-490

Daub ME, Herrero S, Chung K. (2005) Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. FEMS Microbiology Letters, London 252:197-206

Echandi E. (1959) La chasparria de los cafetos causada por El hongo *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. Turrialba, San José 9:54-67

Fajola AO. (1978) Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. Physiological Plant Pathology 13:157-164

Groenewald, M.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W. 2005. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotype. Phytopathology 95:951-959.

Gusmán R, Gonzalo H, Caycedo L, Eduardo J, Herrera R, Miguel N. (2002) Algunos aspectos biológicos de *Cercospora coffeicola*. Cenicafé 53:169-177

Hawker LE. (1957) The physiology of reproduction in fungi. Cambridge, MA, Cambridge University Press

- Jenns AE, Daub ME, Upchurch RG. (1989) Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79:213-219
- Kumar D, Tieszen LL. (1980) Photosynthesis in *Coffea arabica*. I. Effects of light and temperature. *Experimental Agriculture*, 16:13-19
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. (2011) *Princípios de bioquímica*. 5ª edição, São Paulo, BR, Sarvier
- Lima LM, Pozza EA, Santos FS. (2012) Relationship between Incidence of Brown Eye Spot of Coffee Cherries and the Chemical Composition of Coffee Beans. *Journal of Phytopathology* 160:209-211
- Maguire JD. (1962) Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2:176-177
- Martins RB, Maffia LA, Mizubuti ESG. (2008) Genetic Variability of *Cercospora coffeicola* from Organic and Conventional Coffee Plantings, Characterized by Vegetative Compatibility. *Phytopathology* 98: 1205-1211
- Minussi E, Machado CC, Menten JOM, Castro C, Kimati H. (1977) Efeitos de diferentes regimes de luz na esporulação de *Stemphylium solani* Weber em meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira* 2:167-171
- Nunes MA, Ramalho JDC, DIAS MA. (1993) Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. *Journal of Experimental Botany* 44:893-899
- Paul PA, Munkvold GP. (2005) 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
- Pozza EA, Carvalho LC, Chalfoun SM. (2010) Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: Guimarães RJ, Mendes ANG, Baliza DP. (eds) *Semiologia do cafeeiro: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas*. Lavras, MG, BR, Editora UFLA, pp 68-106.
- Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Fischer R. (2006) Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology* 9:566-571

Rena AB, Barros RS, Maestri M, Sondahl M R. (1994) Coffee. In: Schaffer B, Andersen PC (eds) Handbook of environmental physiology of fruit crops - subtropical and tropical crops. Boca Raton, FL, USA, CRC Press pp:101-122.

Rezende JAM, Massola Jr NS, Bedendo I, Krugner TL (2011) Controle de doença, sintomatologia e diagnose. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A. (eds) Manual de Fitopatologia Volume 1 - Princípios e Conceitos 4ª Edição, São Paulo, SP, BR, Agronômica Ceres.

Shaner G, Finney RE. (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow- mildew resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056

Schumann GL, D'arcy CJ. (2012) Review of Hungry Planet: Stories of Plant Diseases Essential plant pathology. St. Paul, MN, USA, APS Press.

Steinkamp MP, Martin SS, Hoefert LL, Ruppel EG. (1981) Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by cercosporin, a toxin from *Cercospora beticola*. *Phytopathology* 71:1272-1281

Souza AGC. (2007) Variabilidade fisiológica de isolados de *Cercospora coffeicola*. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, Ms Thesis.

Taiz L, Zeiger E (2013) Plant Physiology. Porto Alegre, RS, BR, Artmed.

Taylor TV, Mitchell TK, Daub ME. (2006) An oxidoreductase is involved in cercosporin degradation by the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*. *Applied and Environmental Microbiology* 72:6070-6078

Withan FH, Blaydes DF, Devlin RM. (1971) Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Co., New York, p. 55-58

(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 3 Interação da temperatura com o período de molhamento foliar na cercosporiose do cafeeiro

Redigido conforme as normas para submissão na revista *Coffee Science*.

RESUMO: Variáveis ambientais como temperatura e molhamento foliar podem interferir diretamente em patógenos e em hospedeiros. Objetivou-se com este estudo avaliar a intensidade da cercosporiose do cafeeiro em mudas da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144 submetidas a diferentes horas de molhamento foliar (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas) e temperaturas (17, 21, 25 e 29°C), bem como o efeito do patógeno nos tecidos vegetais. Avaliou-se a incidência e a severidade da doença, as taxas das clorofilas a, b e total, em tecidos doentes e sadios, a taxa fotossintética e variáveis relacionadas. O maior progresso da doença tanto para incidência quanto para severidade, foi observado na temperatura de 25°C, a 72 horas de molhamento foliar. Observou-se interação significativa entre temperatura e horas de molhamento foliar para incidência e para a severidade da doença, sendo a maior incidência e severidade observadas na temperatura de 25°C e 48 horas de molhamento foliar. Tanto a AACPD I quanto a AACPD S foram significativas apenas para a variável horas de molhamento foliar. Com relação as taxas de clorofilas a, b e total, independente do tratamento, as menores taxas foram observadas na área doente das folhas em relação a sadia. A fotossíntese correlacionou-se negativamente com o carbono interno.

Termos para indexação: *Cercospora coffeicola*, epidemiologia, variáveis ambientais.

INTERACTION BETWEEN TEMPERATURE AND LEAF WETNESS PERIOD IN CERCOSPORA LEAF SPOT IN COFFEE PLANTS

ABSTRACT: *Environmental variables such as temperature and leaf wetness can directly interfere in pathogens and hosts. The aim of this study was to evaluate the intensity of Cercospora leaf spot of coffee seedlings of the cultivar IAC 144 Catuaí under different hours of leaf wetness (0, 6, 12, 24, 48 and 72 hours) and temperatures (17, 21, 25 and 29°C), as well as the effect of the pathogen on the plant tissues. Was evaluated the incidence and the severity of the disease, the rates of chlorophyll a, b and total in healthy and diseased tissues, photosynthetic rate and related variables. The greatest progress of both the disease incidence and severity in was observed at 25°C and 72 hours wetness. A significant interaction between temperature and hours of leaf wetness for the incidence and severity of the disease, with an increased incidence and severity observed at 25°C and 48 hours of leaf wetness. Both area under the disease progress curve of incidence (AUDPCI) as area under the disease progress curve of severity (AUDPCS) were significant only for the variable hours of leaf wetness. Regarding the rates of chlorophyll a, b and total, regardless of the treatment, the lowest rates were observed in the diseased area of leaves in relation to sound. Photosynthesis was negatively correlated with the internal carbon.*

Index terms: *Cercospora coffeicola, epidemiology, environmental variables.*

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças é um grave problema nas lavouras cafeeiras, pois estas ocorrerem desde a fase de viveiro até a produção final, devido mais de 90% da área plantada no Brasil ser de cultivares suscetíveis às principais doenças da cultura (POZZA et al., 2010). Entre as doenças presentes na cafeicultura está a cercosporiose, cujo agente etiológico é o fungo hemibiotrófico *Cercospora coffeicola* Berk. & Cooke. A doença é favorecida por variáveis ambientais como temperatura, molhamento foliar, intensidade luminosa e desequilíbrios nutricionais (GARCIA JÚNIOR et al., 2003), principalmente em solos ou regiões onde o clima é desfavorável para o cultivo da cultura e também por busca de maior produtividade sem o emprego de tecnologias apropriadas, gerando significativas perdas.

