

DARTANHÃ JOSÉ SOARES

ESPORULAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE CONÍDIOS DE *Cercospora coffeicola*

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

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

T

S676e
2003

Soares, Dartanhã José, 1976-

Esporulação e germinação *in vitro* de conídios de
Cercospora coffeicola / Dartanhã José Soares. – Viçosa :
UFV, 2003
31p. : il.

Orientador: Luiz Antonio Maffia
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Viçosa

1. *Cercospora coffeicola* - Esporulação. 2. *Cercospora
coffeicola* - Germinação. 3. *Cercospora coffeicola* -
Cultivo *in vitro*. 4. Esporulação - Indução. 5. Esporula-
ção - Efeito da luz. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 19.ed. 589.24


CDD 20.ed. 589.24

DARTANHÃ JOSÉ SOARES


**ESPORULAÇÃO E GERMINAÇÃO IN VITRO DE CONÍDIOS DE *CERCOSPORA*
*COFFEICOLA***

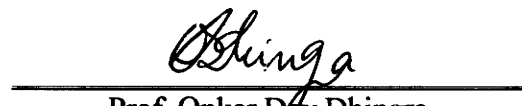
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

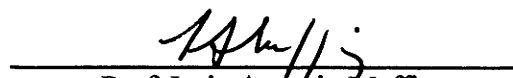
APROVADA: 07 de março de 2003


Prof. Eduardo S. G. Mizubuti
(Conselheiro)


Prof. Acelino Couto Alfenas
(Conselheiro)


Prof. Edson Ampélio Pozza
(Examinador)


Prof. Onkar Dev Dhingra
(Examinador)


Prof. Luiz Antonio Maffia
(Orientador)

A Arcélia Orlandi Soares (In Memoriam)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luiz Antonio Maffia, pelos ensinamentos, pela orientação, pelas críticas e sugestões e pela compreensão durante o curso.

Ao professor Eduardo Seite Gomide Mizubuti, pela orientação e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pela orientação, pelas sugestões e pelo apoio.

Aos meus irmãos Vagner e Renato, pelo afeto.

A minha namorada, Aline, pelo amor, pelo exemplo de dedicação, pelas críticas e sugestões e pelo constante estímulo para a realização deste trabalho.

A Maria Luisa, Maria da Glória e Ludmila, pelo carinho e afeto.

A Margarida Goréte e Aldir, pela grandiosa amizade, pelo estímulo e pelo exemplo de empenho a ser seguido.

Aos colegas da pós-graduação e de laboratório, pela amizade e convívio, em especial a Sérgio Nobre, grande amigo e companheiro.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia que de uma forma ou outra contribuíram para o sucesso desta empreitada.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial a Délio Duarte, Jésus, Camilo, Marcão e Renildo, pela amizade e prestatividade.

A todos que, embora não mencionados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DARTANHÃ JOSÉ SOARES, filho de Arcélia Orlandi Soares e José Eloi Soares, nasceu em Progresso – RS, em 16 de maio de 1976.

Em março de 1996, formou-se Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal “Pres. Juscelino Kubistchek” de Bento Gonçalves – RS.

Em março de 2001, concluiu o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em abril de 2001, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa – MG.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE TERATURA.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1. Esporulação de <i>Cercospora coffeicola</i> em diferentes meios de cultura e regimes de luz	9
3.2. Variabilidade de isolados de <i>Cercospora coffeicola</i> quanto à capacidade de esporulação.....	11
3.3. Esporulação de <i>Cercospora coffeicola</i> em diferentes valores de pH do meio de cultura.....	12
3.4. Esporulação de <i>Cercospora coffeicola</i> com a adição de biotina, tiamina e Panvit [®]	12
3.5. Porcentagem de germinação de esporos de <i>Cercospora coffeicola</i>	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1. Esporulação de <i>Cercospora coffeicola</i> em diferentes meios de cultura e regimes de luz.....	14
4.2. Variabilidade de isolados de <i>Cercospora coffeicola</i> quanto à capacidade de esporulação.....	17
4.3. Esporulação de <i>Cercospora coffeicola</i> em diferentes valores de pH do meio de cultura.....	19
4.4. Esporulação de <i>Cercospora coffeicola</i> com a adição de biotina, tiamina e Panvit [®]	19
4.5. Porcentagem de germinação de esporos de <i>Cercospora coffeicola</i>	19
5. DISCUSSÃO	23
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

SOARES, Dartanhã José, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Março 2003.
Esporulação e germinação *in vitro* de conídios de *Cercospora coffeicola*. Orientador:
Luiz Antonio Maffia. Conselheiros: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti e Acelino Couto
Alfenas.

A mancha de olho pardo do cafeeiro, cujo agente etiológico é *Cercospora coffeicola*, é uma das mais antigas e importantes doenças da América Latina. Como a disponibilidade de conídios do patógeno é requerimento básico para vários estudos, é necessário que o fungo esporule abundantemente *in vitro*. As informações sobre a capacidade de esporulação de *Cercospora* spp., especificamente *C. coffeicola*, em meio de cultura, são escassas e contraditórias. Neste trabalho estudaram-se os efeitos de regimes de luz, meios de cultura, pH do meio de cultura e adição de vitaminas na esporulação de *C. coffeicola*, bem como compararam-se isolados do patógeno quanto à capacidade de esporulação. Adicionalmente, estudou-se a germinação dos conídios do fungo produzidos sob as condições mais propícias à esporulação. Compararam-se cinco meios de cultura, sob três regimes de luz. Os meios V8 ($3,55 \times 10^3$ conídios/cm²) e extrato de pó de café (EPC)+V8 ($4,53 \times 10^2$ conídios/cm²) sob o regime de luz contínua propiciaram melhor esporulação. Os isolados CC-01 ($4,20 \times 10^4$ conídios/cm²) e RAP-02 ($2,45 \times 10^5$ conídios/cm²), nos meios V8 e EPC+V8 sob luz contínua, foram os que apresentaram maior capacidade de esporulação. A faixa de pH entre 4,0 e 6,0 não afetou a esporulação dos isolados CC-01 ($9,70 \times 10^4$ conídios/cm²) e RAP-02 ($4,56 \times 10^4$ conídios/cm²), cultivados nos meios V8 e EPC+V8 sob luz contínua. A adição de biotina (50 µg/L), tiamina (100 µg/L) ou Panvit[®] (uma drágea/L) aos meios V8 e EPC+V8, não influenciou na esporulação dos isolados CC-01 e RAP-02. A germinação dos conídios em ágar-água 2% foi alta (média

geral 97%), independente do isolado (CC-01 ou RAP-02), meio de cultura (V8 ou EPC+V8) ou da fonte de vitamina (tiamina ou Panvit[®]) adicionada ao meio.

ABSTRACT

SOARES, Dartanhã José, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2003. **Sporulation and germination of spores of *Cercospora coffeicola* *in vitro***. Adviser: Luiz Antonio Maffia. Committee members: Eduardo Seiti Gomide Mizubuti and Acelino Couto Alfenas.

Brown eye spot, caused by *Cercospora coffeicola*, it is one of the oldest and most important diseases of coffee plants in Latin America. As the availability of pathogen spores is a requirement to many basic studies, it is necessary to have abundant sporulation of the pathogen *in vitro*. Information about the sporulation of *Cercospora* spp., specifically *C. coffeicola*, in culture media is scarce and contradictory. Therefore this work aimed to study the effect of light regimes, culture media, pH of culture media, and addition of vitamins on sporulation of *C. coffeicola*. Additionally, sporulation of pathogen isolates was compared and spore germination of the pathogen produced under the most favorable sporulation conditions was studied. Five culture media and three light exposure regimes were compared. V8 (3.55×10^3 spores/cm²) and extract of ground coffee (EPC)+V8 (4.53×10^2 spores/cm²) media were the most efficient in inducing sporulation, under continuous light. In the two best media, under continuous light, five pathogen isolates were compared. The isolates CC-01 (4.20×10^4 spores/cm²) and RAP-02 (2.45×10^5 spores/cm²) produced highest number of conidia. In the V8 and EPC+V8 media isolates CC-01 (9.70×10^4 spores/cm²) and RAP-02 (4.56×10^4 spores/cm²) sporulated well, with no statistical difference, on the medium pH ranging from 4.0 to 6.0. The addition of the vitamins biotin (50 µg/L), thiamin (100 µg/L), or Panvit[®] (a capsule/L) to the V8 and EPC+V8 media had no effect on sporulation of CC-01 (1.28×10^5 spores/cm²) and RAP-02 (8.41×10^3 spores/cm²) isolates. Conidia germination rates high (average 97%), regardless isolate (CC-01 or RAP-02), culture medium (V8 or EPC+V8), or vitamin source (thiamin or Panvit[®]) added to the medium.

1. INTRODUÇÃO

A mancha de olho pardo, cujo agente etiológico é *Cercospora coffeicola* Berk & Cook., é uma das mais antigas doenças do cafeeiro. Na maioria dos países produtores de café da América Central e do Sul, é considerada a principal enfermidade por ser amplamente distribuída e por ocasionar grandes perdas na produção. No Brasil, é tida como de importância secundária apesar das perdas que pode ocasionar (Carvalho & Chaulfoun, 2000; González *et al.* 2000).

A mancha de olho pardo provoca maiores danos no viveiro e transplante para o local definitivo, onde causa intensa desfolha e redução no crescimento da plantas. Nas folhas, os sintomas caracterizam-se por manchas circulares, de coloração castanho-clara a escura, com centro branco-acinzentado, quase sempre envolvidas por um halo amarelado. Frutos doentes apresentam um aspecto ressecado, a polpa adere-se ao pergaminho dificultando o despulpamento, além de acelerar a maturação, provocando queda prematura ou tornando-os chochos, conseqüente reduzindo a qualidade final da bebida (Carvalho & Chaulfoun, 2000).