A cercosporiose pode infectar tanto folhas quanto frutos, levando à perdas de produção. No viveiro, a doença causa intensa desfolha, reduzindo o crescimento das mudas, tornando-as impróprias à comercialização e ao plantio (POZZA et al., 2010). Em lavouras adultas, além da queda de folhas, a cercosporiose provoca queda prematura, quebra e chochamento dos grãos, reduzindo a produtividade. Além disso, afeta também a qualidade da bebida, depreciando-a, devido a queda na quantidade de açúcares totais, pH e aumento na lixiviação de K, devido ao rompimento de membranas (LIMA et al., 2012).

A intensidade dos sintomas da doença, a capacidade de infecção do patógeno e as respostas fisiológicas da planta à penetração e colonização, são influenciadas principalmente por variáveis ambientais como molhamento foliar, temperatura, luminosidade, disponibilidade de água e fertilidade do solo. O período de molhamento foliar é um fator do ambiente considerado indispensável para a germinação da maioria dos fungos, além de influenciar a penetração do tubo germinativo, pode também aumentar a suscetibilidade a certos patógenos, afetando a incidência e a severidade da doença (WAGGONER, 1960). A

quantidade e a duração do período de molhamento foliar, é essencial no surgimento e também no progresso dos sintomas de doenças causadas pela maioria dos fitopatógenos (SILVA et al., 2001).

Por outro lado, a temperatura é fator primordial à ocorrência e progresso de doenças (WAGGONER, 1960) e para as de etiologia fúngica, afeta a esporulação do patógeno, bem como a expansão da lesão, a incidência e a severidade da doença (CARISSE et al., 1993; PAUL & MUNKVOLD, 2005). Canova (1959) estudando *C. beticola* e o efeito da temperatura no período de incubação, observou relação entre tais variáveis, sendo de 19 a 21 dias à 15°C, de 9 a 10 dias à 25°C, de 7 a 8 dias o período de incubação à 30°C e a 35°C não ocorreu infecção do patógeno. Também para *C. beticola*, houve relação próxima entre a temperatura ideal para a infecção (25°C), o crescimento micelial, a esporulação e a germinação de conídios em meio de cultura (27°C) (GROENEWALD et al., 2005). Cooperman & Jenkins (1986) observaram relação entre as temperaturas mais favoráveis ao crescimento de *C. asparagi*, em aipo, às melhores condições para o processo infectivo pelo patógeno.

Os efeitos da temperatura e do molhamento foliar em processos de infecção de *C. arachidicola* foram estudados. Oso (1972) e Alderman & Beute (1986) relataram a necessidade de atmosfera saturada ou próxima a saturada e temperatura ótima entre 16 a 25°C para a germinação dos conídios. A alongação dos tubos germinativos quando em umidade de 94,5%, foram capazes de resistir a intermitentes períodos de seca e retomar a alongação quando a umidade tornou-se disponível novamente (ALDERMAN & BEUTE, 1986). Este resultado concorda com a hipótese da infecção ocorrer após a acumulação de interruptos períodos de molhamento ao longo do tempo. Com relação à incidência da doença, esta foi maior na temperatura de 22,8°C para três cultivares de amendoim testado, porém, menos horas de molhamento foram

necessários para atingir específica intensidade da doença quando a temperatura aproximou-se da ideal (LIJUN et al., 1999).

Anco et al. (2013), estudando o efeito da temperatura e do molhamento foliar na taxa de esporulação de *Phomopsis viticola*, observou esporulação ótima em temperaturas próximas a 21°C e quando a duração do molhamento foliar foi superior à 11 horas, observou-se claramente aumento da esporulação com o aumento da duração do molhamento foliar, sendo o máximo observado à 71 horas de molhamento, maior duração testada.

As variáveis temperatura e molhamento foliar além de afetar a intensidade da doença, podem também afetar as variáveis fisiológicas das plantas. A temperatura desempenha importante função no controle da velocidade das reações químicas celulares, as quais direcionam o crescimento e o desenvolvimento das plantas (LEHNINGER et al., 2011). Já a deficiência de água, seja por molhamento foliar, orvalho ou água livre, limita a fotossíntese por restringir a difusão de CO₂ do ambiente externo para o sítio de carboxilação nos cloroplastos (LAWLOR & CORNIC, 2002; CHAVES et al., 2003). Na maioria dos casos, os estômatos fecham-se em resposta à ausência de água antes de qualquer mudança no potencial hídrico ou no conteúdo de água da folha ocorrer (SOCIAS et al., 1997).

Para o melhor entendimento da epidemiologia da cercosporiose do cafeeiro, o estudo da interação entre as variáveis temperatura e molhamento foliar foi realizado, visando esclarecer seu efeito na intensidade da doença e em variáveis fisiológicas do cafeeiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação das mudas

Isolados de *C. coffeicola* foram previamente testados quanto a patogenicidade e destes, escolheu-se o isolado de trabalho, o qual foi inoculado em placas de Petri com meio malte por 14 dias. Retirou-se 12 discos de micélio com 0,5 cm de diâmetro da extremidade da colônia, os quais foram transferidos para 30 mL de meio de suco de tomate temperado líquido (STT) em Erlenmeyer de 125 mL. O STT foi composto por 200 mL de suco de tomate ‘Super Bom[®]’, 3,2 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada. Os Erlenmeyers com o STT e o fungo permaneceram sob agitação contínua a 120 rpm, a 25°C aproximadamente. Após quatro dias, verteu-se o conteúdo de cada Erlenmeyer em STT sólido, meio anterior acrescido de 16 g de ágar por litro de meio, em duas placas de Petri, as quais permaneceram abertas em câmara de crescimento do tipo BOD a 25°C sob luz contínua. Quando o meio desidratou, dois dias após, adicionou-se 5 mL de água destilada em cada placa, as quais foram raspadas superficialmente com um bastão de vidro e a suspensão foi filtrada em uma camada de gaze esterilizada.

Em microscópio óptico, com auxílio de hemacitômetro, estimou-se a concentração de conídios no filtrado, pela média das leituras nos dois campos de contagem da lâmina. Esse procedimento foi realizado duas vezes, totalizando quatro leituras. A partir dessas leituras, com a diluição em água, calibrou-se suspensão de inóculo para $3,75 \times 10^4$ conídios. mL⁻¹. Mudas com quatro a cinco pares de folhas verdadeiras da cultivar suscetível, Catuaí Vermelho IAC 144, cultivadas em substrato padrão (700 litros de solo e 300 litros de esterco de curral por metro cúbico de mistura, sendo adicionados 1,0 kg de P₂O₅ (5 kg de superfosfato simples) e 0,3 kg de K₂O (0,5 kg de cloreto de potássio), foram inoculadas nas duas faces da folha com a suspensão. Após a pulverização da suspensão de conídios, as mudas foram submetidas imediatamente aos

respectivos tratamentos em câmaras de crescimento. Os experimentos foram realizados duas vezes.

Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o em blocos casualizados, com três repetições, cada uma com duas plantas, no esquema de análise de variância fatorial (4x4), sendo o fator 1, as horas de molhamento 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas e o fator 2 as temperaturas de 17, 21, 25 e 29°C, totalizando 24 tratamentos. Os experimentos foram conduzidos em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 horas.

Avaliação do progresso e da intensidade da doença

Quando os primeiros sintomas foram observados, iniciou-se a avaliação da doença, sendo realizada em intervalo de cinco dias. A incidência da doença foi determinada contando-se o número de folhas doentes em relação ao total de folhas da planta. A severidade ou a porcentagem da área foliar lesionada foi avaliada, em todas as folhas com incidência, de acordo com a escala de Custódio et al., (2011), com os intervalos de 0.1-3.0; 3.1-6.0; 6.1-12.0; 12.1-18.0; 18.1-30.0; 30.1-49.0% de área foliar doente.

As curvas de progresso da doença ao longo do tempo tanto para incidência quanto para a severidade da doença foram plotados no programa Sigma Plot® com os dados observados. Para comparar os tratamentos calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença para a incidência (AACPI) e para a severidade (AACPS), segundo Shanner & Finey (1977) e, em seguida, com os resultados, procedeu-se à análise de variância.

Avaliação das clorofilas

Para determinar o conteúdo de clorofila, amostras de tecido foliar fresco de mudas de café em diferentes tonalidades de verde tiveram as leituras de clorofila mensuradas por aparelho portátil SPAD-502[®], com o objetivo inicial de calibrá-lo. Após a leitura, 0,2 g de tecido vegetal foram pesados, macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubos contendo 10 mL de acetona 80% (v/v), onde permaneceram por 24 horas em câmara fria, protegidas da luz. Decorridas 24 horas, os extratos foram filtrados e a leitura efetuada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 663 e 645nm para clorofilas a e b, respectivamente. As determinações das clorofilas (mg.gMF^{-1}), foram feitas de acordo com Whithan et al. (1971).

Feita a curva de calibração, folhas sintomáticas de todos os tratamentos do experimento foram marcadas para acompanhar as leituras de clorofila com o progresso da doença. Utilizou-se o esquema de análise de variância fatorial ($6 \times 4 \times 2$), sendo o fator 1, as horas de molhamento de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, o fator 2 as temperaturas de 17, 21, 25 e 29°C e o fator 3, a seção da folha (sadia/doente), totalizando 48 tratamentos. As leituras foram feitas com o aparelho portátil SPAD-502[®] no dia das avaliações da incidência e da severidade da doença. Foram feitas dez leituras por folha, sendo cinco nas áreas saudas (ausência de sintomas) e cinco nas áreas doentes das folhas (presença de sintomas). Com os dados obtidos, determinaram-se os níveis de clorofila a, b e total em cada tratamento ao longo do tempo.

Trocas gasosas

Ao final do experimento, com um analisador portátil de gás por infravermelho (IRGA-ADC-LCA4[®]), avaliou-se a taxa fotossintética líquida (A), concentração intercelular de CO₂ (C_i), condutância estomática (Cond), transpiração (Tr) e temperatura foliar (Tleaf) de folhas saudas e doentes. Em

seguida, esses dados foram correlacionados com a temperatura, horas de molhamento e incidência da doença.

Análise estatística dos dados dos experimentos

Foi realizada análise conjunta dos dois experimentos, repetidos ao longo do tempo. Os dados foram submetidos ao teste de Levene para analisar a homogeneidade e a variância dos resíduos. Como os dados seguiram as pressuposições da análise de variância (ANAVA), foi feito o teste F para as variáveis analisadas, sem a necessidade de transformar os dados, no programa SAS. No caso das variáveis significativas, procedeu-se ao ajuste de modelos lineares e não lineares de regressão no programa R. Os cortes das superfícies de resposta e o gráfico dos dados observados foram plotados no programa Sigma Plot.

3 RESULTADOS

A análise conjunta dos experimentos não foi significativa ($P > 0.05$), portanto os resultados referem-se as suas respectivas médias.

Curvas de progresso da doença

Os primeiros sintomas da doença foram observados aos 22 dias após a inoculação. A partir desta data foi observada taxa de progresso que levou à fase exponencial da epidemia. A curva de progresso da incidência variou em função do binômio horas de molhamento x temperatura. O maior progresso da doença foi observado na temperatura de 25°C, atingindo 44,0% de incidência no tratamento de 72 horas de molhamento foliar e 35,7% a 48 horas de molhamento. Nas temperaturas de 17, 21, e 29° C, o maior progresso foi observado nas horas de molhamento de 72, 72 e 48 horas, respectivamente (Figura 1).