Apesar da importância desta doença, são poucos os estudos realizados visando esclarecer aspectos da ecologia, epidemiologia e fisiologia desta doença. Para o desenvolvimento de tais trabalhos, bem como para estudos genéticos, citológicos, implantação de programas de melhoramento e busca de novos métodos de controle do patógeno é fundamental obter abundante produção de conídios em meio de cultura.

As informações sobre a capacidade de esporulação das diversas espécies de *Cercospora*, em meio de cultura, são confusas e contraditórias. Em estudos, com uma ou diversas espécies de *Cercospora*, obteve-se desde abundante produção de conídios a completa ausência de esporulação. Especificamente para *C. coffeicola* as informações quanto à esporulação em meio de cultura, além de contraditórias, são escassas (Quadro 1).

Quadro 1. Esporulação de *Cercospora* spp. em diferentes condições de cultivo.

Espécie/ Hospedeiro	Condições propícias à esporulação (Referência)
<i>C. arachidicola</i> / <i>Arachis hypogaea</i>	Amendoim-aveia-ágar, luz contínua (duas lâmpadas fluorescentes de 15-W, 31cm acima das culturas), 28° C, 14 dias (Smith, 1971).
	Água-ágar + Extrato de folha de amendoim, luz e escuro contínuo, temperatura ambiente, 7 dias (Abdou & Cooper, 1974).
	Farinha de aveia-ágar, pH 6,0, luz contínua (duas lâmpadas fluorescentes de 15-w, 25cm acima das culturas), 29 ± 2° C, 14 dias (Moraes & Salgado, 1978).
	Extrato de casca de amendoim-ágar, luz contínua, 28° C (Starkey, 1980).
<i>C. asparagi</i> / <i>Asparagus officinalis</i>	Suco V-8-ágar e Decocto de cenoura-ágar, fotoperíodo de 12h ou escuro contínuo, 24° C, 5 dias (Cooperman & Jenkins, 1986).
<i>C. beticola</i> / <i>Beta vulgaris</i>	Extrato de folha de beterraba, fotoperíodo de 12h (lâmpadas incandescentes de 40 W), 22 e 26 ± 2° C, 7 dias (Calpouzos & Stallknecht, 1964).
	Cenoura-melaço-ágar, fotoperíodo de 12h (lâmpadas incandescente de 40 W), 15° C, 7 dias (Calpouzos & Stallknecht, 1965).
	Extrato de folha de beterraba, luz constante ou fotoperíodo de 12h (lâmpadas fluorescentes ou luz negra, de 15 W), 7 dias (Calpouzos & Stallknecht, 1967).
<i>C. capsici</i> / <i>Capsicum annuum</i>	Extrato de folha de mandioca-ágar, fotoperíodo de 12h, 20° C, 7 dias (Loch, 1974).
<i>C. caribaea</i> / <i>Manihot esculenta</i>	Extrato de folha de mandioca-ágar-biotina + extrato de malte composto, pH 5,5, 22° C (Silva et al. 1988).
<i>C. coffeicola</i> / <i>Coffea arabica</i>	Batata-dextrose-ágar (BDA), 1% de ágar, 24° C (Castaño, 1956).
	Folhas de cenoura-ágar, qualquer regime de luz, 24° C (Echandi, 1959).
	Extrato de café-ágar, 9h luz / 15h escuro (12 lâmpadas incandescentes e 14 fluorescentes 70 cm acima das culturas), 24° C, 15 dias (Buitrago-Jaramillo & Fernández-Borrero, 1982).
	Suco de vegetais Yakult® + Panvit-M, luz contínua ou alternada (6 lâmpadas fluorescentes de 15 W a 10 cm das placas), ± 24° C, 7 dias (Del Peloso et al. 1989).
<i>C. cruenta</i> / <i>Vigna unguiculata</i>	Farinha de soja-dextrose-ágar, fotoperíodo de 12h, 25 ± 2° C, 15 dias (Oliveira et al. 1997).
	Cenoura-dextrose-ágar, pH 6,2, luz contínua, temperatura ambiente, 8 dias (Castro & Coêlho, 2000).
<i>C. gossypina</i> / <i>Gossypium hirsutum</i>	Suco V-8-ágar, escuro contínuo, 21-29° C, boa aeração (Miller, 1969).

continua ...

Quadro 1. continuação...

Espécie/ Hospedeiro	Condições propícias à esporulação (Referência)
<i>C. henningsii</i> / <i>Manihot esculenta</i>	Extrato de folha de mandioca-ágar-tiamina, pH 5,5, fotoperíodo de 12h, 24 e 28° C, 7 dias (Matos, 1976).
	Extrato de folha de mandioca-ágar + extrato de malte composto, pH 5,5, 22° C, 7 dias (Silva et al. 1988).
<i>C. kikuchii</i> / <i>Glycine max</i>	Esporulação apenas em sementes de soja, entre 18 e 27° C (Murakishi, 1951).
	BDA, luz do dia, temperatura ambiente, 5-7 dias, técnica de repicagem seletiva (Jones, 1958).
	Suco V-8 ágar, pH 6.34, 28° C, independente do regime de luz, 14 dias (Chen et al. 1979).
	Planta de soja senescente-ágar, 28° C, lâmpadas Gro-Lux 8h por dia, 7 dias (Vathakos & Walters, 1979).
	Suco V-8-ágar, decocto de folha de cenoura-ágar e tecido morto de soja-ágar, fotoperíodo de 12h (4 lâmpadas fluorescentes de 20 W, 30 cm acima das placas), 25° C (Yeh & Sinclair, 1980).
<i>C. nicotianae</i> / <i>Nicotiana tabacum</i>	Decocto de folha de fumo-ágar, 24° C, escuro contínuo, 4-5 dias (Diachun & Valleau, 1941).
	Suco V-8-ágar, pH 4,5-5,0, escuro contínuo, 26° C, 5 dias (Stavelly & Nimmo, 1968).
	CSM (<i>C. nicotianae</i> sporulation medium), luz constante (1 lâmpada fluorescente de 15 W 24 cm acima das placas), 18° C, 6-7 dias (Stavelly & Nimmo, 1969).
	V-8-CaCO ₃ -ágar, fotoperíodo de 12h (2 lâmpadas fluorescentes de 20 W, 25 cm acima das placas), 27 ± 1° C, 5 dias (Queiroz & Menezes, 1993).
<i>C. vanderysti</i> / <i>Phaseolus vulgaris</i>	BDA, pH 5,8, fotoperíodo de 12h, temperatura ambiente, 7 a 14 dias (Asmus & Dhingra, 1983).
<i>C. zea-maydis</i> / <i>Zea mays</i>	Suco V-8-ágar, decocto de folha de milho verde ou senescente-ágar, fotoperíodo de 12h, a 25° C, 14 dias (Beckman & Payne, 1983).
<i>C. zebrina</i> / <i>Trifolium spp.</i>	Suco V-8-ágar, 24 °C, luz fluorescente, 10 dias (Berger & Hanson, 1963).

No Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Fitopatologia da UFV, iniciaram-se estudos com vistas ao controle biológico do patógeno, entretanto, ao se empregar a metodologia utilizada por Del Peloso *et al.* (1989) obteve-se escassa esporulação de *C. coffeicola*. Dessa forma objetivou-se, neste trabalho, estudar a esporulação do patógeno em cultivo artificial. Estudaram-se os efeitos de regimes de luz, meios de cultura, concentração hidrogeniônica do meio e adição de vitaminas, referidas como capazes de induzir a produção de esporos em *Cercospora* spp., bem como a variabilidade de isolados quanto à capacidade de

esporulação, visto que alguns trabalhos mencionam ser esta característica, intrínseca do isolado do patógeno (Goode & Brown, 1970; El-Gholl *et al.* , 1982).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Falhas na tentativa de obter abundante esporulação em meio de cultura, para muitas espécies de *Cercospora*, tem sido o fator limitante em estudos de biologia, sistemática e inoculação cruzada das espécies do gênero. Por isso, o entendimento dos requerimentos nutricionais e ambientais que influenciam o crescimento e a esporulação destas espécies é de importância tanto teórica quanto prática (Griffin, 1994). Vários são os trabalhos desenvolvidos visando obter abundante esporulação de *Cercospora* spp. (Nagel, 1934; Kilpatrick & Johnson, 1956; El-Gholl *et al.* 1982; Suto, 1985). Na maioria dos casos, os trabalhos foram desenvolvidos com um isolado de uma dada espécie, envolvendo, usualmente aspectos relacionados à nutrição, luz e temperatura.

Em 30 meios de cultura inicialmente testados nenhum deles foi satisfatório na indução da esporulação de *C. beticola*, *C. dubia*, *C. davisii* e *C. zebrina* (Nagel & Dietz, 1932). Posteriormente, obteve-se abundante esporulação de *C. beticola* no meio composto da decocção de 250g de folha de beterraba e ágar (Nagel, 1934). O autor verificou, também, para todas as espécies de *Cercospora* testadas, que a transferência de culturas esporulantes produzia abundantes esporos, enquanto a transferência de micélio produzia somente hifas estéreis. Ao se estudarem várias espécies de *Cercospora*, em meio de decocção de folha de cenoura-ágar, observaram que culturas expostas à luz do dia esporulavam mais abundantemente que as mantidas no escuro (Kilpatrick & Johnson, 1956). Diferentes espécies de *Cercospora* esporularam entre 4 a 7 dias, quando utilizada a técnica de semeadura em múltiplos pontos, em meio V8-ágar, no entanto, usando-se o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), raramente eram produzidos conídios (El-Gholl *et al.*, 1982). A maioria das *Cercospora* spp. testadas, esporulou melhor sob irradiação de lâmpada fluorescente de luz negra (Suto, 1985).

C. arachidicola esporulou sob regime de luz contínua, em meio de extrato de folhas de amendoim-aveia-ágar a 28°C (Smith, 1971; Moraes & Salgado, 1978). Os últimos autores concluíram ser a luz fator essencial na esporulação de *C. arachidicola*, pois com escuro contínuo a produção de conídios foi praticamente nula. Porém, em outro ensaio a luz não foi essencial para esporulação de *C. arachidicola*, embora o tenha sido para *Cercosporidium personatum* (Abdou & Cooper, 1974).