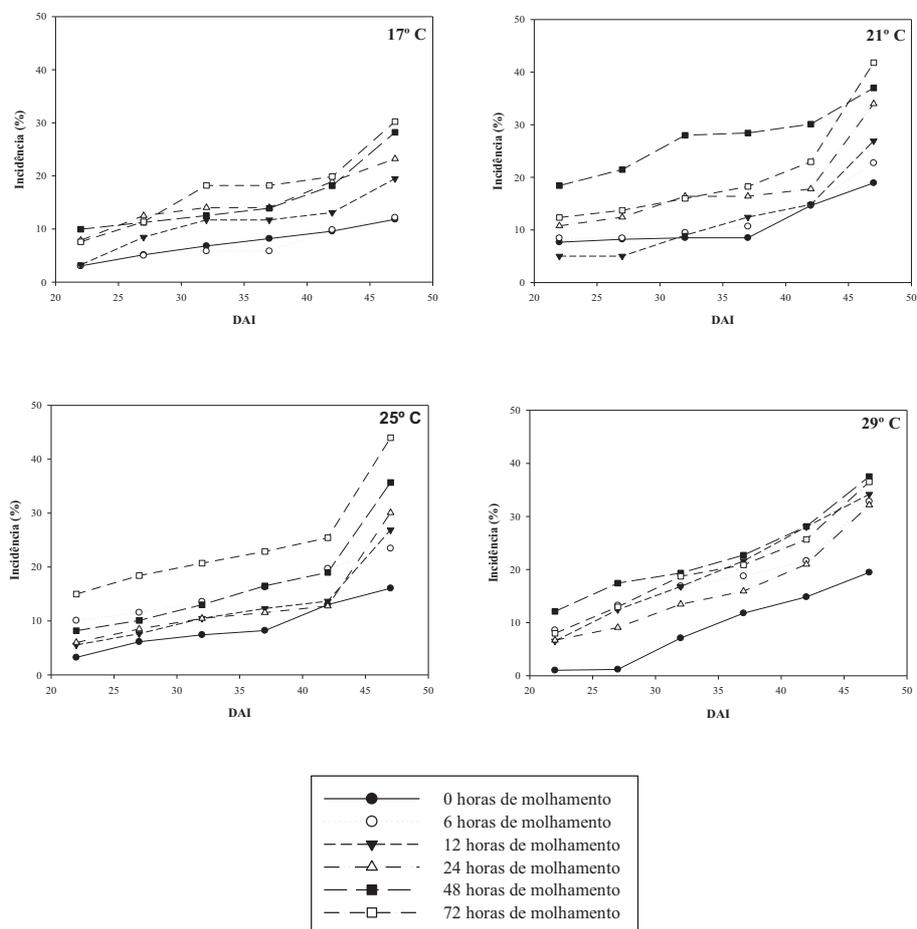


Figura 1: Curvas de progresso da incidência da cercosporiose do cafeeiro.

Com relação à severidade da doença, o comportamento foi semelhante ao da incidência, sendo os maiores progressos observados na temperatura de 25°C à 72 horas de molhamento foliar (5,25%), seguido por 48 horas (4,83%). Para as temperaturas de 17, 21 e 29°C, o maior progresso foi observado a 48 horas de molhamento foliar (Figura 2).

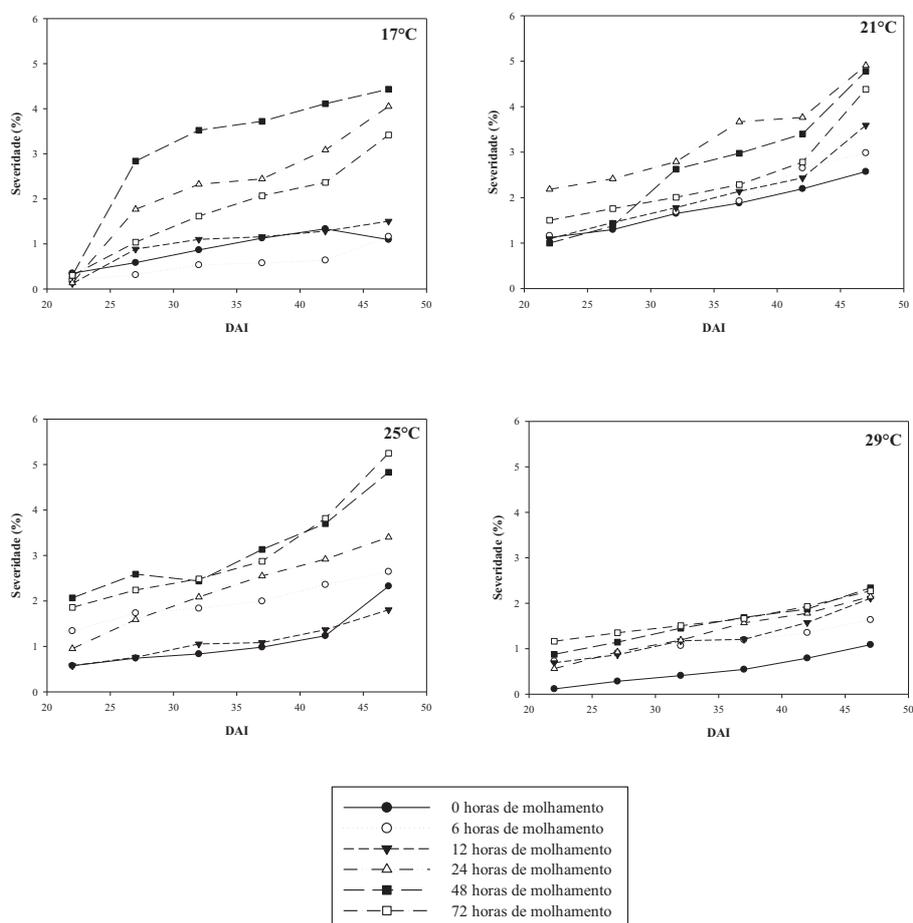


Figura 2: Curva de progresso da severidade da cercosporiose.

Incidência e severidade da doença

Foi observada interação significativa ($P < 0.05$) entre temperatura e horas de molhamento foliar para as variáveis incidência e severidade da cercosporiose. A máxima incidência observada foi a 25°C e 48 horas de molhamento foliar (Figura 3). De acordo com a dispersão dos dados, ajustou-se o modelo não linear de Gompertz aos dados de incidência em função das horas de molhamento foliar e o modelo linear quadrático aos dados de incidência em função da temperatura

(Tabela 1). Com base nos avaliadores de qualidade utilizados, a superfície de resposta obtida pela combinação marginal dos modelos Gompertz e Quadrático, foi melhor em relação ao modelo Polinomial (Tabela 2).

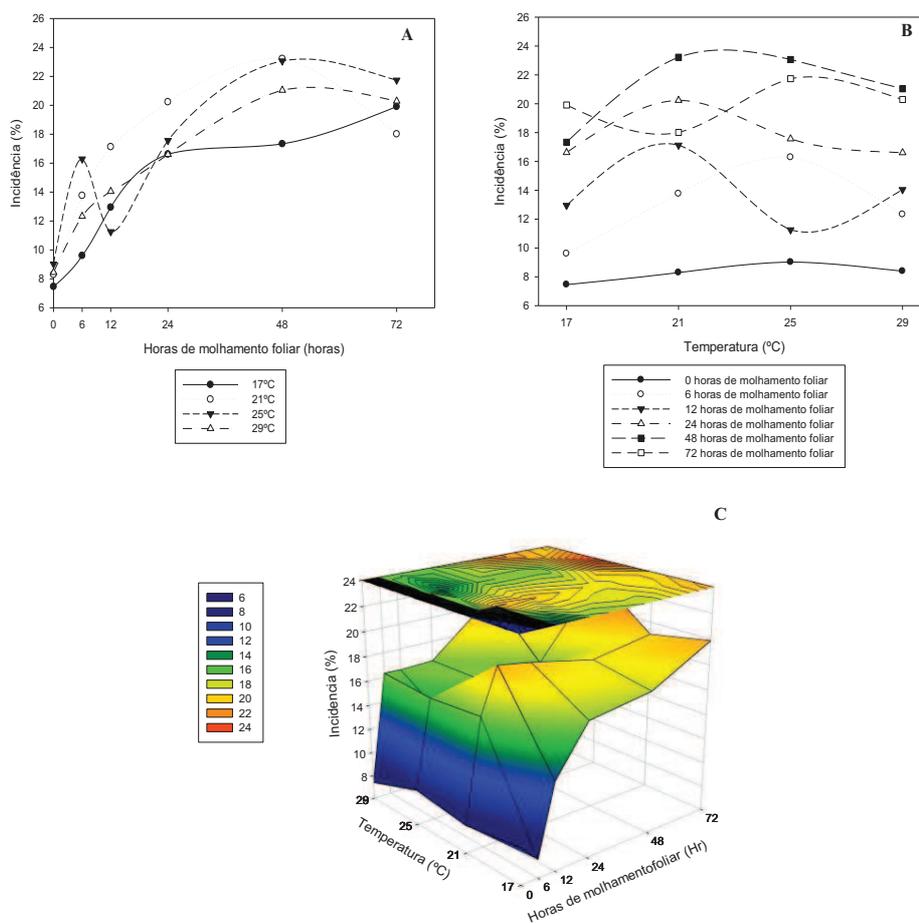


Figura 3: Incidência observada da cercosporiose, em função **A**, horas de molhamento foliar e **B**, temperatura. **C**, Efeito da temperatura e horas de molhamento foliar na incidência da cercosporiose do cafeeiro.

Tabela 1: Estimativas para os parâmetros do modelo de regressão não linear de Gompertz $y = ae^{(-e^{(-k*(HMol - b)})}$ ajustado aos dados de incidência em função das horas de molhamento foliar (HMol) e para os parâmetros do modelo de regressão linear quadrático $y = a * Temp + b * Temp^2$ aos dados em função da temperatura. Estimativas para os parâmetros do modelo de regressão linear polinomial $Y = a * Temp + b * HMol + c * Temp^2 + d * HMol^2$) ajustado aos dados de incidência em função do molhamento e temperatura.

Modelos	Parâmetros	Estimativas	Erro-padrão
Gompertz HMol	a	18,7930	0,7614
	b	-2,1298	1,6542
	k	0,1264	0,0366
Quadrático Temp	a	1,2749	0,1205
	b	-0,0251	0,0048
Polinomial	a	0,832667	0,168116
	b	0,331688	0,089299
	c	-0,015543	0,006133
	d	0,002905	0,001207

Tabela 2: Qualidade de ajuste da superfície de resposta gerada pela combinação dos modelos marginais lineares quadráticos e do modelo polinomial (linear múltiplo):

Avaliadores	R_a^2	AIC
Gompertz*Quadrático	0,9002	318,66
Polinomial	0,8401	472,30

*Akaike's Information Criterion

A máxima severidade observada também foi a 25°C e 48 horas de molhamento foliar (Figura 4), porém, não foi possível ajustar um modelo não linear, pois o padrão do comportamento dos dados sugere um crescimento quadrático. Dessa forma ajustaram-se modelos marginais quadráticos para as variáveis horas de molhamento foliar e temperatura (Tabela 3). Com base nos avaliadores de qualidade utilizados, a superfície de resposta obtida pela combinação marginal dos modelos Quadráticos foi melhor em relação ao modelo Polinomial (Tabela 4).

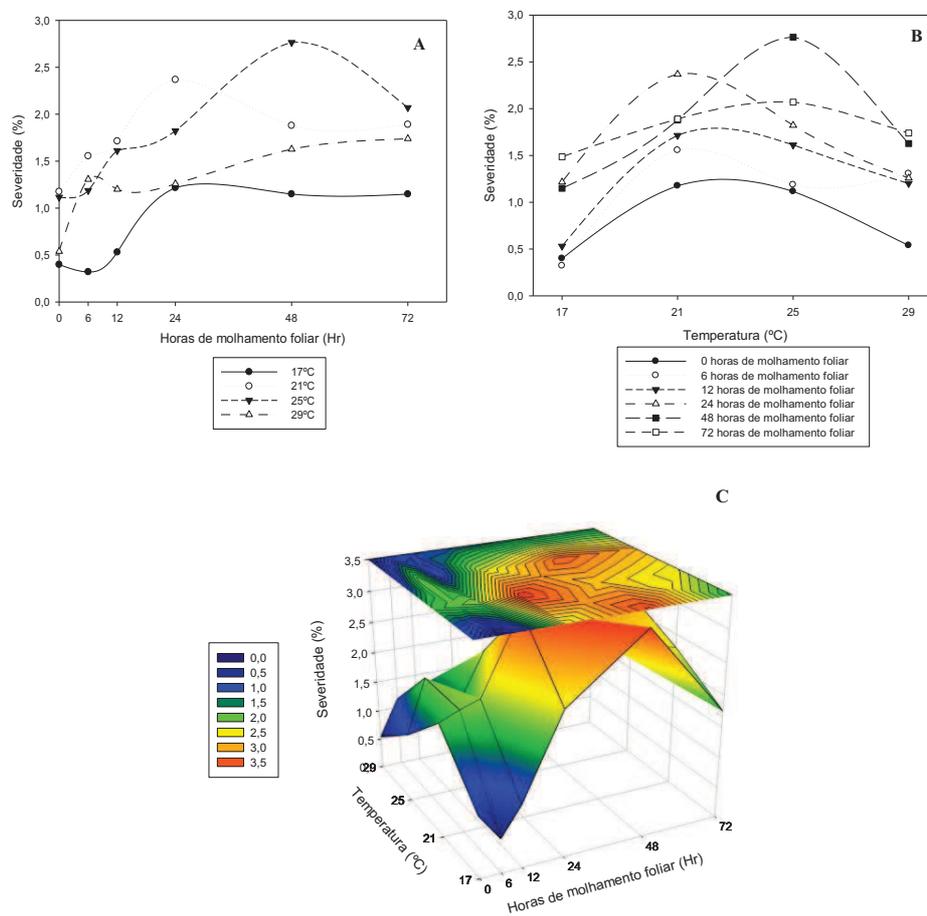


Figura 4: Severidade observada da cercosporiose em função **A**, horas de molhamento foliar e **B**, temperatura. **C**, Efeito da temperatura e horas de molhamento foliar na severidade da cercosporiose do cafeeiro.