Abundante esporulação de *C. asparagi* foi obtida em meios V8 e de decocção de cenoura-ágar, quando se semeou uma suspensão de esporos ou fragmentos de micélio ao meio fundente, sob incubação em regime de escuro contínuo ou fotoperíodo de 12 h; com luz contínua, houve abundante produção de conidióforos, mas a de conídios foi esparsa (Cooperman & Jenkins, 1986).

A esporulação de *C. beticola* foi aumentada quando colônias foram expostas à luz, com comprimentos de onda inferiores a 355 nm, por 72 h e mantidas a 15° C em meio de extrato de folha 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 estimulada e inibida, respectivamente.

Maior esporulação de *C. capsici* ocorreu no meio extrato de folha de pimentão-ágar, fotoperíodo de 12 h, a 20°C (Loch, 1974). O autor concluiu ainda que, aparentemente, a adição de tiamina e biotina inibia a esporulação do fungo, nas concentrações testadas.

De 150 isolados de *C. citrullina*, cultivados em BDA e testados quanto à esporulação, dois foram considerados estáveis, relativamente fáceis de manipular e sem qualquer das dificuldades usualmente encontradas quanto à esporulação em meios de cultura de *Cercospora* spp. (Goode & Brown, 1970). Estes autores concluíram que o fator para determinar a esporulação poderia ser explicado pelo modelo genético da heterocariose, e que se tal hipótese estivesse correta, a falha em formar conídios em meio de cultura poderia ser explicada assumindo-se que tais isolados eram homocarióticos para núcleos contendo genes vegetativos, e nos casos em que os isolados esporulavam por poucas gerações havia indicação de que estes possuíam os componentes genéticos para esporulação, mas no entanto eram perdidos após algumas repicagens.

Cercospora cruenta esporulou em BDA e CDA (cenoura-dextrose-ágar), após 8 dias de incubação em regime de luz contínua, embora tenha esporulado pouco em V8 (Castro & Coêlho, 2000).

C. gossypina esporulou com temperatura variando de 21 a 29° C, com boa aeração e sob escuro contínuo, (Miller, 1969).

Maior esporulação de *C. henningsii* ocorreu no fotoperíodo de 12 h, com pH inicial de 5,5 e meio extrato de folha de mandioca-ágar quando acrescido de tiamina (30 UI/L) (Matos, 1976). Os meios extrato de folha de mandioca-ágar (EFMA) + extrato de malte composto (EMC) e EFMA + biotina + EMC foram os mais promissores para esporulação de *C. henningsii* e *C. caribaea*, respectivamente (Silva *et al.*, 1988).

Obteve-se esporulação de *C. kikuchii* em meio de decocção de folha de cenoura-ágar (Kilpatrick & Johnson, 1956; Lyda *et al.*, 1979), embora este resultado não foi corroborado em outro estudo que utilizou a mesma espécie e meio (Vathakos & Walters, 1979). Estes autores obtiveram abundante esporulação em meio contendo tecido de soja morto ou senescente, no regime de alternância de 8 horas de luz com 16 horas de escuro, mas não obtiveram esporulação sob escuro contínuo. Esporulação deste fungo também foi obtida sob fotoperíodo de 12 h, nos meios de decocção de folha de cenoura-ágar e V8-ágar (Yeh & Sinclair, 1980). Resultados similares foram obtidos com estes mesmos meios, tanto em regime de luz contínua como com alternância de luz e escuro (Chen *et al.*, 1979), embora outros autores obtiveram boa esporulação deste fungo, quando em meio V8-ágar, no regime de luz ou escuro contínuo (Lyda *et al.*, 1979). Inicialmente a esporulação somente havia sido obtida em sementes de soja (Murakishi, 1951) e em outros estudos, utilizando-se os meios BDA, Czapek e Bacto – ágar apenas crescimento micelial havia sido obtido (Crane & Crittenden, 1967).

Cercospora nicotianae esporulou bem em meio de decocção de folha de fumo-ágar (Diachun & Valteau, 1941; Stavely & Nimmo, 1968) e em meio V8-ágar (Stavely & Nimmo, 1968; Queiroz & Menezes, 1993). A temperatura ótima para esporulação foi de 18°C (Stavely & Nimmo, 1968), discordando do obtido por Diachun & Valteau (1941) que determinaram maior esporulação a 27°C. Relativo à luz, melhor esporulação de *C. nicotianae* ocorria com fotoperíodo de 12 h que no escuro contínuo (Queiroz & Menezes, 1993).

Cercospora vanderysti esporulou em BDA e decocto de folha de cenoura (Asmus & Dhingra, 1983). Enquanto *C. zebrina*, esporulou melhor em V8-ágar que em vários outros meios, inclusive BDA (Berger & Hanson, 1963).

Escuro contínuo favoreceu a esporulação de *C. zea-maydis*, quando cultivada em meio de decocção de folhas verdes ou senescentes de milho e em meio V8 a 25 °C, em BDA, a esporulação foi baixa (Beckman & Payne, 1983).

Pelos trabalhos consultados, é difícil concluir quanto às melhores condições para esporulação de várias espécies de *Cercospora*, mas, em geral, *Cercospora* spp. esporulam melhor em meios contendo partes de seus hospedeiros ou em V8-ágar, sob temperaturas entre 20 a 28 °C, no regime de luz alternada ou contínua.

Dúvidas quanto às condições ideais para esporulação também ocorrem com *C. coffeicola*. Inicialmente relatou-se que a esporulação do fungo não foi influenciada pelo regime de luz (escuro contínuo, luz contínua, ou alternância luz-escuro) (Echandi, 1959), contudo, posteriormente, maior esporulação ocorreu sob 9 h de luz alternadas com 15 h de escuro (Buitrago Jaramillo & Fernández Borrero, 1982) ou sob luz contínua (Del Peloso *et al.*, 1989). Quanto aos meios de cultura, boa esporulação do fungo foi obtida em BDA com 1% de ágar (Castaño, 1956), folhas de cenoura-ágar (Echandi, 1959) ou extrato de folhas de café-ágar e extrato de pó de café-ágar (Buitrago Jaramillo & Fernández Borrero, 1982). Del Peloso *et al.* (1989) não conseguiram reproduzir os resultados destes últimos autores e obtiveram maior esporulação em meio suco de vegetais Yakult[®] + Panvit-M. Por outro lado, todos estes autores são consensuais que a melhor faixa para induzir a esporulação deste fungo está entre 24 e 26 °C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura e regimes de luz

Preliminarmente, haviam sido avaliados dois isolados (CC-01 e CC-02) sobre os meios BDA, ST (Suco de Tomate Campbell[®] - 200 mL/L), V8 (Suco de Vegetais V8[®] - 200 mL/L), DFC (Decocção de Folha de Café - 200g/L) e CVA (Caldo de Vegetais - 200mL/L), em três ambientes (i- $22 \pm 2^\circ$ C com 12h de luz; ii- $25 \pm 2^\circ$ C com luz contínua; iii- temperatura ambiente ($24 \pm 4^\circ$ C) com luz contínua) e três épocas de avaliação (7, 10 e 14 dias). Os meios ST, V8 e CVA foram preparados com os sucos autoclavados ou não os quais foram adicionados asépticamente após autoclavagem (Del Peloso *et al.*, 1989)).

Seqüencialmente compararam-se os seguintes meios de cultura, quanto à esporulação de *C. coffeicola*:

- 1- Suco de vegetais V8[®]-ágar (V8) – onde 200 mL do suco V8[®] adicionados a 800 mL de água, completavam o volume de 1 L.
- 2- Decocção de folha de café-ágar (DFC) – 200 g de folha de cafeeiro, colhidas no terço médio das plantas, foram picadas manualmente, adicionadas em 1 L de água destilada e fervidas por 30 minutos. Recolheu-se o decocto, por filtragem em algodão hidrófilo, em Becker e completou-se o volume de 1L, com água destilada.
- 3- Extrato de pó de café-ágar (EPC) – 50 g de pó de café Câmara[®] colocadas em filtro de papel Melita[®], adaptado sobre uma proveta, vertendo-se água destilada fervente até atingir o volume de 1 L.
- 4- Decocção de folha de café-ágar + V8 (DFC+V8) – preparado como em DFC. Porém, utilizaram-se 100 g de folhas de cafeeiro, 100 mL de suco V8[®], completando o volume de 1L com água destilada.

5- Extrato de pó de café-ágar + V8 (EPC+V8) – 25 g de pó de café Câmara[®] colocadas em filtro de papel Melita[®], adaptado sobre uma proveta, vertendo-se água destilada fervente até o volume de 900 mL, completando 1L com 100 mL de suco V8[®].

Para cada meio, adicionaram-se 18 g de ágar, ajustou-se o pH para 5,0, em um potenciômetro, com ácido láctico a 4% ou NaOH 2 N e se autoclavou a 121° C por 20 min.

Colocaram-se, aproximadamente, 15 mL de cada meio em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Transferiu-se para a superfície do meio, um disco (4 mm de diâmetro) de crescimento micelial, retirado da periferia de colônias do isolado CC-01, aos 15 dias de incubação em meio V8-ágar. As placas foram mantidas a $25 \pm 2^\circ$ C, sob regime de luz contínua, escuro contínuo e fotoperíodo de 12 h. Na câmara de crescimento, havia um conjunto de dez lâmpadas (cinco lâmpadas Gro-Lux F20W T12 (Sylvânia[®]), alternadas com cinco lâmpadas F40 T12 / LDP - Luz do Dia Plus (Sylvânia[®])), 70 cm acima das placas, propiciando, na superfície das mesmas, $38 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, medido com um fotômetro. No regime de escuro contínuo, envolveram-se as placas em papel alumínio. Para o regime de luz/escuro, bandejas envoltas em papel alumínio eram diariamente colocadas sobre as placas e decorridas 12h eram removidas. Após 10 dias, removeu-se, com o auxílio de estilete, toda a área das colônias, as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de água destilada e uma gota de Tween 20. Os tubos foram agitados vigorosamente, por 30-35 segundos (El-Gholl *et al.*, 1982) em um agitador de tubos tipo vortex. Posteriormente, com o auxílio de câmara de Neubauer, determinou-se, por meio de duas leituras, o número de conídios em cada repetição.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, por duas vezes. No primeiro, empregaram-se dez repetições por tratamento (uma placa = uma repetição) e, no segundo, cinco repetições.