Tabela 3: Estimativas para os parâmetros do modelo de regressão linear quadrático $y = a + b * HMol + c * HMol^2$ ajustado aos dados de severidade em função das horas de molhamento foliar e $y = a + b * Temp + c * Temp^2$ em função da temperatura. Estimativas para os parâmetros do modelo linear polinomial $Y = a + b * Temp + c * HMol + d * Temp^2 + e * HMol^2$ ajustado aos dados em função das horas de molhamento e temperatura.

Modelos	Parâmetros	Estimativas	Erro-padrão
Quadrático HMol	a	0,997379	0,165068
	b	0,065864	0,013646
	c	-0,000695	0,000184
Quadrático Temp	a	-9,217556	1,833078
	b	1,036817	0,163953
	c	-0,023331	0,003553
Polinomial	a	-10,042	2,25103
	b	1,0371	0,20113
	c	0,0658	0,01077
	d	-0,0233	0,00435
	e	0,00069	0,00045

Tabela 4: Qualidade de ajuste da superfície de resposta gerada pela combinação dos modelos marginais lineares quadráticos e do modelo polinomial (linear múltiplo):

Avaliadores	R_a^2	AIC*
Quadrático*Quadrático	0,9166	192,44
Polinomial	0,8865	364,22

*Akaike's Information Criterion

AACPD

Os resultados para área abaixo da curva de progresso da doença para incidência (AACPDI) e para severidade (AACPDS), de acordo com o teste F, foram significativos apenas para a variável horas de molhamento foliar ($P < 0.05$). O valor de AACPDI máximo foi observado a 77,92 horas de molhamento foliar (Figura 5A) e a AACPDS máxima foi observada a 66,93 horas de molhamento foliar (Figura 5B).

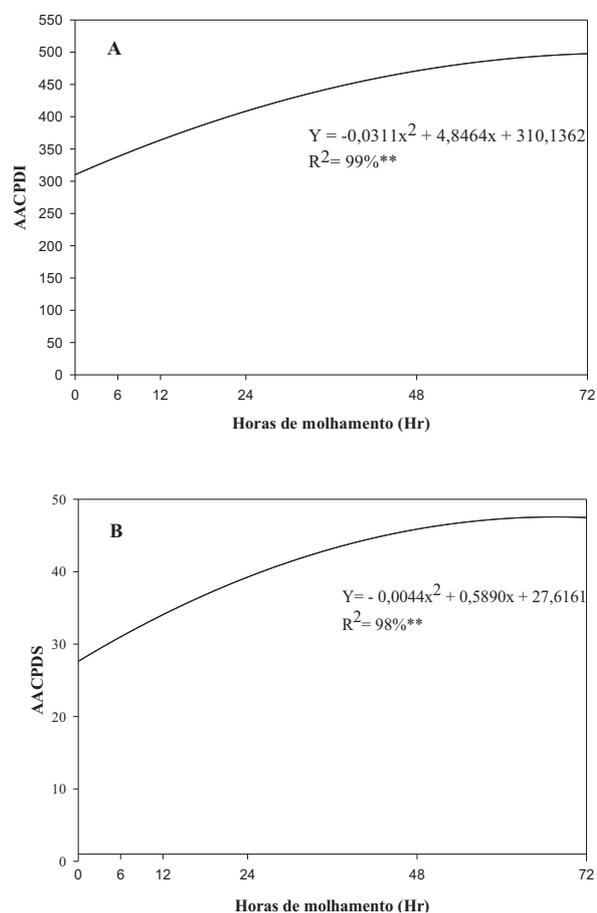


Figura 5: Comportamento da AACPDI (A) e AACPDS (B) em relação às horas de molhamento foliar.

Análise das clorofilas a, b e total

Os resultados para as clorofilas a, b e total, de acordo com o teste F, não foram significativos ($P > 0.05$).

Correlação entre as variáveis fisiológicas, temperatura, horas de molhamento e incidência da doença

Observou-se correlações significativas negativas entre temperatura (°C) e carbono interno (Ci), transpiração (Tr) e temperatura da folha (Tleaf). A fotossíntese correlacionou-se negativamente com o Ci. Houve correlação positiva entre condutância estomática (Cond) e Ci e entre Cond e Tr. Esses resultados foram observados nas folhas doentes (Tabela 5). Nas folhas saudas, observou-se apenas correlação negativa entre fotossíntese e Ci e positiva entre Cond e Tr. Em todas as temperaturas testadas, a fotossíntese foi menor nas folhas doentes em relação às saudas (Gráfico 6).

Tabela 5: Correlação entre variáveis fisiológicas e temperatura, horas de molhamento foliar e incidência da cercosporiose em folhas doentes.

	¹ Ci	Tr	Tleaf
Temp(°C)	-0.67**	-0.44*	0.57**
H molhamento	-0.18 ns	-0.28ns	0.02 ns
Fotossíntese	-0.30*	0.021ns	0.001ns
Cond	0.61**	0.98**	-0.36ns
Incidência (%)	-0.13ns	-0.39ns	0.32ns

Ns= não significativo * significativo a 0,05% ** significativo a 0,01%

¹Ci= Carbono interno. Tr= Transpiração. Tleaf= Temperatura da folha. Cond= Condutância estomática

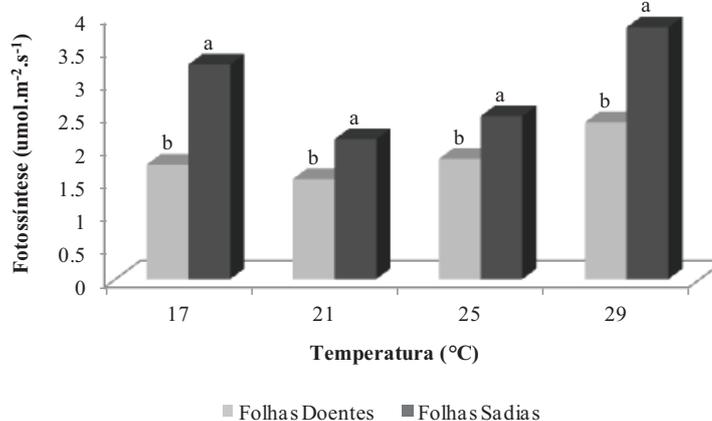


Gráfico 6: Taxa fotossintética de folhas doentes e saudáveis.

4 DISCUSSÃO

Nas condições estudadas, o maior progresso da incidência da doença foi observado na temperatura de 25°C atingindo 44,0% a 72 horas de molhamento foliar e 35,7% a 48 horas de molhamento foliar. Para a severidade, o maior progresso da doença foi observado em condições semelhantes, atingindo 5,25% de área lesionada, também a 25°C e 72 horas de molhamento foliar, seguido por 48 horas de molhamento (4,83%). Fernandes et al. (1991) observaram resultados diferentes no estudo de *C. coffeicola* e horas de molhamento foliar (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas), sendo a incidência máxima obtida a 6, 12, 24 e 48 horas de molhamento foliar, enquanto a severidade atingiu os maiores valores a 6 e 12 horas de molhamento foliar, porém, este autor não estudou a interação com a variável temperatura, sendo usado a temperatura fixa de 25°C. Já Souza (2007) estudando diferentes temperaturas na severidade da doença em mudas de cafeeiro observou a maior severidade da doença na temperatura de 22°C. Ambos os autores estudaram tais variáveis apenas isoladamente e não procederam ao ajuste de modelos.

O molhamento foliar foi importante também em outros patossistemas. Wallin & Loonan (1971) observaram a capacidade de *C. beticola* infectar o hospedeiro na presença de 48 ou 72 horas de molhamento foliar cerca de 30 ou 80 vezes mais, respectivamente, em relação ao tratamento de 24 horas de molhamento foliar. Berger & Hanson (1963) estudaram o efeito do período de molhamento foliar em *Trifolium pratense* sobre a intensidade da cercosporiose, causada por *C. zebrina*, a 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 e 144 horas de molhamento foliar a 24°C. Após 14 dias, a severidade da doença foi nula com 0 e 12 horas e máxima com 144 horas. Para o patossistema *Cercospora heliotropii-bocconii* e *Heliotropium europaeum* tanto a incidência quanto a severidade da doença aumentaram com o aumento do período de molhamento foliar de 8 para 72 horas (HASAN et al., 1995), porém não foi estudada a interação com a temperatura.

Para o processo de infecção de *C. carotae*, a temperatura e a duração do período de molhamento foliar mostraram-se essenciais para a ocorrência da doença em câmaras de crescimento. Carisse & Kushalappa (1990) observaram ser 24 horas de molhamento foliar o tempo mínimo necessário para a doença ocorrer, associado à faixa de temperatura entre 20 a 28°C. De 12 para 24 horas, o número de lesões aumentou devagar, porém, quando o período de molhamento foliar foi de 48 e 72 horas, o progresso foi rápido. O máximo de lesões foi observado no tratamento de 96 horas de molhamento foliar a 16, 20, 24 e 28°C.

Em *C. asparagi* foi observado relação direta entre horas de molhamento foliar e intensidade da doença (COOPERMAN & JENKINS, 1986). Berger & Hanson (1963) observaram aumento da severidade da doença quando ocorria exposição à alta umidade após a inoculação e durante o período de infecção, e segundo os autores, isso ocorreu provavelmente devido ao aumento do conteúdo de água nos tecidos vegetais ou a presença de alta umidade relativa em torno dos tecidos, favorecendo a dispersão do patógeno no hospedeiro. Para a infecção de

C. asparagi ocorrer foi necessário a presença de água livre e temperatura ótima, a 35°C a doença não ocorreu.

O período de molhamento foliar é um dado importante, o qual foi usado em muitos sistemas de previsão de doença, isso porque o risco de epidemias de várias doenças foliares ocorrer, está diretamente relacionada com a duração dos períodos de água livre presente na superfície das plantas cultivadas (HUBER & GILLESPIE, 1992; MARCUZZO et al., 2009). O molhamento foliar tem sido também usado em estudos de trocas gasosas da fotossíntese e da transpiração (ISHIBASHI & TERASHIMA, 1995; HANBA et al., 2004; LETTS & MULLIGAN, 2005).

A cercosporiose por ser uma doença foliar, causa distúrbios fisiológicos na planta, como por exemplo, o amarelecimento das folhas, a redução da área fotossintética e a queda de folhas. O amarelecimento das folhas deve-se a redução dos teores de clorofila, presentes nos tecidos, causados pelo patógeno e de acordo com os resultados obtidos, observou-se, independente dos tratamentos, na área infectada com o patógeno, os teores das clorofilas a, b e total foram sempre inferiores às folhas saudáveis. Isso deve-se provavelmente, ao fato da destruição da clorofila ou dos cloroplastos na região do halo amarelado presente nas lesões de cercosporiose (REZENDE et al., 2011).

Com relação a correlação negativa entre fotossíntese e C_i e entre temperatura e C_i , implica que provavelmente a rubisco estava funcional, pois o carbono interno estava sendo consumido para a realização da fotossíntese, sendo favorecida pelo aumento da temperatura. A correlação positiva entre condutância estomática e transpiração, é justificada, pois, com os estômatos abertos a transpiração ocorre também por esta via.

O CO_2 e o vapor de água são trocados através do mesmo poro estomático, com isso, o conhecimento sobre a relação entre fotossíntese, crescimento vegetal e produtividade são necessários, a fim de definir melhor as

estratégias para a adoção de procedimentos de produção sustentável. Os danos causados pela deficiência hídrica na atividade fotossintética das plantas culminam com o fechamento dos estômatos, acarretando em alterações no metabolismo fotossintético (OREN et al., 1999). Quando a deficiência hídrica ocorre durante a fase de reprodução, os efeitos são ainda mais desastrosos para a planta, causando não apenas o abortamento dos frutos, mas também a perda das folhas e a consequente queda drástica de produção (ENDRES et al., 2010).

5 CONCLUSÃO

Como demonstrado neste trabalho, a interação da temperatura com o molhamento foliar, interferem no progresso da doença, na incidência e na severidade da doença e também em variáveis fisiológicas do cafeeiro, podendo acarretar em perdas de produção e comprometimento da lavoura. Nas condições estudadas, o progresso tanto da incidência quanto da severidade da doença foram maiores na temperatura de 25°C e 72 horas de molhamento foliar, enquanto a incidência e a severidade foram maiores nas condições de 25°C e 48 horas de molhamento foliar e a fotossíntese foi sempre menor nas folhas sintomáticas. Estudos como este, são importantes em programas de alerta fitossanitário e também são essenciais para o conhecimento da epidemiologia da doença.

6 REFERÊNCIAS

- ALDERMAN, S.C. & BEUTE, M.K. Influence of temperature and moisture on germination and germ tube elongation of *Cercospora arachidicola*. **Phytopathology** 76:715-719, 1986.
- ANCO, D. J.; MADDEN, L.V.; ELLIS, M. A. Effects of temperature and wetness duration on the sporulation rate of *Phomopsis viticola* on infected grape canes. **Plant Disease** 97:579-589, 2013.
- BERGER, R.D. & HANSON, E.W. Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. **Phytopathology** 53:286-294.