Para este, e todos os demais ensaios, os dados do número médio de conídios por cm^2 foram transformados para $\log [(\text{conídios}/\text{cm}^2) + 1]$. Nas análises estatísticas, utilizou-se o programa SAS[®] Versão 8.0.

3.2. Variabilidade de isolados de *Cercospora coffeicola* quanto à capacidade de esporulação

Compararam-se cinco isolados do fungo: CC-01 (obtido de folhas de mudas de cafeeiro var. Catuaí Amarelo IAC 62, com sintomas típicos de mancha de olho pardo, provenientes de Paula Cândido-MG.), RAP-01 (obtido de folhas de cafeeiro var. Catuaí provenientes do Viveiro de Café da UFV, Viçosa-MG), RAP-02 (origem similar ao isolado RAP-01, porém a partir de folhas com lesões morfologicamente distintas), RAP-15 (obtido de folhas de cafeeiro var. Topázio H505-9-2-2-1, provenientes de Sacramento-MG) e RAP-22 (obtido de folhas de cafeeiro var. Conilon provenientes do Viveiro de Café da UFV, Viçosa-MG). Todos os isolados foram obtidos utilizando o método de isolamento direto onde, conídios produzidos na superfície das lesões foram coletados com estilete de ponta fina sob microscópio estereoscópio e transferidos para placas de Petri contendo meio V8-ágar e estas, mantidas em câmara de crescimento com $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

De cada um dos isolados, um disco de micélio (4 mm de diâmetro), retirado da periferia de colônias com 15 dias de idade, crescidas em meio V8-ágar, foi transferido para o centro das placas de Petri com os meios de cultura. As placas foram mantidas no regime de luz contínua ($38 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), a $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Após 10 dias, procedeu-se como em 3.1, removendo-se, com o auxílio de estilete, toda a área da colônia, a qual foi transferida para tubo de ensaio contendo 2 mL de água destilada e uma gota de Tween 20. Os tubos foram agitados vigorosamente, por 30-35 segundos e com o auxílio de câmara de Neubauer, determinou-se, por meio de duas leituras, o número de conídios em cada repetição.

Montaram-se dois ensaios no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial. No primeiro ensaio, utilizaram-se os meios V8, DFC+V8 e EPC+V8 (preparados como em 3.1). No segundo, utilizaram-se apenas os meios V8 e EPC+V8. Empregaram-se dez e cinco repetições por tratamento (uma placa = uma repetição) em cada ensaio, respectivamente.

3.3. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes valores de pH do meio de cultura

Utilizaram-se os isolados CC-01 e RAP-02, selecionados no ensaio anterior, crescendo em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo, aproximadamente, 15 mL dos meios V8 ou EPC+V8. O regime de luz e a temperatura foram os mesmos do ensaio anterior.

Compararam-se os níveis de pH compreendidos entre 4,0 e 6,0, com intervalos de 0,5 unidade, os quais foram ajustados imediatamente antes da autoclavagem, em um potenciômetro, mediante a adição de ácido láctico a 4 % ou NaOH 2N. Um disco de 4 mm de diâmetro, retirado da periferia de colônias de cada um dos isolados, crescidas em meio V8-ágar por 15 dias a $25 \pm 1^\circ$ C, foi assepticamente transferido para o centro das placas de Petri. A incubação e avaliação foram similares ao descrito em 3.1, exceto que a aferição ocorreu aos sete dias de incubação.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com cinco repetições (uma placa = uma repetição).

3.4. Esporulação de *Cercospora coffeicola* com a adição de biotina, tiamina e Panvit[®]

Estudaram-se os efeitos de biotina, tiamina e Panvit[®] (complexo vitamínico), adicionadas aos meios V8 e EPC+V8, sobre a esporulação dos isolados CC-01 e RAP-02. No preparo dos meios, seguiram-se os procedimentos já descritos (3.1), e ajustou-se o pH para 5,0.

Para biotina e tiamina, empregaram-se as concentrações de 50 µg e 100 µg / L de meio, respectivamente (Loch, 1974). Para o Panvit[®], dissolveu-se assepticamente, uma drágea em 50 mL de água destilada e esterilizada, os quais foram adicionados ao meio de cultura (Del Peloso *et al.*, 1989). Como testemunhas utilizaram-se os meios V8 e EPC+V8 sem adição de vitaminas. No centro de cada placa de Petri, colocou-se um disco de micélio de 4 mm de diâmetro (idem a 3.1) e as placas foram mantidas sob regime de luz contínua, a $25 \pm 2^\circ$ C. Decorridos 7 dias da semeadura do fungo no meio de cultura, avaliaram-se os resultados, como descrito no item 3.1.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com cinco repetições (uma placa = uma repetição).

3.5. Porcentagem de germinação de esporos de *Cercospora coffeicola*

Neste ensaio, avaliou-se a porcentagem de germinação dos esporos de *C. coffeicola* produzidos sobre os meios V8 + Panvit[®] e EPC+V8 + tiamina. Os meios, preparados como em 3.1 e 3.4, foram vertidos em placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro. Após solidificação semeou-se um disco de 4 mm dos isolados CC-01 e RAP-02, obtido como em 3.2. As placas foram mantidas sob luz constante a $25 \pm 2^\circ$ C. Após sete dias de incubação recortaram-se, com o auxílio de estilete, a área total de cinco colônias de cada um dos tratamentos transferindo-as para tubo de ensaio (capacidade de 50 mL) contendo 10 mL de água destilada mais uma gota de Tween 20, estes foram submetidos à vigorosa agitação por 1 minuto em um agitador de tubos tipo vortex. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze dupla para a remoção de fragmentos do meio de cultura. Com o auxílio de uma câmara de Neubauer (média de 4 leituras) determinou-se a concentração inicial destas suspensões e posteriormente, ajustou-se cada suspensão, para a concentração final de 5×10^4 conídios/mL.

Alíquotas de 0,5 mL da suspensão final de cada um dos tratamentos foram transferidas para placas de Petri de 4 cm de diâmetro contendo aproximadamente 5 mL de ágar-água a 2%. As placas foram mantidas sobre balcão em laboratório e após 6h aferiu-se o número de esporos germinados, aleatoriamente numa amostra de 100 conídios por placa, com o auxílio de microscópio ótico, a 100X. Consideraram-se germinados conídios com tubo germinativo igual ou maior à metade do comprimento do esporo (Beckman & Payne, 1983). O delineamento foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial com três repetições por tratamento (uma placa = uma repetição). Este ensaio foi repetido utilizando-se os meios V8 e EPC+V8 com ou sem adição de Panvit[®] ou tiamina e os isolados CC-01 e RAP-02.

4. RESULTADOS

4.1. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura sob três regimes de luz

Não se detectou interação entre meios de cultura e regimes de luz na esporulação, mas os efeitos individuais do regime de luz ($P=0,01$) e dos meios de cultura ($P=0,01$) afetaram a esporulação do fungo.

Os maiores valores de esporulação foram obtidos com os meios V8 ($1,78 \times 10^3$ conídios/cm²) e EPC+V8 ($2,27 \times 10^2$ conídios/cm²). Entretanto, no primeiro ensaio, não se detectou diferença significativa entre a esporulação do fungo nos meios V8 ($2,53 \times 10^3$ conídios/cm²) e EPC+V8 ($2,21 \times 10^2$ conídios/cm²) e DFC+V8 ($9,70 \times 10^1$ conídios/cm²). O meio EPC ($2,0$ conídios/cm²) foi inadequado à esporulação do fungo. Os meios DFC e DFC+V8, apresentaram variabilidade, quanto aos resultados obtidos no primeiro e segundo ensaios (Figura 1).

Em ambos os ensaios, o fungo esporulou melhor sob luz contínua ($3,75 \times 10^2$ conídios/cm²). No regime de escuro contínuo, a esporulação foi praticamente nula ($1,54 \times 10^1$ conídios/cm²) e sob 12h, os resultados variaram (Figura 2). Embora, no primeiro ensaio não foi constatada diferença entre o regime de luz contínua e fotoperíodo de 12h, no segundo ensaio, observou-se diferença entre estes.