- CANOVA A. 1959. Ricerchesula biologia e l'epidemiologia della *Cercospora beticola* Sacc. **Ann. Sper.Agr.**, N.S. 13: 37-82,1963.
- CARISSE, O. & KUSHALAPPA, A.C. Development of an infection model for *Cercospora carotae* on carrot based on temperature and leaf wetness duration. **Phytopathology** 80:1233-1238, 1990.
- 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.
- CHAVES, M.M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. **Function Plant Biology**, 30:239-264, 2003.
- COOPERMAN, C.J. & JENKINS, S.F. Conditions Influencing Growth and Sporulation of *Cercospora asparagi* and Cercospora Blight Development in *Asparagus*. **Phytopathology** 76:617-622, 1986.
- CUSTÓDIO, A.A.P.; POZZA, E.A.; GUIMARÃES, S.S.C.; KOSHIKUMO, E.S.M.; HOYOS, J.M.A.; Souza, P.E. Comparison and validation of diagrammatic scales for brown eye spots in coffee tree leaves. **Ciência e Agrotecnologia** 35:1067-1076, 2011.
- ENDRES, L.; SOUZA, J.L.; TEODORO, I.; MARROQUIM, P.M.G.; SANTOS, C.M.; BRITO, J.E.D. Gas exchange, alteration caused by water deficit during the bean reproductive stage. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 14:11–16, 2010.
- FERNANDES, C.D; DEL PELOSO, M.C.; MAFFIA, L.A.; VALLE, 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.
- 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.
- GROENEWALD, M.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Distinct species exist within the *Cercospora apii* morphotipe. **Phytopathology** 95:951-959, 2005.

HANBA, Y.T.; MORIYA, A.; KIMURA, K. Effect of leaf surface wetness and wettability on photosynthesis in bean and pea. **Plant, Cell and Environment** 27:413-421,2004.

HASAN, S.; JOURDAN, M.; BRUN, L.; SHEPPARD, A.W. Axenic culture and influence of wetness period and inoculum concentration on infection and development of cercospora blight of *Heliotropium europaeum*. **European Journal of Plant Pathology** 101: 491-496, 1995.

HUBER, L. & GILLESPIE, T.J. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. **Annual Review of Phytopathology** 30:553- 577, 1992.

ISHIBASHI, M. & TERASHIMA, I. Effects of continuous leaf wetness on photosynthesis: adverse aspects of rainfall. **Plant, Cell and Environment**, 18:431-438, 1995.

LAWLOR, D.W. & CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment** 25:275-294, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; Cox, M. M. 2011. **Princípios de bioquímica**. 5ª ed.

LETTS, M. G.; MULLIGAN, M. The impact of light quality and leaf wetness on photosynthesis in north-west Andean tropical montane cloud forest. **Journal of Tropical Ecology** 21:549-557, 2005.

LIJUN, WU; DAMICONE, J.P.; DUTHIE, J.A.; MELOUK, H.A. Effects of Temperature and Wetness Duration on Infection of Peanut Cultivars by *Cercospora arachidicola*. **Phytopathology** 89:653-659, 1999.

LIMA, L. M.; POZZA, E. A.; SANTOS, F. S. Relationship between Incidence of Brown Eye Spot of Coffee Cherries and the Chemical Composition of Coffee Beans. **Journal of Phytopathology** 160:209-211, 2012.

MARCUZZO, L.L.; FERNANDES, J.M.C.; BECKER, W.F. Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. **Summa Phytopathologica** 35:229-230, 2009.

OREN, R.; SPERRY, J.S.; KATUL, G.G.; PATAKI, D.E.; EWERS, B.E.; PHILLIPS, N.; SCHAFER, K.V.R. Survey and synthesis of intra and inter specific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. **Plant, Cell and Environment** 22:1515-1526, 1999.

OSO, B. A. Conidial germination in *Cercospora arachidicola* Hori. **Transactions of the British Mycology Society** 59:169-172, 1972.

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.

POZZA, E.A; CARVALHO, L.C.; CHALFOUN, S.M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: Guimarães, R. J.; Mendes, A. N. G.; Baliza, D. P. **Semiologia do cafeeiro: Sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras, p.68-106, 2010.

REZENDE, J.A.M.; MASSOLA JR., N.S.; BEDENDO, I.; KRUGNER, T.L. Controle de doença, sintomatologia e diagnose. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 - Princípios e Conceitos. eds. 4ª Edição, 2011.

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

SILVA, S.R.; RIOS, G.P.; SILVA, S.C. Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 26:726-731, 2001.

SOCIAS, X.; CORREIA, M.J.; CHAVES, M.M.; MEDRANO, H. The role of abscisic acid and water relations in drought responses of sub- terranean clover. **Journal Experimental Botany** 48:1281-1288, 1997.

SOUZA A.G.C. Variabilidade fisiológica de isolados de *Cercospora coffeicola*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG, 2007.

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.

WAGGONER, P.E. Forecasting Epidemis In: Horsfall, J.G & Cowling, E.B. **Plant Disease and Advanced Treatise** 3:291-310, 1960.

WALLIN, J.R. & LOONAN, D.V. Effect of leaf wetness duration and air temperature on *Cercospora beticola* infection of sugar beet. **Phytopathology** 61:546-549, 1971.

WITHAN F. H.; BLAYDES D. F.; DEVLIN R. M. **Experiments in Plant Physiology**. Van Nostrand Reinhold Co., New York, p. 55-58, 1971.

(VERSÃO PRELIMINAR)

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A presença de doenças na cafeicultura acarreta em queda de produção e consequente prejuízos ao produtor. A importância da cercosporiose tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à migração territorial que a cultura vem sofrendo no Brasil, sendo plantada em regiões antes consideradas impróprias ao cultivo de culturas perenes, em latossolos, com alto nível de insolação e déficit hídrico para o cafeeiro, além da busca por maior produtividade, mas com o uso de cultivares suscetíveis e desenvolvidas há décadas.

Este trabalho contribuiu para esclarecer o efeito das variáveis ambientais, temperatura, intensidade luminosa e molhamento foliar, e suas interações em *Cercospora coffeicola* e na cercosporiose do cafeeiro. Como demonstrado, tais variáveis interferem na ocorrência e no progresso da doença, além de afetar as variáveis fisiológicas do cafeeiro (*Coffea arabica*), acarretando diretamente em perdas de produção e comprometimento da lavoura. Para desenvolver eficientes táticas de manejo, tais variáveis e seus efeitos, devem ser considerados.

Mais estudos com este patossistema precisam ser realizados e a busca por cultivares resistentes desenvolvidas, mas enquanto isso, para o manejo da doença, pode-se manusear medidas simples como a nutrição mineral, realizar plantios consorciados com árvores ou outras culturas, alterar o espaçamento nas linhas e entre linhas de plantio, objetivando promover sombreamento na lavoura. Pode-se também trabalhar a parte da irrigação, evitando-se a deficiência hídrica. Medidas como estas, podem auxiliar no manejo da cercosporiose, otimizando o emprego de defensivos, reduzindo o impacto ambiental, gerando responsabilidade social de forma a aumentar a produtividade e a qualidade da bebida, contribuindo para a comunidade, a qual beneficia-se da cultura.