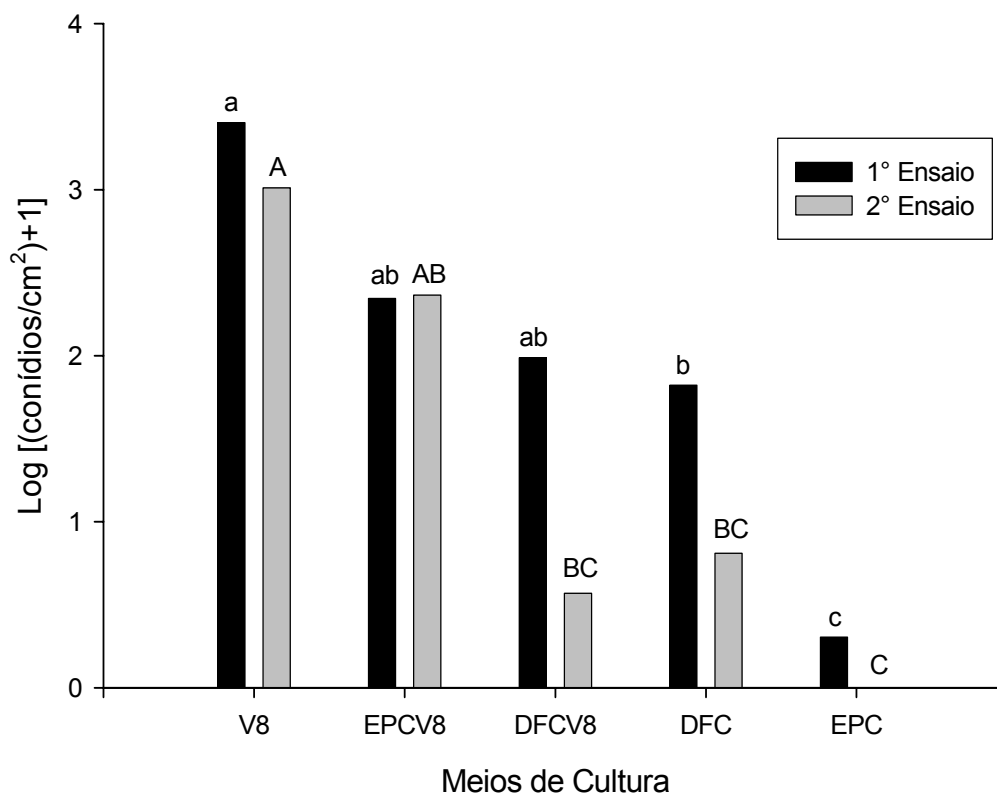


Figura 1. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ (médias de três regimes de luz). Médias seguidas de mesma letra minúscula ou maiúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P=0,01$), no primeiro ou segundo ensaio, respectivamente. V8 - Suco de vegetais V8[®]-ágar; DFC - Decocção de folha de café-ágar; EPC - Extrato de pó de café-ágar; DFC+V8 - Decocção de folha de café-ágar + V8; EPC+V8 - Extrato de pó de café-ágar + V8.

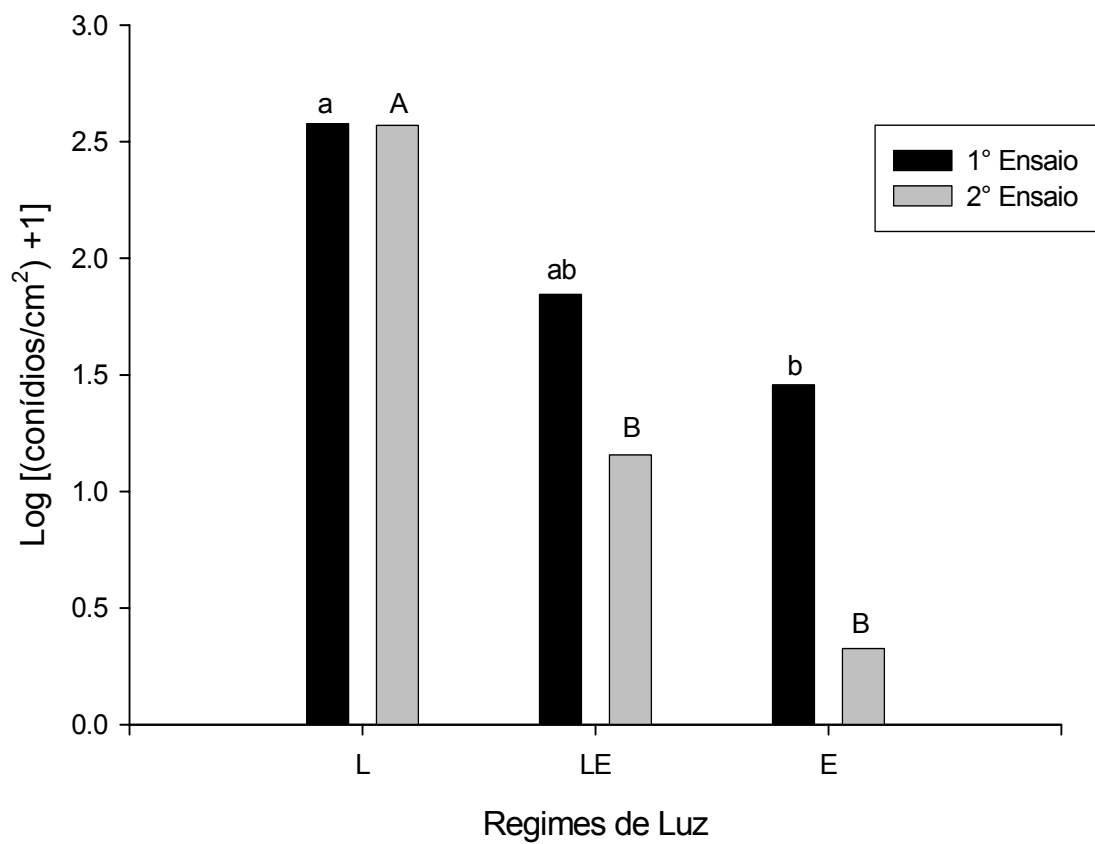


Figura 2. Esporulação de *Cercospora coffeicola* sob três regimes de luz a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ (médias de cinco meios de cultura). L = luz contínua; LE = fotoperíodo de 12 h de luz; E = escuro contínuo. Médias seguidas de mesma letra minúscula ou maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$) no primeiro ou segundo ensaio, respectivamente.

4.2. Variabilidade de isolados de *Cercospora coffeicola* quanto à capacidade de esporulação

Não se detectou efeito significativo da interação isolados e meios de cultura na esporulação do fungo. Entretanto, detectaram-se diferenças significativas entre os isolados quanto à esporulação, apesar de sua resposta ter sido variável (Figura 3). A esporulação do isolado RAP-15 foi praticamente nula (4,90 conídios/cm²) em ambos os ensaios, nos dois meios testados. Os isolados RAP-02 (1,23 x 10⁵ conídios/cm²) e o CC-01 (2,10 x 10⁴ conídios/cm²) esporularam melhor e foram mais estáveis quanto à esporulação. No primeiro ensaio, ambos os isolados diferiram dos demais. Observou-se variabilidade do isolado RAP-01 quanto à esporulação no primeiro (3,52 conídios/cm²) e segundo ensaios (2,02 x 10⁵ conídios/cm²). Nesse último ensaio a esporulação do isolado RAP-01 não diferiu da dos demais com exceção do isolado RAP-15 que, aparentemente, não possui boa capacidade de esporulação nos meios testados. O isolado RAP-22, assim como o isolado RAP-01, também apresentou variabilidade na produção de conídios sob as condições testadas, apesar dos resultados serem menos discrepantes (Figura 3).

No primeiro ensaio, em que se utilizaram os meios V8, EPC+V8 e DFC+V8, detectou-se efeito significativo dos meios de cultura (P=0,01), e a esporulação nos meios EPC+V8 e V8 foi superior à no meio DFC+V8. No segundo ensaio, em que se compararam apenas os meios EPC+V8 e V8 não houve diferença entre estes quanto à esporulação do fungo.

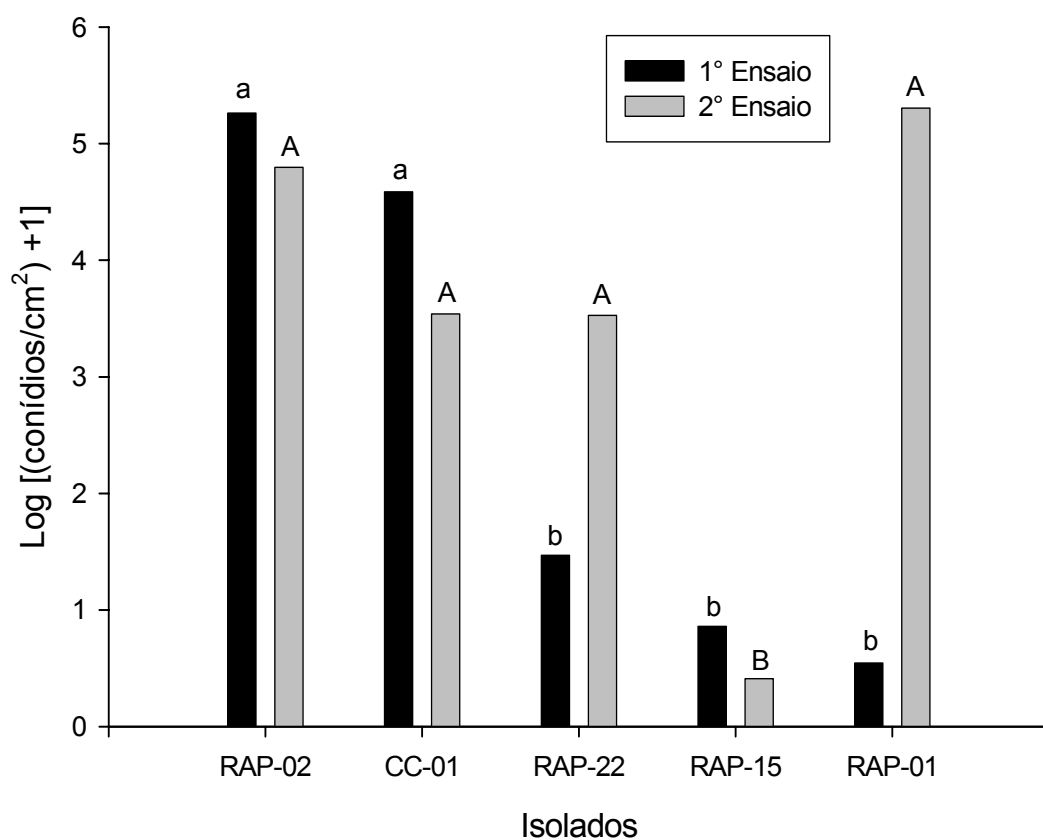


Figura 3. Esporulação de cinco isolados de *Cercospora coffeicola* (médias de dois meios de cultura), sob regimes de luz contínua, a $25 \pm 2^\circ$ C. Médias seguidas de mesma letra minúscula ou maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$) no primeiro ou segundo ensaio, respectivamente.

4.3. Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes valores de pH do meio de cultura

O efeito da interação, meio de cultura e pH, foi significativa ($P=0,01$). Em geral não foi observada diferença entre o número de conídios produzidos nos meios V8 ($9,77 \times 10^4$ conídios/cm²) e EPC+V8 ($4,55 \times 10^4$ conídios/cm²), nos diferentes valores de pH. Porém a esporulação no meio V8 foi superior a no meio EPC+V8 nos pH 4,0 e 5,0. O patógeno esporulou bem em todos os valores de pH avaliados, exceto no meio EPC+V8 com pH inicial igual a 4,0, onde a esporulação foi nula para ambos os isolados (Figura 4). Não se detectou diferença significativa entre isolados, quanto à esporulação.

Testou-se o ajuste de regressão linear da esporulação em função dos níveis de pH, mas esta foi não significativa, indicando não haver diferença entre o número de conídios produzidos nos diferentes valores de pH, nos meios V8 e EPC+V8.

4.4. Esporulação de *Cercospora coffeicola* mediante adição de vitaminas aos meios V8 e EPC+V8

Houve diferença entre isolados, no entanto não houve diferença entre meios de cultura, fontes de vitamina, nem entre as possíveis interações destes fatores. O isolado CC-01 ($1,28 \times 10^5$ conídios/cm²) foi estatisticamente superior ($P=0,01$) ao isolado RAP-02 ($8,41 \times 10^3$ conídios/cm²) (Figura 5).

4.5. Porcentagem de germinação de esporos de *Cercospora coffeicola*.

Em ambos os ensaios observaram-se alta percentagem de conídios germinados em todos os tratamentos. A média de conídios germinados, no primeiro ensaio foi de 97,91 % (amplitude de 95 a 100 %), enquanto no segundo foi de 97,75 % (amplitude de 92 a 100%) (Figura 6).

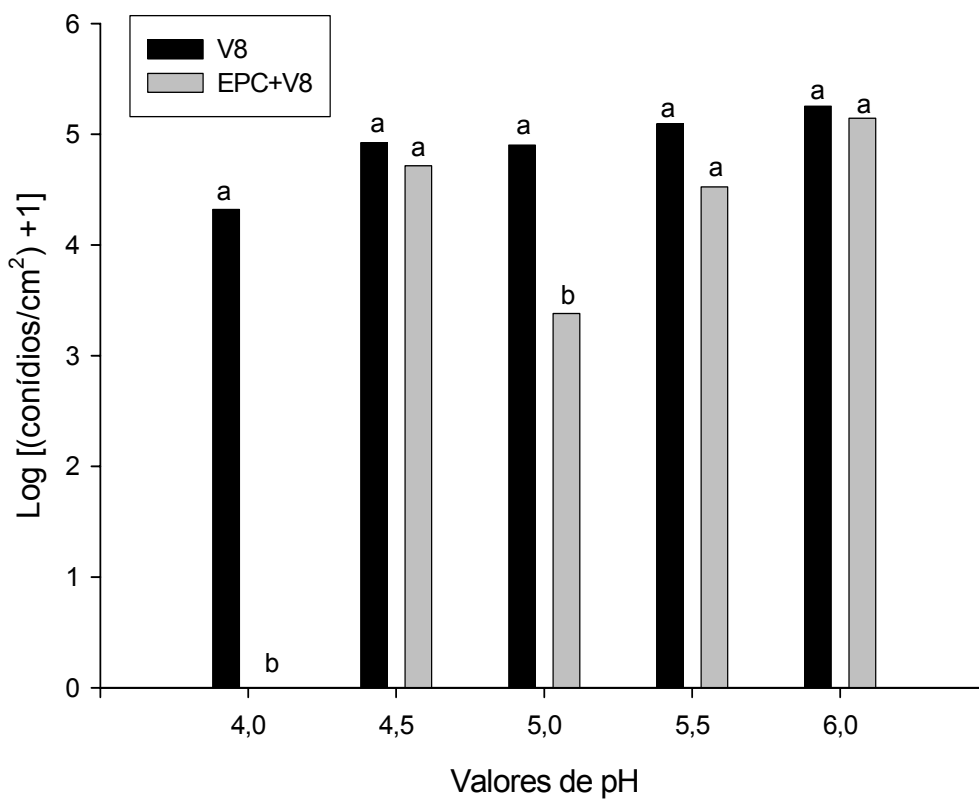


Figura 4. Esporulação de *Cercospora coffeicola* (isolados CC-01 e RAP-02) em cinco níveis iniciais de pH em dois meios de cultura, sob regime de luz contínua, a temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P=0,01$).

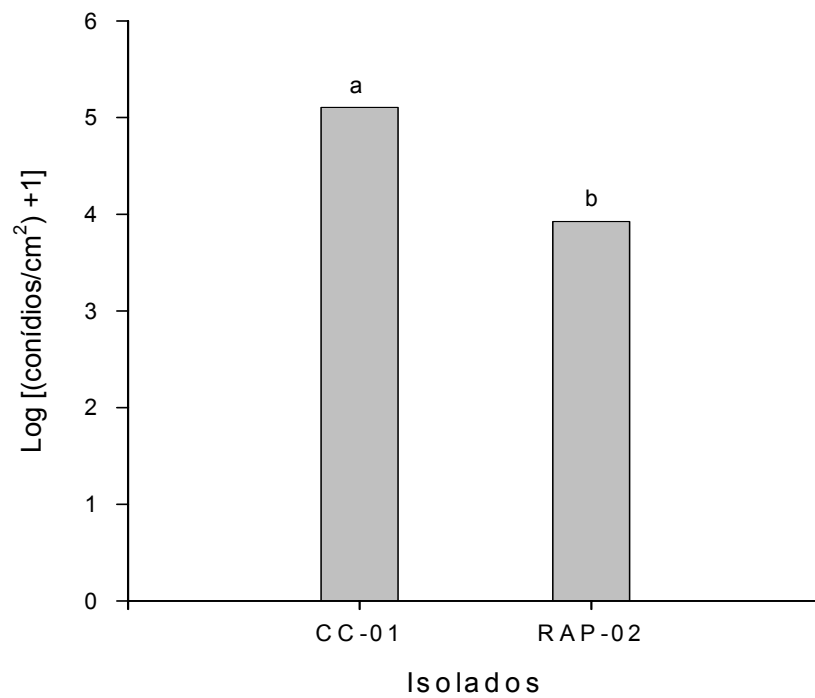


Figura 5. Esporulação de *Cercospora coffeicola* (isolados CC-01 e RAP-02), sob regime de luz contínua, a temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. As barras representam o logaritmo do número médio de conídios/cm² produzidos sobre os meios V8 e EPC+V8 com e sem adição de biotina, tiamina e Panvit[®]. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,01).

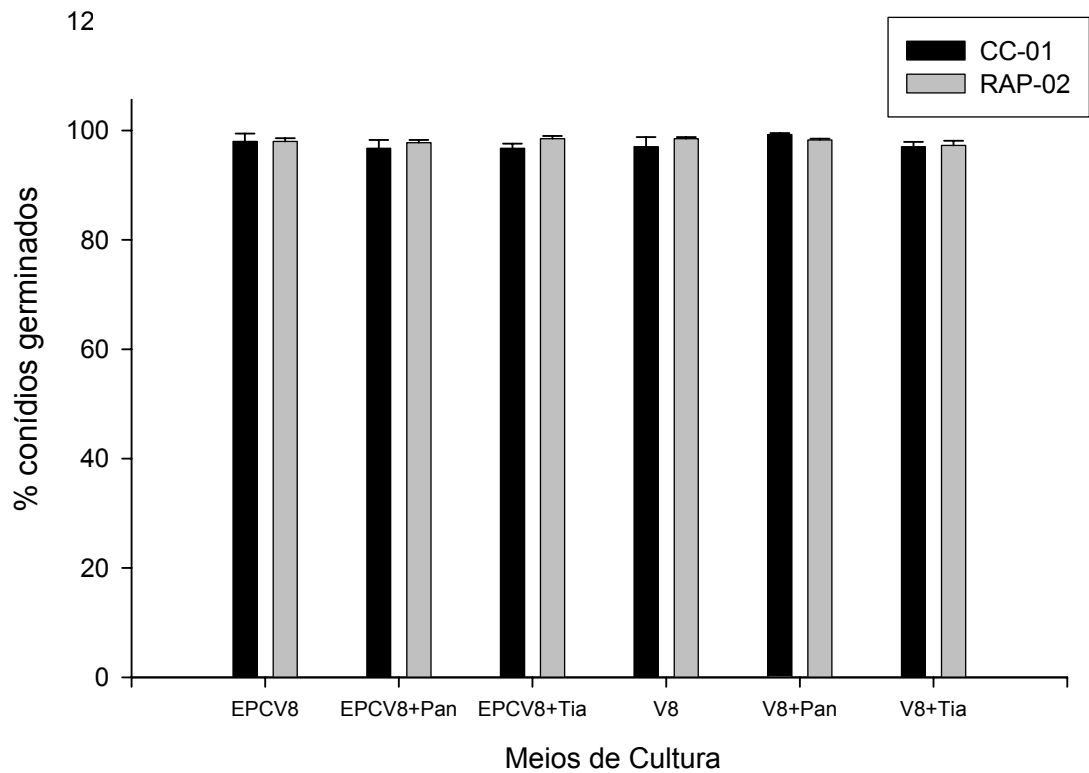


Figura 6. Germinação em ágar-água 2% de conídios de *Cercospora coffeicola* produzidos sobre os meios, Suco de vegetais V8[®] (V8) e Extrato de pó de café + Suco de vegetais V8[®] (EPCV8) com ou sem adição de Panvit[®] (Pan) ou tiamina (Tia). Barras representam a média de quatro repetições, com respectivos desvios padrões.

5. DISCUSSÃO

A esporulação de *Cercospora* spp. em meio de cultura é difícil e não são raros trabalhos onde não foi possível induzir a esporulação destes fungos *in vitro* (Nagel, 1934; Johnson & Valleau, 1949; Murakishi, 1951; Calpouzoz, 1954). Recentemente, ao se avaliar a variabilidade morfológica, patogênica e molecular de isolados de *C. coffeicola*, utilizaram-se suspensões de fragmentos de micélio (González et al. 2000). No entanto, o uso da suspensão de micélio tem o inconveniente de dificultar a padronização da unidade infectiva, pois esta pode ser variável. Assim, é importante dispor de meios de cultura que propiciem abundante esporulação destes patógenos.

Dentre os meios de cultura avaliados no presente trabalho, apenas o EPC não induziu a esporulação de *C. coffeicola*, confirmando resultados obtidos anteriormente (Del Peloso *et al.*, 1989), mas diferindo dos obtidos por Buitrago Jaramillo & Fernández Borrero (1982), que verificaram abundante esporulação do patógeno neste meio. Essa discrepância pode ser atribuída à impossibilidade do preparo do meio EPC nas proporções indicadas pelos autores, bem como pelas “condições de laboratório”, citadas pelos autores, não serem precisas e, ou, reproduzíveis. A adição de suco V8[®] (mistura de suco de tomate, cenoura, aipo, salsa, beterraba, alface, espinafre e agrião), ao meio EPC, aumentou a esporulação de *C. coffeicola* no mesmo, apesar de o número de conídios produzidos ter sido inferior ao do meio de cultura contendo V8 isoladamente. No meio V8, ocorreu a maior esporulação de *C. coffeicola*, similarmente ao obtido para *C. capsici*, *C. zebrina* e *C. nicotianae* (Loch, 1974; Berger & Hanson, 1963; e Stavelly & Nimmo, 1968, respectivamente). *Cercospora coffeicola* esporulou nos meios DFC e DFC+V8 no primeiro ensaio, mas esta resposta não se repetiu no segundo ensaio, o que pode ser atribuído a variações na composição do meio, oriundas das condições fisiológicas da planta e, ou, à variabilidade do patógeno. O meio V8 tem sido um bom

substrato para induzir a esporulação *in vitro* de *Cercospora* spp. e de outro fungos, mas não se conhece(m) ao certo a(s) substância(s) que favorece(m) a esporulação (Miller, 1952).

Apesar de o patógeno ter esporulado nos meios EPC+V8 e V8 no regime de escuro contínuo, maior esporulação ocorreu no regime de luz contínua, resultados semelhantes aos obtidos por Del Peloso *et al.* (1989), mas diferentes dos obtidos por Echandi (1959), para quem o regime de luz não afetou a esporulação, e dos resultados de Buitrago Jaramillo & Fernández Borrero (1982) cuja maior esporulação de *C. coffeicola* foi observada sob exposição diária à 9h de luz e 15h de escuro, embora estes últimos autores não avaliaram a esporulação sob luz contínua. A esporulação de outras espécies de *Cercospora* foi também estimulada pela luz, apesar de haver contradições em alguns casos, como em *C. nicotianae* (Diachun & Valleau, 1941; e Stavely & Nimmo, 1968; Stavely & Nimmo, 1969; Queiroz & Menezes, 1993).

A luz foi essencial para esporulação de *C. coffeicola*, apesar de o regime não ter sido tão importante, pois a esporulação sob luz alternada foi similar àquela sob luz contínua. Entretanto, a intensidade luminosa parece ser determinante na esporulação, o que foi notado na repetição do ensaio que comparou a esporulação dos diferentes isolados. Quando o ensaio foi realizado sob luz contínua, a $38 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (ver item 3.1), quatro dos cinco isolados esporularam bem. Porém, quando o ensaio foi conduzido em câmara de crescimento, com iluminância média de $20 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecida por quatro lâmpadas (duas Gro-Lux e duas fluorescentes brancas), nenhum dos isolados esporulou (dados não apresentados). Portanto, em trabalhos futuros com *C. coffeicola*, deve-se avaliar, também, a intensidade de luz incidente sobre as culturas, pois é possível que maior iluminância induza maior esporulação do patógeno, como constatado para *C. beticola* (Calpouzos & Stallknecht, 1967).

Nesse trabalho, não se avaliou a qualidade da luz, fator que pode afetar a esporulação de *C. coffeicola*. Comprimentos de onda próximos ao UV (320 a 400 nm) e azul (450 a 500 nm) induziram a esporulação de várias espécies de fungos (Trione & Leach, 1969; Leach, 1962). Induziu-se a esporulação de 19 entre 22 espécies de *Cercospora*, quando foram expostas a comprimentos de onda na faixa de 310 a 410 nm (Suto, 1985). A esporulação de *C. beticola* foi estimulada em comprimentos de onda entre 310 e 355 nm (Calpouzos & Stallknecht, 1967), o que talvez ocorra com *C. coffeicola*. Em estudos futuros dever-se-ia

avaliar a influência destes comprimentos de onda na esporulação de *C. coffeicola*, inclusive conduzindo estes estudos em placas de Petri plásticas, para não haver restrições quanto aos comprimentos de onda incidentes sobre as culturas. Pode-se questionar como a luz atua para induzir a esporulação de *C. coffeicola*. Este efeito não está bem determinado, mas, em uma série de estudos, verificou-se que a substância denominada P310, com pico de absorção máximo em 310 nm, ocorria em colônias esporulantes de cinco espécies fúngicas expostas a comprimentos de onda próximo ao ultra-violeta; a substância não ocorria ou existia em concentração muito baixas em colônias não esporulantes crescidas no escuro (Trione & Leach, 1969). Para os autores, nos fungos testados os fotorreceptores eram basicamente os mesmos e que um mecanismo similar deva estar envolvido na fotoindução da esporulação. Carotenóides, flavoproteínas e pteridinas têm sido sugeridos como possíveis fotorreceptores (Carlile, 1965).

Observou-se variabilidade quanto à esporulação nos diferentes isolados de *C. coffeicola*. O isolado RAP-02 foi o mais estável e que produziu maior número de conídios em ambos os ensaios, apesar de não diferir significativamente do CC-01. O isolado RAP-15 não esporulou em nenhum dos meios testados; o isolado RAP-01 esporulou bem no segundo ensaio, mas não no primeiro. Apesar de não se utilizarem isolados monospóricos, pelo menos para o isolado RAP-02 obteve-se baixa variabilidade nos resultados. Pode-se atribuir ao aparecimento de variantes não conidiais, a variabilidade (elevados coeficientes de variação) observada nos demais isolados e ensaios, como sugerido por Ryker (1942). As discrepâncias verificadas na literatura, quanto à capacidade de esporulação *in vitro* de uma mesma espécie de *Cercospora*, poderiam ser explicadas pela variabilidade entre isolados. A utilização de isolados monoconidiais provavelmente não reduziria a variabilidade, pois os conídios são multicelulares e, como verificado, na sua germinação ocorre à degradação dos septos. Assim, a formação de colônias heterocarióticas não seria um fenômeno raro e, conseqüentemente, contribuiria para a variabilidade de um isolado quanto à capacidade de esporulação *in vitro*, bem como quanto às características morfológicas e de patogenicidade.

Setores morfológicamente distintos desenvolveram-se nas colônias de *C. coffeicola*; alguns deles não esporulavam e mantinham esta característica, depois de repicados (dados não mostrados). Ryker (1942), que também observou esses setores em culturas de *C. oryzae*, *C. beticola*, *C. apii* e *C. nicotianae*, sugeriu que essas variantes se originariam por mutações. Esta hipótese de variabilidade genética do fungo encontra suporte nos trabalhos de Calpouzos

(1954), Calpouzios & Stallknecht (1965), Goode & Brown (1970) e Jones (1958), referentes a *C. musae*, *C. beticola*, *C. citrullina* e *C. kikuchii*, respectivamente. Para contornar o problema, Calpouzios (1954) utilizou a técnica que denominou de repicagem seletiva, na qual selecionava setores esporulantes das colônias e os repicava sucessivamente, até obter colônias que esporulavam de maneira uniforme e abundante. O sucesso da técnica foi posteriormente confirmado (Jones, 1958). Possivelmente, tal técnica venha a ser eficaz também para *C. coffeicola*, mas seria necessário conduzir-se ensaios concomitantes, para avaliar a patogenicidade do fungo após repicagens sucessivas, pois muitos patógenos perdem a capacidade de infecção após algumas repicagens (Dhingra & Sinclair, 1995).

Cercospora coffeicola esporulou em todos os níveis de pH testados, exceto no meio EPC+V8 com pH 4,0, onde a esporulação foi nula. O fato de não se detectar diferença significativa quanto à esporulação entre os valores de pH testados neste trabalho não significa que este fator não influencie a esporulação de *C. coffeicola*, e sim que a faixa testada (4,0 a 6,0, com intervalos de 0,5 unidades) não foi limitante. Nos trabalhos em que se avaliou o efeito deste fator em outras espécies de *Cercospora*, utilizaram-se níveis de pH variando de 2,0 a 8,0 e, em geral, concluiu-se que na faixa de 4,0 a 6,0 foi a mais favorável para abundante esporulação dos fungos (Berger & Hanson, 1963; Landers, 1964; Stavely & Nimmo, 1968; Matos, 1976). No presente estudo, utilizou-se o pH inicial de 5,0 em vista dos trabalhos acima citados. Ademais, os autores que estudaram *C. coffeicola* não mencionaram o pH utilizado (Castaño, 1956; Echandi, 1959; Buitrago Jaramillo & Fernández Borrero, 1982) ou, quando mencionado, ele não foi padronizado em todos os meios de cultura (Del Peloso et al., 1989).

Avaliou-se o efeito de vitaminas na esporulação de *C. coffeicola* pois os fungos são naturalmente deficientes em vitaminas (Griffin, 1994). Dentre estas, normalmente tiamina e biotina são as mais requeridas, em concentrações de 10^{-9} a 10^{-6} M e de 10^{-10} a 10^{-8} M, respectivamente. Tiamina tem função de co-carboxilase e sua forma ativa é pirofosfato de tiamina, enquanto a biotina possui função de coenzima de carboxilação e é ativa em ligações covalentes da enzima com carboxilas (Griffin, 1994). Em *Rhizobium etli*, a biotina funciona como co-fator nas ligações CO_2 e enzimas, como na piruvato carboxilase (Streit & Phillips, 1997). Na constituição do Panvit[®] encontra-se tiamina (5 mg/drágea) e outras vitaminas, como riboflavina (2,5 mg/drágea) e nicotinamida (10 mg/drágea), ambas, coenzimas da desidrogenase e também, normalmente requeridas pelos fungos: de 10^{-7} a 10^{-5} M e de 10^{-8} a

10^{-7} M, respectivamente (Griffin, 1994). A adição de biotina, tiamina, ou Panvit[®] aos meios V8 e EPC+V8 não afetou a esporulação de *C. coffeicola*. Este fato é de difícil explicação, pois nos trabalhos em que se estudou o efeito de tais vitaminas na esporulação de *C. coffeicola* e em outras espécies de *Cercospora*, obteve-se efeito significativo, estimulante ou inibidor (Del Peloso *et al.*, 1989; Jandaik & Kapoor, 1972; Loch, 1974; Matos, 1976; Silva *et al.*, 1988; Landers, 1964). No presente estudo, não se constatou efeito significativo das vitaminas adicionadas aos meios de cultura na esporulação de *C. coffeicola*. Entretanto, a adição de tiamina ao meio EPC+V8 favoreceu, ao menos parcialmente, a esporulação dos isolados CC-01 e RAP-02. Em vista deste aparente efeito estimulante da tiamina adicionada ao meio EPC+V8, sugere-se que *C. coffeicola* seja incapaz de sintetizá-la, como constatado para *C. cruenta* (Jandaik & Kapoor, 1972). Por outro lado, com a adição desta vitamina ao meio V8, é possível que a mesma tenha atingido concentrações inibitórias, como sugerido para *C. capsici* (Loch, 1974).

Nenhum dos meios ou vitaminas testadas inibiu a germinação de conídios de *C. coffeicola*. Entretanto, no meio V8 contendo Panvit[®], observou-se tendência de os tubos germinativos serem mais alongados que nas demais combinações meios de cultura - vitaminas, apesar de não se efetuarem medições. A alta porcentagem de germinação de *C. coffeicola*, independente do isolado e do meio de cultura, foi também obtida para o mesmo fungo (Echandi, 1959) e para *C. zae-maydis* (Beckman & Payne, 1983). Nos esporos de *C. coffeicola* germinados, a partir de certo ponto, ocorria à degradação dos septos, enquanto nos não germinados ou com tubo germinativo pouco alongado, os septos permaneciam íntegros. Em vista deste fato, pode-se explicar, em parte, a variabilidade de *C. coffeicola* em meio de cultura, considerando-se a ocorrência de heterocariose, sendo possível que mesmo isolados monoconidiais apresentem alta variabilidade. Caso ocorra em *C. coffeicola*, o efeito da heterocariose precisa ser elucidado, para que se reduzam os problemas relacionados à esporulação *in vitro* do fungo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdou, Y. A. M. & Cooper, W. E. Effect of culture medium and light on sporulation of two peanut leaf spotting fungi, *Cercospora arachidicola* Hori and *Cercosporidium personatum* (Beck & Curtis) Deighton. **Peanut Science 1**: 11-14. 1974.
- Asmus, G. L. & Dhingra, O. D. Isolation, cultivation and sporulation of *Cercospora vanderysti*. **Summa Phytopathologica 8**: 305-310. 1983.
- 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.
- Berger, R. D. A. & Hanson, W. Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. **Phytopathology 53**: 286 - 284. 1963.
- Buitrago Jaramillo, H. L. & Fernández Borrero, O. Esporulación "in vitro" de *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke. **Cenicafé 33**: 03-14. 1982.
- Calpouzos, L. Controlled sporulation of *Cercospora musae* Zimm in pure culture. **Nature 173**: 1084-1085. 1954.
- Calpouzos, L. & Stallknecht, G. F. Sporulation of *Cercospora beticola* affected by light and darkness. **Phytopathology 54**: 890. 1964.
- 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. Effects of light on sporulation of *Cercospora beticola*. **Phytopathology 57**: 679-681. 1967.
- Carlile, M. J. The photobiology of fungi. **Annual Review of Plant Physiology 16**: 175-202. 1965.
- Carvalho, V. L. & Chaulfoun, S. M. **Doenças do Cafeeiro: Diagnose e Controle**. Boletim Técnico N° 58. Belo Horizonte. EPAMIG. 2000.
- Castaño, J. J. Mancha de hierro del cafeto. **Cenicafé 7**: 313-327. 1956.

- Castro, N. R. & Coêlho, S. B. Caracterização fisiológica de isolados de *Cercospora cruenta* em diferentes meios de cultura. **Summa Phytopathologica** **26**: 466-471. 2000.
- Chen, M. D., Lyda, S. D. & Halliwell, R. S. Environmental-factors influencing growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. **Mycologia** **71**: 1150-1157. 1979.
- 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.
- Crane, J. L. & Crittenden, H. W. Growth of *Cercospora kikuchii* on various media. **Plant Disease Reporter** **51**: 112-114. 1967.
- 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. Boca Raton. CRC Press Inc. Lewis Pulishers.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.
- El-Gholl, N. E., Alfieri Jr., S. A., Ridings, W. H. & Schoulties, C. L. Growth and sporulation *in vitro* of *Cercospora apii*, *Cercospora arachidicola*, *Cercospora kikuchii*, and other species of *Cercospora*. **Canadian Journal of Botany** **60**: 862 - 868. 1982.
- González, A., Fajardo, M., Leguizamón-Caycedo, J., Cristancho-Ardila, M. A. & Chaves-Cordoba, B. Variabilidad morfológica, patogénica y molecular de aislamentos de *Cercospora coffeicola*. **Cenicafé** **51**: 306-315. 2000.
- Goode, M. J. & Brown, G. R. Detection and characterization of *Cercospora citrullina* isolates that sporulate readily in culture. **Phytopathology** **60**: 1502-1503. 1970.
- Griffin, D. H. **Fungal Fisiology**. 2nd Ed. New York. Wiley-Liss, Inc. 1994.
- Jandaik, C. L. & Kapoor, J. N. Studies on vitamin requirements of *Cercospora cruenta*. **Indian Phytopathology** **25**: 563 - 565. 1972.
- Jones, J. P. Isolation of sporulating strain of *Cercospora kikuchii* by sub-culturing. **Phytopathology** **48**: 287-288. 1958.
- Kilpatrick, R. A. & Johnson, H. W. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. **Phytopathology** **46**: 180-181. 1956.

- Landers, K. E. Growth of *Cercospora arachidicola* in glucose-phosphate-asparagine-thiamine-agar medium. **Phytopathology** **54**: 1236-1239. 1964.
- Leach, C. M. Sporulation of diverse species of fungi under near-ultraviolet radiation. **Canadian Journal of Botany** **40**: 151-161. 1962.
- Loch, L. C. **Esporulação de *Cercospora capsici* Heald & Wolf em meio de cultura** (Tese de Mestrado). Viçosa/MG. UFV. 1974.
- Lyda, S. D., Chen, M. D. & Halliwell, R. S. Light-temperature interactions in growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. **Phytopathology** **69**: 530 (Abs.). 1979.
- Matos, A. P. **Esporulação de *Cercospora henningsii* Allesch. em função de fatores físicos e nutricionais** (Tese de Mestrado). Viçosa/MG. UFV. 1976.
- Miller, J. W. Cultural conditions affecting sporulation of *Cercospora gossypina*. **Phytopathology** **59**: 511. 1969.
- Miller, P. M. V-8 juice agar as a general-purpose medium for fungi and bacteria. **Phytopathology** **45**: 461-462. 1955.
- Moraes, S. A. & Salgado, C. L. Influência da luz sobre a esporulação de *Cercospora arachidicola* Hori. **Summa Phytopathologica** **4**: 128-135. 1978.
- Murakishi, H. H. Purple seed stain of soybean. **Phytopathology** **41**: 305-318. 1951.
- 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 5 species of *Cercospora* in pure culture. **Phytopathology** **22**: 20 (Abs.). 1932.
- Oliveira, S. M. A.; Silva, D. M. W. & Menezes, M. Efeito de meios de cultura e de regimes de luz no crescimento micelial e esporulação de *Cercospora cruenta*, agente da mancha necrótica do caupi. **Revista Ômega** **10**: 36-38. 1997.
- 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.
- Ryker, T. G. Loss of sporulation in *Cercospora*. **Phytopathology** **32**: 16. 1942.
- Silva, M. F., Cavalcanti, M. A., Poroca, D. M. & Lima, D. M. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribea* e *C. henningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. **Fitopatologia Brasileira** **13**: 54 - 58. 1988.

- Smith, D. H. A simple method for producing *Cercospora arachidicola* conidial inoculum. **Phytopathology** **61**: 1414. 1971.
- Starkey, T. E. A simplified medium for growing *Cercospora arachidicola*. **Phytopathology** **70**: 990-991. 1980.
- Stavely, J. R. & Nimmo, J. A. Effects of temperature upon growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. **Phytopathology** **59**: 496 - 498. 1969.
- Stavely, J. R. & Nimmo, J. A. Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. **Phytopathology** **58**: 1372-1376. 1968.
- Streit, W. R. & Phillips, D. A. A Biotin-regulated locus, bioS, in a possible survival operon of *Rhizobium meliloti*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** **10**: 933-937. 1997.
- Suto, Y. Sporulation of several cercosporae on culture media under the irradiation of a black-light fluorescent lamp. **Journal of Japanese Forestry Society** **67**: 51-56. 1985.
- Trione, E. J. & Leach, C. M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology** **59**: 1077-1083. 1969.
- Vathakos, M. G. & Walters, H. J. Production of conidia by *Cercospora kikuchii* in culture. **Phytopathology** **69**: 832-833. 1979.
- Yeh, C. C. & Sinclair, J. B. Sporulation and variation in size of conidia and conidiophores among five isolates of *Cercospora kikuchii*. **Plant Disease** **64**: 373-374. 1980.